



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

# **Identificación de nuevos biomarcadores de trombosis venosa mediante técnicas ómicas**

**ÁLVARO FERNÁNDEZ PARDO**

**Dirigida por**

Dra. Silvia Navarro Rosales

Dra. Pilar Medina Badenes

Septiembre 2022



A mis padres Joaquín y Mari Carmen  
y a mi hermano Carlos,



“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,  
saben lo lejos que pueden llegar a ir”

T.S. Elliott



# **AGRADECIMIENTOS**



En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora Silvia. Tú fuiste la persona que me dio la oportunidad de desarrollar este proyecto y que confió en mí desde el primer momento. A pesar de las circunstancias, siempre te has mantenido a mi lado, guiándome en este camino, y es algo que te agradeceré siempre. Sin tu ayuda, esto no hubiera sido posible.

Pili, gracias por no dejarme solo, por tu disposición a echarme una mano siempre que lo he necesitado, por tu vitalidad y por las ganas y pasión que transmites por la investigación.

Quiero acordarme también de nuestro Paco, quien me acompañó y estuvo a mi lado en gran parte de este viaje. Fue una gran suerte poder aprender de ti y sé que estarías muy orgullo de aquel ``xiquet`` que recogías en la puerta de su casa para ir a jugar a fútbol con tus amigos.

Gracias a todos los compañeros del grupo de investigación, los que están y los que ya no: Julia, Emma, Fernando, Laura, Majo, Raquel... Han sido muchas horas de trabajo juntos y fue toda una suerte compartirlas con vosotros.

Gracias también al Dr. Sergi Morais y a todo el equipo del IDM: MJ, Perico, Gabi, Miquel, Salva, Sara... por acogerme como uno más en el laboratorio y hacer que mi estancia allí fuera una experiencia inolvidable.

Quiero agradecer especialmente a Javi, mi compañero de batallas, por tantas tardes uno enfrente del otro esperando que llegara este día. Has sido un apoyo constante e incondicional durante todo este tiempo. También a Inma, Laura, Roger, Jéssica, Raquel, Lorena, Marta... porque, aunque ya no nos veamos a diario, el buen rollo se mantiene intacto.

A mis nuevos compañeros, Elisa, Alberto, Adri, María, Marta..., por aguantarme y apoyarme en el día a día estos últimos meses cuando más falta me hacía.

A mis amigos de toda la vida, Celia, Nacho, Esteban, Nawal..., porque siempre habéis estado ahí cuando más lo he necesitado. También a mis amigos de la carrera, María, Cristina, Marta, Vicky, Irene... por entenderme ni cuando yo podía hacerlo.

A mis amigos de la música, Roberto, Irene, Gustavo, Marta, Esther..., por alegrarme los jueves, y los no tan jueves, y forzarme a que me despejara entre risas. También a mis amigos del pueblo, María, Álex, Alicia, Iván, Dani, Jaume..., por entender mis ausencias y recargarme las pilas en los momentos que más lo he necesitado

A Natalia, por ser un apoyo fundamental en este reto, por contagiarme de alegría y optimismo, por comprenderme y por ayudarme a levantarme todas las veces que he caído.

Y por último, a mi familia, porque siempre están ahí, porque sin ellos no sería lo que soy. Por apoyarme en todo lo que he hecho y animarme a que siga hacia adelante. Vuestro cariño diario ha sido imprescindible en este camino.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1. Introducción</b>	<b>27</b>
<b>1.1. Tromboembolismo venoso</b>	<b>27</b>
1.1.1. Epidemiología del TEV	27
1.1.2. Fisiopatología del TEV	29
<b>1.2. Fisiología de la coagulación</b>	<b>31</b>
1.2.1. Hemostasia primaria	32
1.2.2. Hemostasia secundaria	33
1.2.3. Modelo clásico de la coagulación	35
1.2.4. Modelo celular de la coagulación	36
1.2.5. Anticoagulación y fibrinólisis	38
<b>1.3. Factores de riesgo</b>	<b>40</b>
1.3.1. Factores de riesgo hereditario	41
1.3.1.1. Historia familiar	41
1.3.1.2. Raza	41
1.3.1.3. Grupo sanguíneo ABO	42
1.3.1.4. Desórdenes genéticos en proteínas de la coagulación	42
1.3.1.4.1. Desórdenes de pérdida de función	42
1.3.1.4.2. Desórdenes de ganancia de función	44
1.3.1.4.3. Otros desórdenes en proteínas de la coagulación	44
1.3.2. Factores de riesgo adquiridos	46
1.3.2.1. Edad	46
1.3.2.2. Género	46
1.3.2.3. Obesidad	48
1.3.2.4. Síndrome antifosfolípido	48
1.3.2.5. Tabaco	49
1.3.2.6. Cáncer	50
1.3.2.7. Hospitalización	51
1.3.2.8. Cirugía	52
1.3.2.9. Traumatismo	52
1.3.2.10. Inmovilización	53
1.3.2.11. Catéteres venosos	53
1.3.2.12. Embarazo y puerperio	54
1.3.2.13. Anticonceptivos orales y terapia hormonal	54
<b>1.4. Diagnóstico del TEV</b>	<b>56</b>
<b>1.5. Tratamiento del TEV</b>	<b>57</b>
<b>1.6. Biomarcadores de TEV</b>	<b>59</b>
1.6.1. Dímero D	59
1.6.2. P-selectina	59
1.6.3. Micropartículas	60
1.6.4. Proteína C reactiva y otros marcadores inflamatorios	61
1.6.5. Generación de trombina	61
1.6.6. Factor VIII	62
1.6.7. NETs	62
<b>1.7. Tecnologías ómicas y TEV</b>	<b>63</b>

<b>2. Objetivos</b> .....	<b>69</b>
<b>3. Material y métodos</b> .....	<b>73</b>
<b>3.1. Grupos clínicos</b> .....	<b>73</b>
3.1.1. Pacientes con TEV .....	73
3.1.2. Controles sanos .....	73
<b>3.2. Colección de muestras</b> .....	<b>73</b>
<b>3.3. Proteómica</b> .....	<b>74</b>
3.3.1. Fase de screening .....	74
3.3.1.1. Características clínicas de los sujetos del estudio.....	74
3.3.1.2. Determinación de parámetros bioquímicos .....	75
3.3.1.3. Extracción de proteínas .....	75
3.3.1.4. Creación de la librería de espectros.....	76
3.3.1.4.1. Procesamiento en gel de poliacrilamida de una dimensión (1D PAGE) del <i>pool</i> de muestras 76	
3.3.1.4.2. Procesamiento en solución del <i>pool</i> de muestras.....	77
3.3.1.4.3. Espectrometría de masas DDA o <i>shotgun</i> del <i>pool</i> de muestras.....	77
3.3.1.4.4. Identificación de proteínas del <i>pool</i> de muestras .....	78
3.3.1.5. Detección de proteínas en las muestras de los sujetos del estudio .....	78
3.3.1.5.1. Extracción de péptidos y espectrometría de masas DIA o SWATH .....	78
3.3.1.5.2. Identificación y cuantificación de proteínas.....	79
3.3.1.6. Análisis estadístico .....	80
3.3.1.7. Anotación funcional.....	80
3.3.2. Fase de validación .....	80
3.3.2.1. Características clínicas de los sujetos del estudio.....	80
3.3.2.2. Determinación de parámetros bioquímicos .....	81
3.3.2.3. Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de proteínas.....	81
3.3.2.4. Validación por técnicas inmunoanalíticas.....	82
3.3.2.4.1. ELISAs comerciales .....	82
3.3.2.4.2. Puesta a punto de un inmunoensayo en DVD para la cuantificación de las proteínas candidatas.....	83
3.3.2.5. Análisis estadístico .....	86
<b>3.4. Metabolómica</b> .....	<b>87</b>
3.4.1. Reactivos y productos químicos .....	87
3.4.2. Fase de screening.....	87
3.4.2.1. Características clínicas de los sujetos del estudio.....	87
3.4.2.2. Determinación de parámetros bioquímicos .....	88
3.4.2.3. Procesado de muestras y secuencia analítica .....	88
3.4.2.4. Análisis UPLC-QToF-MS.....	89
3.4.2.5. Procesamiento de datos .....	90
3.4.2.6. Análisis estadístico .....	90
3.4.2.7. Anotación de metabolitos.....	91
3.4.3. Fase de validación .....	91
3.4.3.1. Características clínicas de los sujetos del estudio.....	91
3.4.3.2. Determinación de parámetros bioquímicos .....	92
3.4.3.3. Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de metabolitos.....	93
3.4.3.4. Análisis del efecto de los metabolitos en un ensayo de coagulación <i>in vitro</i> .....	93
3.4.3.5. Análisis estadístico.....	94
<b>3.5. Lipidómica</b> .....	<b>95</b>
3.5.1. Características clínicas de los sujetos del estudio .....	95

3.5.2.	Reactivos y productos químicos .....	96
3.5.3.	Determinación de parámetros bioquímicos.....	96
3.5.4.	Extracción de lípidos .....	96
3.5.5.	Análisis UPLC-QToF-MS .....	97
3.5.6.	Procesamiento y análisis de datos .....	97
3.5.7.	Análisis estadístico .....	98
<b>4.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>103</b>
<b>4.1.</b>	<b>Proteómica .....</b>	<b>103</b>
4.1.1.	Fase de screening .....	103
4.1.2.	Fase de validación .....	107
4.1.2.1.	Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de proteínas.....	107
4.1.2.2.	Cuantificación mediante técnicas inmunoanalíticas.....	108
<b>4.2.</b>	<b>Metabolómica .....</b>	<b>115</b>
4.2.1.	Fase de screening .....	115
4.2.2.	Fase de validación .....	116
4.2.3.	Análisis del efecto de los metabolitos en el test de generación de trombina .....	123
<b>4.3.</b>	<b>Lipidómica .....</b>	<b>128</b>
4.3.1.	Análisis lipidómico.....	128
4.3.2.	Diferencias lipidómicas entre pacientes con TEV y controles sanos .....	130
<b>5.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>141</b>
<b>5.1.</b>	<b>Proteómica .....</b>	<b>141</b>
<b>5.2.</b>	<b>Metabolómica .....</b>	<b>145</b>
<b>5.3.</b>	<b>Lipidómica .....</b>	<b>150</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>159</b>
<b>7.</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>165</b>



# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

**ID PAGE:** gel de poliacrilamida de una dimensión

**ACN:** acetonitrilo

**ACOD:** anticoagulante oral de acción directa

**ACOs:** anticonceptivos orales

**ADP:** adenosín difosfato

**AL:** anticoagulante lúpico

**anti-CLs:** anticuerpos anticardiolipinas

**APC:** proteína C activada

**ApoA1:** apolipoproteína A1

**ApoB:** apolipoproteína B

**APTC:** angiografía pulmonar por tomografía computarizada

**AT:** antitrombina

**ATP:** adenosín trifosfato

**AUC:** área bajo la curva

**BA:** ácido biliar

**Car:** carnitina

**CE:** éster de colesterol

**Cer:** ceramida

**DDA:** adquisición dependiente de datos

**DG:** diglicérido

**DIA:** adquisición independiente de datos

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DVD:** disco versátil digital

**ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**EPCR:** receptor endotelial de la proteína C

**ESI:** electrospray

**ETP:** *endogenous thrombin potential*

**FA:** ácido graso

**FDR:** *false discovery rate*

**FII:** factor II o protrombina

**FT:** factor tisular

**FvW:** factor von Willebrand

**FV:** factor V

**FVL:** factor V Leiden

**FVII:** factor VII

**FVIII:** factor VIII

**FIX:** factor IX

**FX:** factor X

**FXI:** factor XI

**FXII:** factor XII o de Hageman

**FXIII:** factor XIII

**GlcCer:** glucosilceramida

**GPPV:** gammagrafía pulmonar de perfusión-ventilación

**GWAS:** estudios de asociación de genoma completo

**HBPM:** heparina de bajo peso molecular

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HMWK:** quininógeno de alto peso molecular

**HPTEC:** hipertensión pulmonar tromboembólica crónica

**HRP:** peroxidasa de rábano

**IEF:** isoelectroenfoque

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**IMC:** índice de masa corporal

**IS:** estándar interno

**LBP:** *Lipopolysaccharide binding protein*

**LC-MS/MS:** espectrómetro de masas en tándem con cromatografía líquida

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**LPC:** lisofosfatidilcolina

**LPE:** lisofosfatidiletanolamina

**m/z:** relación masa/carga

**MG:** monoglicérido

**MPO:** mieloperoxidasa

**MRM:** monitorización de reacciones múltiples

**nanoESI-QqTOF:** doble cuadrupolo-tiempo de vuelo acoplado a una fuente de ionización con electrospray

**NETs:** trampas extracelulares de neutrófilos

**PAF-AH:** *platelet activating factor-acylhydrolase*

**PAI-1:** inhibidor del activador del plasminógeno

**PAR:** receptores activados por proteasas

**PBST:** tampón fosfato salino con 0,05% (m/v) de Tween-20

**PC:** fosfatidilcolina

**PCR:** proteína C reactiva

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PI:** fosfatidilinositol

**PK:** precalicreína

**PLA2G7:** *Phospholipase A2 Group VII*

**ProC:** proteína C

**ProS:** proteína S

**PS:** fosfatidilserina

**QC:** control de calidad

**RBP4:** *Retinol binding protein 4*

**RIC:** rango intrecuartílico

**RNA:** ácido ribonucleico

**ROC:** *receiver operating characteristic*

**SAF:** síndrome antifosfolípido

**SM:** esfingomielina

**SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido

**SPT:** síndrome posttrombótico

**SWATH:** *sequential window acquisition of all theoretical Fragment-Ion Spectra*

**TAFI:** inhibidor de fibrinólisis activado por trombina

**TCA:** ácido tricloroacético  
**TEAB:** tampón de bicarbonato de trietilamonio  
**TEP:** tromboembolismo pulmonar  
**TEV:** tromboembolismo venoso  
**TFA:** ácido trifluoroacético  
**TFPI:** inhibidor de la vía del factor tisular  
**TGs:** triglicéridos  
**TGT:** test de generación de trombina  
**TM:** trombomodulina  
**TMB:** tetrametilbenzidina  
**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral- $\alpha$   
**TP:** tiempo de protrombina  
**t-PA:** activador tisular del plasminógeno  
**tR:** tiempo de retención  
**TTPA:** tiempo de tromboplastina parcial activada  
**TVP:** trombosis venosa profunda  
**TxA2:** tromboxano A2  
**u-PA:** activador de plasminógeno de tipo uroquinasa  
**V/V:** dilución volumen/volumen





# **INTRODUCCIÓN**



# 1. Introducción

## 1.1. Tromboembolismo venoso

### 1.1.1. Epidemiología del TEV

Tromboembolismo venoso (TEV) es el término conjunto que se adopta para incluir la trombosis venosa profunda (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP). La TVP ocurre cuando se forma un trombo en el sistema venoso profundo, normalmente en las venas profundas de extremidades inferiores, pero también en extremidades superiores o en otras venas profundas como las de senos venosos cerebrales, esplénica, mesentérica, hepática, portal, vena cava inferior o venas renales. El TEP se origina, principalmente, cuando un fragmento de un trombo ya formado se disgrega del lugar donde se generó y es transportado por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares, quedando obstruidas.

El TEV es la tercera enfermedad cardiovascular más común, por detrás del infarto de miocardio y el ictus, y tiene una incidencia aproximada de entre 1-2 casos por 1.000 individuos/año [1-6], generando un impacto económico muy notable en los sistemas de salud [7,8]. Del total de casos de TEV, aproximadamente dos tercios corresponden a eventos de TVP mientras que el tercio restante corresponde a episodios de TEP, con o sin presencia de TVP [9]. Estudios de tendencia han mostrado que la incidencia del TEV ha aumentado en las últimas décadas y que es muy probable que lo siga haciendo en los próximos años [10-12]. Este incremento en la incidencia del TEV es debido, mayoritariamente, a un aumento y mejora en la utilización de las pruebas de imagen para el diagnóstico del TEP, concretamente, de la angiografía pulmonar por tomografía computarizada (APTC), siendo capaces de diagnosticar un mayor número de casos de TEP y de TEP + TVP [10,13].

Dos de las principales consecuencias o efectos a largo plazo del TEV son el síndrome postrombótico (SPT) y la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica (HPTEC).

El SPT es la complicación más común de TVP, afectando a entre el 20% y el 50% de los pacientes con una TVP de miembros inferiores [14,15]. Los síntomas clásicos del SPT incluyen el dolor crónico, hinchazón y problemas de la piel, que van desde sequedad hasta decoloración y úlceras venosas [16]. Se ha descrito que la TVP está asociada con un aumento dramático del riesgo de incapacidad laboral [17], siendo la aparición de SPT una

de las causas más comunes del empeoramiento en la calidad de vida de los pacientes con TVP [18,19]. Aunque los factores de riesgo del SPT no se conocen con exactitud, la edad avanzada, el género masculino, la naturaleza proximal (y no distal) de la TVP y unos niveles elevados de dímero-D han sido asociados con el desarrollo de SPT [20], así como una localización ipsilateral de TVP recurrente, la cual aumenta por 6 veces el riesgo de presentar SPT [14].

La HPTEC afecta a entre el 1% y el 4% de los pacientes con TEP [21]. Se caracteriza por la transformación fibrótica de los trombos presentes en las arterias pulmonares, que desencadena la obstrucción mecánica de éstas. La HPTEC se caracteriza por generar disnea y dolor torácico de tipo pleurítico [22], y en estados avanzados puede causar insuficiencia cardíaca e incluso la muerte [23].

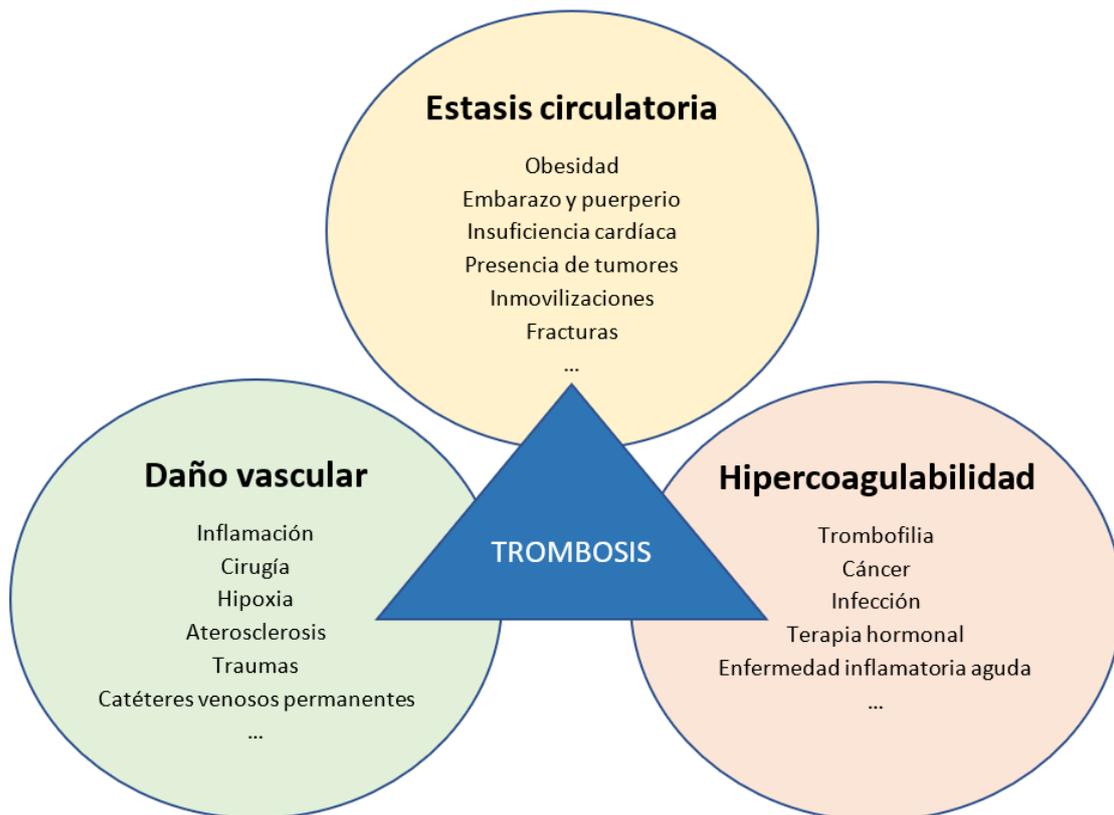
En cuanto a los datos de recurrencia trombótica, el TEV es con frecuencia una condición crónica con unas tasas estimadas de recurrencia que llegan al 30-40% en los primeros 10 años tras el episodio trombótico [24]. En un estudio en el que se realizó el seguimiento de 1.719 pacientes diagnosticados de TEV entre 1966 y 1990, se examinó la incidencia de recurrencia acumulada a lo largo del tiempo y se vio que esta incidencia fue del 1,6% a los 7 días, del 5,2% a los 30 días, del 10,1% a los 180 días, del 12,9% al año, del 22,8% a los 5 años y llegaba al 30,4% a los 10 años del primer evento [25]. Entre los principales factores de riesgo y los predictores de recurrencia encontramos el tener una edad avanzada [24-29], un elevado índice de masa corporal (IMC) [25,30,31], el género masculino [32-36], tener cáncer en fase activa [37-41], o padecer una enfermedad neurológica con paresia de piernas [25]. Otros predictores de recurrencia incluyen, el haber padecido un episodio de TEV idiopático, es decir, no provocado [42-45], padecer síndrome antifosfolípido (SAF) [46,47], tener deficiencias de antitrombina (AT), proteína C (ProC) o proteína S (ProS) [48-50], niveles elevados persistentes de dímero D en pacientes con TEV idiopático [51-53], y la presencia de trombosis venosa residual [54,55].

Para monitorizar y evaluar el riesgo, se han generado muchos algoritmos de predicción que ayudan a estratificar a los pacientes según su mayor o menor riesgo de recurrencia trombótica, los cuáles pueden ayudar a tomar mejores decisiones a la hora de la administración o no de una trombopprofilaxis adecuada [56-61], mejorando el tratamiento y seguimiento hacia una medicina personalizada.

La tasa de mortalidad asociada al TEV varía mucho dependiendo de si hablamos de TVP o de TEP, siendo el riesgo de muerte temprana en pacientes de TEP 18 veces mayor que en pacientes de TVP [62,63]. Para casi un cuarto de los pacientes de TEP, su presentación clínica inicial es la muerte súbita [62], sin embargo, pasado un año del evento, la tasa de mortalidad de ambas patologías parece mostrarse similar [64], y superior a la población general que no haya padecido ningún evento de TEV. La mortalidad a largo plazo después de un primer episodio de TEV varía ampliamente en la literatura (entre el 12% y el 50%) [62,65-69], siendo la edad avanzada [70], enfermedad cardiovascular [66], el cáncer en fase activa [3,66-68] y el TEV recurrente los predictores más importantes de mortalidad [62,68].

### **1.1.2. Fisiopatología del TEV**

En 1856, el Doctor Rudolf Virchow desarrolló el concepto que describe la génesis de la trombosis intravascular. Virchow planteó la hipótesis de que la estasis circulatoria debida a la interrupción del flujo sanguíneo, la irritación o daño en el endotelio vascular, y los cambios en la sangre que conducen a un estado de hipercoagulabilidad o protrombótico iniciarían la generación de trombos venosos agudos [71]. Estos tres componentes forman la denominada tríada de Virchow (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estasis circulatoria, daño vascular e hipercoagulabilidad son los tres componentes de la **tríada de Virchow**.

El primer componente de la tríada de Virchow es la estasis circulatoria, producida por anomalías en el flujo sanguíneo. La mayoría de los trombos venosos tienen su origen en regiones con flujo sanguíneo lento, como por ejemplo las venas profundas de miembros inferiores, o bien, en bifurcaciones del sistema venoso donde hay irregularidades en el flujo sanguíneo [72]. Esta acumulación de sangre debido a una circulación más lenta puede provocar un estado de hipercoagulabilidad del torrente sanguíneo. Algunos ejemplos de condiciones que causan una compresión en las venas y pueden aumentar la estasis venosa, son la obesidad, el embarazo, la insuficiencia cardíaca o la presencia de tumores, condiciones en las cuales profundizaremos más adelante. Para evitar un exceso de estasis venosa en estas zonas donde el flujo sanguíneo es más lento existen las denominadas bombas musculares, un conjunto de músculos esqueléticos que ayudan al corazón en la circulación sanguínea y que son especialmente importantes para aumentar el retorno venoso al corazón. En situaciones donde estos músculos son menos activos, como por ejemplo fracturas de extremidades, inmovilizaciones, parálisis u hospitalizaciones con encamamiento prolongado, aumenta el riesgo de estasis y, por tanto, de trombosis venosa [73].

El segundo componente enunciado por Virchow es la irritación o el daño en el endotelio vascular. En la vasculatura sana, el endotelio tiene una superficie antitrombótica y profibrinolítica, además de secretar factores que mantienen el equilibrio hemostático. Sin embargo, en presencia de daño vascular (inflamación, hipoxia, traumas, presencia de catéteres venosos permanentes, etc), el endotelio sufre diversas modificaciones que se traducen en la exposición y liberación de factores, algunas de ellos que favorecen un estado de hipercoagulabilidad, que producen un desequilibrio de la homeostasis sanguínea y un estado procoagulante y protrombótico [74].

El tercer componente de la tríada es la hipercoagulabilidad. El riesgo de TEV aumenta cuando el equilibrio entre fuerzas pro- y anticoagulantes se desregula y se genera un estado de hipercoagulabilidad sanguínea. Hay muchos factores que entran en juego en este proceso, en los cuáles profundizaremos más tarde, y que modulan el riesgo de un individuo a padecer un evento trombótico. Estos factores o condiciones los clasificamos en hereditarios o adquiridos [73].

### **1.2. Fisiología de la coagulación**

La hemostasia es un mecanismo de defensa del organismo que se activa tras haber sufrido un traumatismo o lesión vascular, además de ayudar a prevenir la pérdida de sangre del interior de los vasos sanguíneos.

Se divide en dos fases:

- 1) Hemostasia primaria: intervienen fundamentalmente las plaquetas, las cuáles se adhieren a la superficie lesionada y se agregan para constituir el “tapón hemostático plaquetar”.
- 2) Hemostasia secundaria o coagulación de la sangre: en esta fase, la activación de múltiples proteínas del plasma (factores de la coagulación) produce la formación de un coágulo de fibrina, sobre el tapón plaquetar, que impide la salida de sangre al exterior.

El sistema fibrinolítico es el encargado de la degradación del coágulo una vez se ha reparado el daño vascular o tisular.

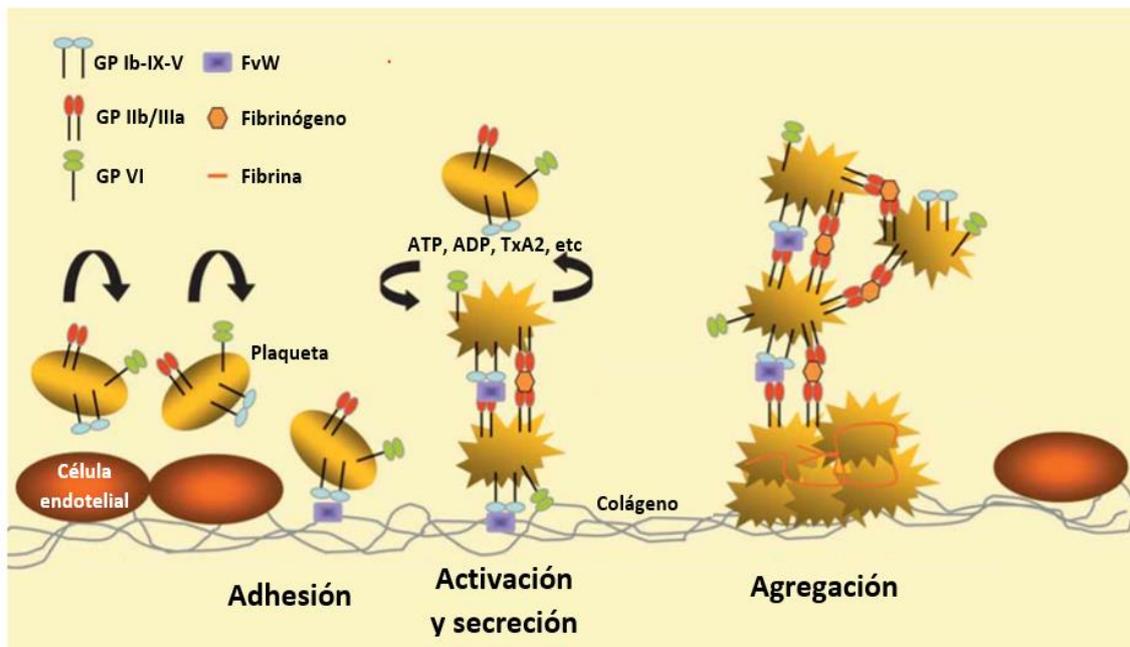
En un individuo sano, el equilibrio entre sistema hemostático y fibrinolítico es perfecto. Sin embargo, si el potencial coagulativo o hemostático sobrepasa al potencial fibrinolítico

puede producirse una trombosis, mientras que, si el equilibrio se torna en el sentido contrario, aumentará el riesgo de hemorragia.

### 1.2.1. Hemostasia primaria

Es el proceso de formación del tapón hemostático plaquetar, iniciado ante una lesión vascular y en el que intervienen estrechamente plaquetas y endotelio. En condiciones normales, las plaquetas no se adhieren al vaso sanguíneo, sin embargo, en presencia de lesión, el colágeno del subendotelio se expone a la luz del vaso, lo que produce la activación plaquetaria [75,76]. Los mecanismos que dan lugar a la formación del tapón plaquetario se ordenan en las siguientes fases: 1) adhesión, 2) activación y secreción, y 3) agregación (**Figura 2**).

En presencia de daño vascular, las plaquetas se unen al subendotelio o al tejido perivascular expuesto a la sangre. Este proceso inicial se llama adhesión plaquetaria. Aunque el endotelio tiene múltiples proteínas adhesivas, la más importante para la adhesión es el colágeno. La unión plaquetaria a las proteínas adhesivas depende de receptores específicos para cada proteína en la membrana de las plaquetas. El colágeno se une a las plaquetas mediante el receptor de membrana GPIb-IX-V, unión en la que interviene el factor von Willebrand (FvW) [77]. Al activarse, las plaquetas adoptan una forma más redondeada, desarrollan pseudópodos y, simultáneamente, secretan sustancias activas almacenadas en sus gránulos (adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), P-selectina, factor plaquetario 4, calcio, serotonina, tromboxano A2 (TxA2), factor V (FV) y VIII (FVIII), FvW, factor activador de plaquetas, fibrinógeno, etc) [78]. Algunas de estas sustancias, consideradas agonistas, aceleran la formación del coágulo plaquetario y la reparación tisular. También estimulan la unión interplaquetar y el reclutamiento de más plaquetas, este crecimiento del coágulo se conoce como agregación plaquetaria. En este punto, el coágulo es una masa de plaquetas degranuladas, unidas estrechamente y rodeadas de muy poca fibrina. Para la agregación es necesario el fibrinógeno, ya que actúa como puente interplaquetar, y su receptor, la GPIIb/IIIa [78]. La membrana de las plaquetas activadas también favorece y proporciona el ambiente ideal para acelerar la generación de fibrina, ya que posee fosfolípidos, muy importantes para la formación del coágulo definitivo al acelerar y localizar la activación de diversos factores de la coagulación en el lugar del daño vascular [79].



**Figura 2.** Esquema de la formación del tapón plaquetario (Modificado de Jennings LK, 2009).

### 1.2.2. Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria comprende la activación del sistema de la coagulación. Aunque existen diferentes teorías sobre la coagulación de la sangre desde la antigüedad, la idea o la hipótesis del proceso de coagulación como una cascada fue enunciada en 1964, casi simultáneamente, por MacFarlane en Reino Unido [80] y por Davie y Ratnoff en los Estados Unidos [81]. Esta cascada comporta una serie de activaciones proteolíticas de serin proteasas y cofactores que culminan en la generación de trombina y la conversión de fibrinógeno a fibrina (**Figura 3**).

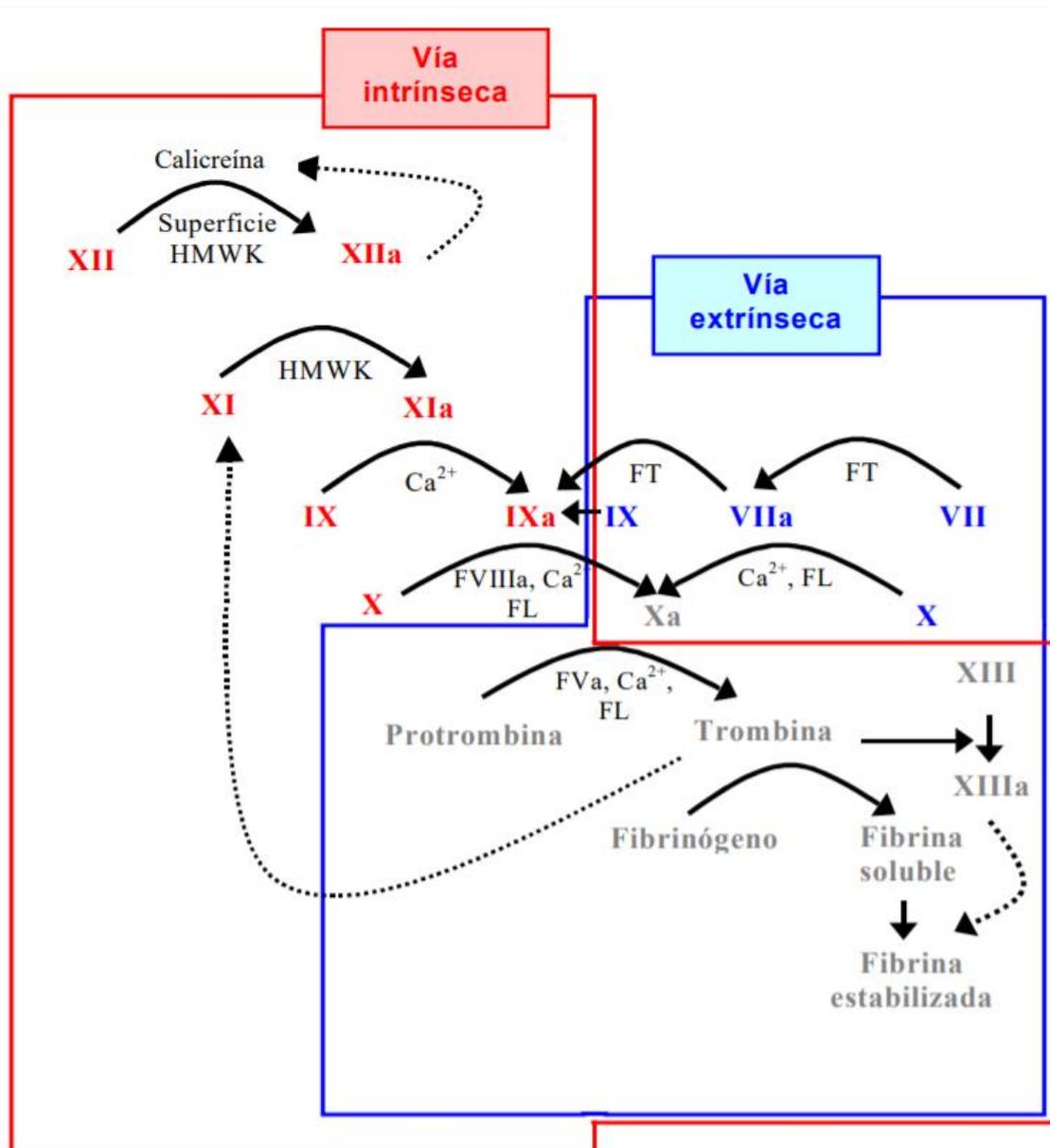
La cascada de la coagulación tiene dos vías iniciales que llevan a la formación de fibrina. Éstas son la vía de la fase de contacto (también llamada vía intrínseca) y la vía del factor tisular (FT) (también llamada vía extrínseca). Ambas vías convergen en la activación del factor X (FX) de la coagulación, que junto con el FV activado (FVa), formará el complejo protrombinasa, punto en el que comienza la vía común de la coagulación.

La vía intrínseca recibe su nombre porque se pensaba que la sangre era capaz de coagular intrínsecamente por esta vía sin necesidad de contar con la ayuda de factores externos. Actualmente se conoce que esto no es exactamente así. De hecho, la coagulación en esta vía comienza cuando, tras una lesión vascular, la sangre entra en contacto con la membrana basal del endotelio o el colágeno del tejido conectivo. En general, las

superficies polianiónicas pueden desencadenar esta reacción. La vía de contacto comienza con la formación del complejo formado por el quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK) y el factor XII (FXII) o de Hageman. De éstos, el FXII es el que actúa como verdadero activador, ya que a pesar de ser una proenzima, posee una pequeña actividad catalítica, suficiente para activar a la precalicreína convirtiéndola en calicreína. Esta calicreína es la encargada de activar al FXII. La actividad catalítica de la calicreína se ve potenciada por el HMWK. El FXIIa es el responsable de activar al factor XI (FXI), en presencia del HMWK. Una vez activado, el FXIa activa al factor IX (FIX), quién junto con el FVIIIa, que se encontraba unido al FvW circulante, forma el complejo tenasa, el encargado de activar al FX. Esta reacción requiere de la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfolípidos.

La vía extrínseca es muy rápida, se completa en apenas unos segundos y para que se inicie debe existir lesión endotelial que permita al plasma entrar en contacto con el FT. En condiciones fisiológicas, el FT está ausente en las células endoteliales y por tanto no expuesto al contacto con la sangre. Sin embargo, cuando se produce daño en un vaso, el FT de los fibroblastos entra en contacto con la sangre y se expresa en células endoteliales y monocitos. El FT presenta alta afinidad por el FVII y, en presencia de calcio y fosfolípidos de membrana, se produce la autoactivación del FVII y la formación del complejo FT/FVIIa. El complejo FT/FVIIa activa tanto al FIX como al FX y el propio FVII también resulta activado por la trombina generada, el FXIa, el FXII y el FXa.

La vía común de la coagulación es la vía en la que las vías in- y extrínseca confluyen en la activación del FX, el cual, junto con el FVa, formará el complejo protrombinasa, encargado de generar trombina a partir de la protrombina (Factor II o FII). Una vez producida, la trombina continúa la cascada de coagulación actuando sobre el fibrinógeno para producir monómeros de fibrina, los cuáles polimerizarán para formar el coágulo final, fortaleciendo el coágulo primario formado por las plaquetas. Además, se produce la activación del factor XIII (FXIII), el cuál actúa estabilizando el coágulo generando enlaces covalentes entre los monómeros de fibrina. Además de esto, sabemos que la trombina se encuentra presente desde el comienzo del proceso hemostático, cuando las plaquetas comienzan a formar el tapón primario, siendo el activador plaquetar más importante, además de activar también al FV y al FVIII e incluso participar en la activación de su inhibidor, la ProC.



**Figura 3.** Esquema de las vías de activación de la coagulación sanguínea.

### 1.2.3. Modelo clásico de la coagulación

Esta división de la cascada de coagulación en dos vías se define como el modelo clásico que se ha utilizado para explicar la coagulación durante décadas, pero tiene su origen en ensayos *in vitro* y pierde solidez cuando se estudia *in vivo*. Este modelo sigue siendo útil para explicar las pruebas de laboratorio empleadas para monitorizar la hemostasia, como el tiempo de protrombina (TP) para la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) para la intrínseca. Sin embargo, hay diversas cuestiones que no pueden ser explicadas con esta aproximación y a las que se les ha querido dar respuesta. Una de ellas es su incapacidad para explicar los distintos grados de tendencia a la hemorragia que

resultan de deficiencias de los diferentes componentes de las dos vías. El modelo clásico propone activaciones secuenciales, por lo que si alguno de los componentes fallara o estuviera ausente se asumiría la interrupción de la reacción. Y en algunos casos, sí existen factores esenciales, como el FVIII y el FIX en pacientes hemofílicos, o las deficiencias de FX, FV y FVIII que causan síndromes hemorrágicos graves. Sin embargo, la deficiencia de otros elementos de la misma vía, como el FXII, el HMWK o la precalicreína no causan sangrado clínico, y la de FXI puede cursar con hemorragia leve. De hecho, la deficiencia de FXII es totalmente asintomática *in vivo* y no produce ningún tipo de hemostasia anormal en los individuos que la padecen [82,83], a pesar de mostrar tendencias prohemorrágicas en pruebas *in vitro*. Otra cuestión fue el hecho de que el complejo FT/FVIIa no sólo activa al FX, sino que también lo hace con el FIX, produciendo una clara interrelación entre ambas vías y lo que llevó a la conclusión de que la vía extrínseca sería la de mayor relevancia fisiopatológica *in vivo* y la vía intrínseca tendría una importancia menor en la coagulación [84]. A pesar de esto, se piensa que la vía de contacto tiene una mayor implicación en los procesos de inflamación e inmunidad innata y en su conexión con la coagulación [85]. Además, este modelo no contemplaba la participación de las plaquetas ni de otras superficies celulares.

Varios modelos se han desarrollado en un intento de abordar el fenómeno de la hemostasia desde otra perspectiva. El más aceptado de ellos es el modelo celular de la coagulación desarrollado por Hoffman y Monroe en el 2001 [86], cuyo aspecto más importante es considerar a las células como elementos esenciales en el proceso de formación del coágulo. Este nuevo modelo rompe con el paradigma del modelo clásico, en el cual el papel de la célula era únicamente el de ofrecer una superficie de fosfolípidos donde los complejos procoagulantes podrían formarse. Además, pone en relieve la importancia de las plaquetas en todo el curso de la hemostasia.

### **1.2.4. Modelo celular de la coagulación**

De acuerdo con el modelo celular, la activación del sistema de coagulación se divide en tres fases: iniciación, amplificación y propagación (**Figura 4**).

#### **Iniciación**

Para que la hemostasia secundaria se inicie, debe existir lesión endotelial que permita al plasma entrar en contacto con el FT, presente en la membrana de células como fibroblastos o monocitos. En esta fase de iniciación, el FT y el FVII son los elementos

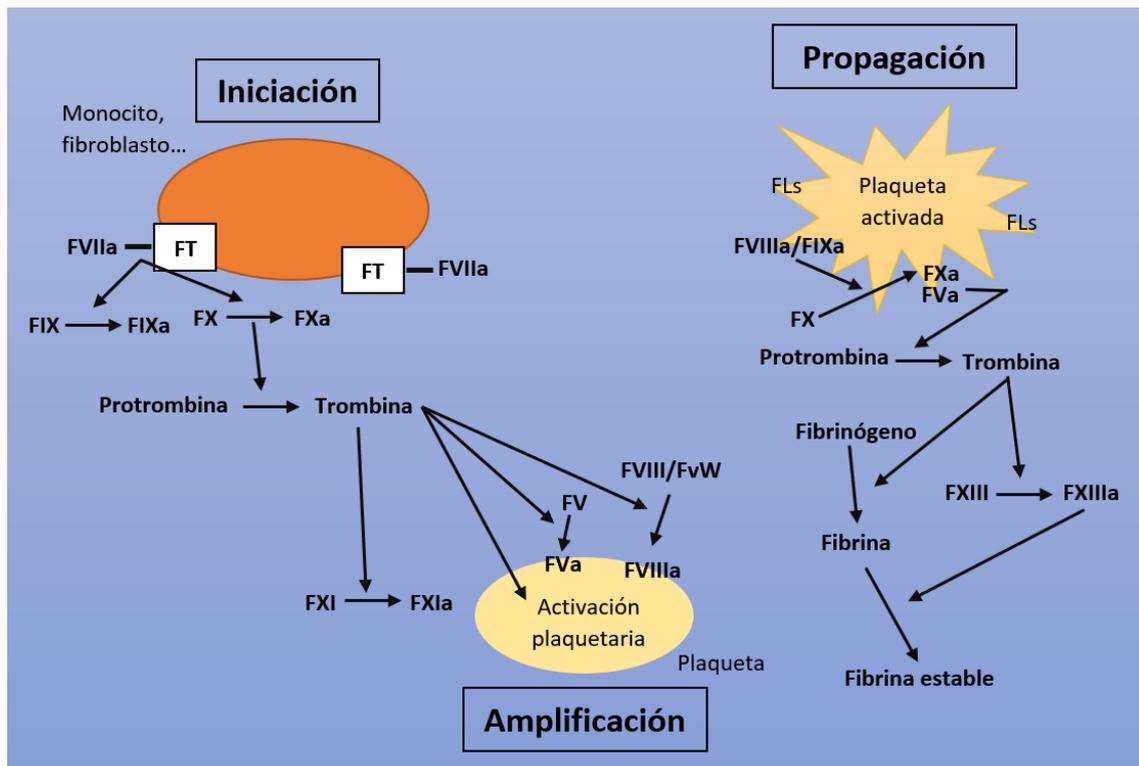
esenciales. El FVII es el único factor que circula en forma activada y no activada, representando la forma activa alrededor del 1% del total de factor presente en sangre. Una vez el FT entra en contacto con el torrente sanguíneo, el FVII se une estrechamente a él y se activa formando el complejo FT/FVIIa, el cuál activa al FX y al FIX. El complejo FT/FVIIa puede autoactivarse a sí mismo. El FXa, que permanece en la superficie celular, puede activar al FV y combinarse con él para producir pequeñas cantidades de trombina, importante para la activación plaquetaria y para la activación del FVIII durante la fase de amplificación.

### **Amplificación**

Las pequeñas cantidades de trombina generadas en la fase de iniciación tienen diversos efectos en la coagulación. Como ya se ha indicado, actúan como un potente activador plaquetario, a través de la vía de los receptores activados por proteasas (PAR, por sus siglas en inglés). Esta activación plaquetaria produce la exposición de sus fosfolípidos de membrana y la creación de una membrana procoagulante gracias a la liberación del contenido de sus gránulos. Entre las sustancias liberadas por los gránulos de la superficie plaquetaria, encontramos FV parcialmente activado, el cuál es completamente activado por la trombina y el FXa. Por otro lado, la trombina también actúa activando al FXI y escinde al FvW del FVIII para activarlo posteriormente. Además, las plaquetas reclutadas durante esta fase proporcionan los fosfolípidos de membrana necesarios para la fase de propagación.

### **Propagación**

En la fase de propagación se activan los factores X y IX, así como los cofactores V y VIII (activados por las pequeñas cantidades de trombina producidas en esta fase). Después, el FIXa junto con el FVIIIa se unen a la membrana de las plaquetas, formando el complejo tenasa, el encargado, en presencia de calcio, de activar al FX. La mayor parte del FXa se produce gracias a la acción del complejo tenasa y no a través de la activación del complejo FT/VIIa. El FXa se ensambla con el FVa para formar el complejo protrombinasa. Este complejo transforma la protrombina en trombina, aumentando rápidamente la cantidad de trombina generada, con la subsecuente producción de fibrina a partir del fibrinógeno y la formación del coágulo final. También se activa al FXIII, que actúa estabilizando el coágulo formado.



**Figura 4.** Modelo celular del sistema de la coagulación.

Los pacientes de hemofilia A (ausencia de FVIII) o de hemofilia B (ausencia de FIX) presentan un inicio de coagulación normal (dependiente del complejo FT/FVIIa), sin embargo, la fase de propagación se encuentra muy disminuida, lo que conduce a una mala formación del coágulo y son incapaces de realizar una hemostasia adecuada.

Por todo esto, el modelo celular actual propone que la coagulación depende de la exposición del FT subendotelial en el lugar de la lesión vascular y de su unión al FVII. Propone una única vía y pone en relieve la importancia de las membranas celulares, como la de las plaquetas, para el ensamblaje de las reacciones de la coagulación.

### 1.2.5. Anticoagulación y fibrinólisis

En un estado fisiológico normal, los mecanismos inhibitorios previenen el inicio patológico o la propagación de la coagulación y la limitan únicamente a las regiones vasculares dañadas.

El primero de estos mecanismos inhibitorios bloquea la iniciación, a través del inhibidor de la vía del FT (TFPI), producido por el endotelio sano, el cuál inhibe la actividad del complejo FT/FVIIa.

Otros mecanismos son capaces de bloquear la coagulación una vez iniciada. Es el caso de la AT, fisiológicamente activada por el heparán sulfato, un glicosaminoglicano de origen endotelial, y farmacológicamente por la heparina. La AT es la mayor proteasa inhibitoria, con una actividad principal contra el FXa y contra la trombina, pero también contra los factores XIIa, XIa y IXa.

Otro importante mecanismo de anticoagulación natural es la vía de la ProC. La ProC circula en forma de zimógeno y es activada, en la superficie de la célula endotelial, tras la formación del complejo cuaternario entre la trombina, la ProC, la trombomodulina (TM) (una glicoproteína de membrana presente en el endotelio sano) y el receptor endotelial de la PC (EPCR). Una vez activada, la ProC activada (APC) circula junto con su cofactor, la ProtS, y limita la amplificación y propagación de la cascada de coagulación al inhibir proteolíticamente a los factores Va y VIIIa, además de producir otras acciones anticoagulantes, antiinflamatorias y citoprotectoras [87-89]. La  $\alpha$ 1-antitripsina y la  $\alpha$ 2-macroglobulina son otras dos antiproteasas sanguíneas con acción anticoagulante, aunque con menor importancia que las anteriores.

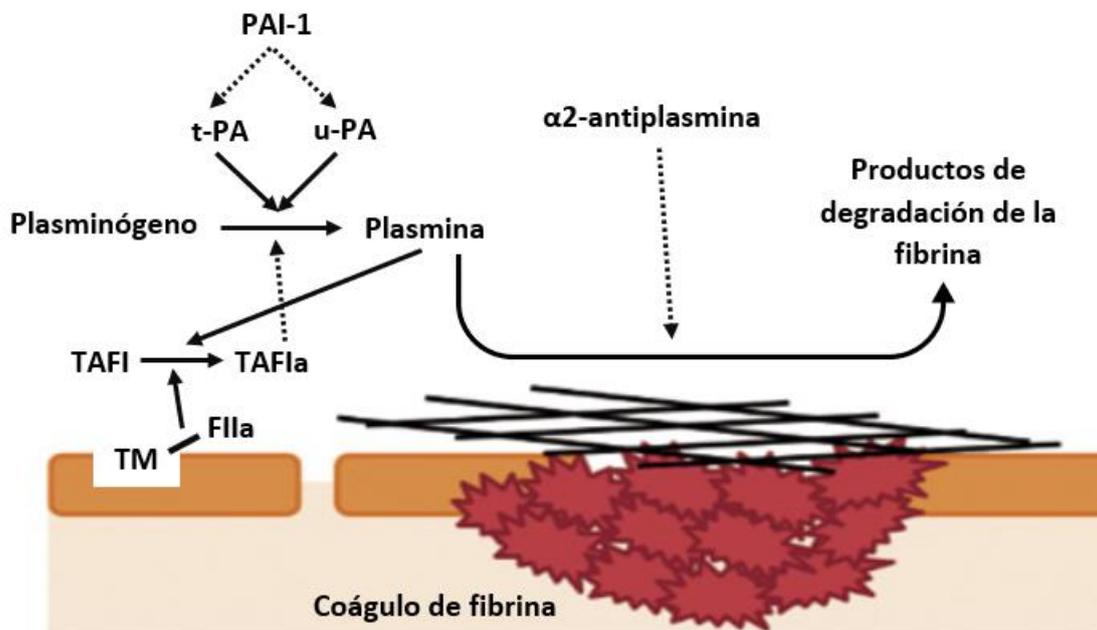
La agregación plaquetaria también es constantemente inhibida y regulada por productos secretados por el endotelio sano, tales como el óxido nítrico, la PGI<sub>2</sub> (prostaciclina que ejerce la función contraria al TxA<sub>2</sub>) y la ecto-ADPasa, que degrada el ADP circulante, y por tanto limitan la activación y formación del coágulo plaquetario.

Una vez formado el coágulo, la fibrinólisis mediada por plasmina es la responsable de disolverlo, tanto en etapas tardías después del daño vascular, como en trombosis patológicas (**Figura 5**). La trombina y la oclusión vascular inducen al endotelio a producir el activador tisular del plasminógeno (t-PA). Otro activador del plasminógeno, aunque de menor relevancia, es el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA), el cual es inducido por los factores de contacto (PK, HMWK y FXII). Estos activadores generan plasmina a partir del plasminógeno, la cual actúa proteolíticamente sobre la fibrina revirtiendo su polimerización y generando productos de degradación de la fibrina, como el dímero D. El t-PA y el plasminógeno se unen para envolver el polímero de fibrina, y una vez se genera la plasmina, ésta se une a la fibrina en sitios específicos donde lleva a cabo su actividad proteolítica y la disolución del coágulo.

En contraposición a los activadores del plasminógeno encontramos el inhibidor de fibrinólisis activado por trombina (TAFI), el cual puede ser activado por la plasmina y

por el complejo trombina/trombomodulina. El TAFI ejerce su actividad antifibrinolítica eliminando los residuos de lisina del extremo C-terminal de la fibrina, los cuáles son necesarios para la unión del plasminógeno y el t-PA a la red de fibrina.

Los activadores del plasminógeno (t-PA y u-PA) son regulados por el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), glicoproteína producida principalmente por el endotelio pero que también se almacena en las plaquetas y es liberada cuando éstas se activan, mientras que la plasmina circulante es rápidamente inhibida por la  $\alpha$ 2-antiplasmina, lo que evita una fibrinólisis sistémica [90,91].



**Figura 5.** Esquema del proceso de fibrinólisis. Las flechas continuas representan activación mientras que las flechas discontinuas representan inhibición.

La fibrinólisis es esencial para deshacer los coágulos durante el proceso de cicatrización y reparación del daño vascular, así como para disolver los coágulos intravasculares patológicos. Defectos o disfunciones en el sistema antifibrinolítico están asociados con un aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis o la trombosis.

### 1.3. Factores de riesgo

El TEV es una enfermedad multifactorial, en la que están implicados tanto factores de riesgo hereditarios como ambientales [92,93]. Entre los factores hereditarios, la carga genética se asocia con una alta heredabilidad, cercana al 60% [94]. Además, los eventos

de TEV pueden ser clasificados en provocados o no provocados según el paciente presente o no factores de riesgo conocidos. La proporción entre eventos provocados y no provocados varía mucho entre estudios, si bien el porcentaje de episodios de TEV no provocados suele oscilar entre el 20% y el 50% [3,96,97]. Esta clasificación entre eventos provocados o no provocados es de gran importancia para el seguimiento clínico y el tratamiento anticoagulante del paciente, ya que se ha visto que el riesgo de recurrencia trombotica aumenta en el caso de haber padecido un primer evento no provocado [42-45].

### **1.3.1. Factores de riesgo hereditario**

#### **1.3.1.1. Historia familiar**

Las personas con una historia de TEV en un pariente de primer grado tienen aproximadamente 2,5 veces más riesgo de TEV que la población general [99,100]. Estudios con hermanos adoptados y con hermanos de sangre viviendo en ambientes diferentes han demostrado que el aumento de riesgo de TEV en personas con historia familiar se debe a factores hereditarios y no a factores ambientales compartidos [101,102]. Solamente alrededor del 30% de esta heredabilidad puede ser explicada por los factores genéticos que conocemos [99], por lo que debe haber otros factores trombofílicos, aún por dilucidar, que aumenten este riesgo familiar de TEV.

#### **1.3.1.2. Raza**

Algunos estudios han demostrado que el riesgo de TEV varía dependiendo de la etnia de un individuo. En Estados Unidos, se ha observado que asiáticos, individuos originarios de las islas pacíficas e hispanos presentaban menores tasas de TEV que las personas caucásicas, mientras que la población afroamericana presentaba una incidencia incluso mayor, aproximadamente un 25% mayor que la población caucásica [103,104]. Otros dos estudios han demostrado que las tasas de TVP postquirúrgica y de TVP tras un ingreso en hospital, eran similares en países asiáticos y en países occidentales [105,106], aunque la tasa de TVP en China ha sido estimada de ser tan sólo de 0,17 por 1000 habitantes/año [107].

Esta menor incidencia de TEV en asiáticos e hispanos podría estar relacionada con una menor prevalencia de factores genéticos protrombóticos en estas poblaciones, como el FV Leiden (FVL), con una prevalencia en asiáticos del 0,5% que aumenta hasta el 5% en caucásicos [108-110]. La menor incidencia de TEV en hispanos comparada con la de

afroamericanos no puede ser explicada por la prevalencia de FVL, presente en alrededor del 2% de la población hispana y en menos de un 1% de los afroamericanos [108,111]. A pesar de esto, la población afroamericana presenta una prevalencia de historia familiar de TEV similar a la de la población caucásica [112], por lo que su mayor incidencia podría ser explicada por la presencia de variantes genéticas protrombóticas aún no identificadas.

### **1.3.1.3. Grupo sanguíneo ABO**

El grupo sanguíneo ABO determina los antígenos que expresan los glóbulos rojos de un individuo en su superficie, lo que implica también la presencia o ausencia de anticuerpos contra estos antígenos en sangre. Hay 4 fenotipos posibles: A, B, AB y 0.

Se ha observado un efecto protector frente al TEV por parte del grupo sanguíneo 0, con un riesgo estimado 2 veces menor comparado con personas de grupo A, B o AB [113-115]. No se sabe con exactitud a qué se debe este efecto protector del grupo 0, pero una posible explicación sería el hecho de que las personas que no poseen este fenotipo presentan niveles mayores de FvW, actor importante en la hemostasia primaria y que también actúa como proteína transportadora del FVIII previniendo su degradación [116,117].

### **1.3.1.4. Desórdenes genéticos en proteínas de la coagulación**

En cuanto a los desórdenes trombofílicos que afectan a proteínas involucradas en la coagulación, podemos dividirlos en desórdenes de pérdida de función y desórdenes de ganancia de función.

#### **1.3.1.4.1. Desórdenes de pérdida de función**

##### **1.3.1.4.1.1. Deficiencia de antitrombina**

La AT es la mayor proteasa inhibitoria de la coagulación, con una actividad principal contra el FXa y contra la trombina, pero también contra los factores XIIa, XIa y IXa. La deficiencia de AT es un desorden autosómico dominante que, dependiendo del tipo de deficiencia, conlleva déficits cuantitativos o funcionales de esta proteasa. En la deficiencia de tipo I, tanto los niveles antigénicos como la actividad funcional de la AT están reducidos en sangre y está causada por un gran número de mutaciones distintas. La deficiencia de tipo II está causada por un defecto molecular en la proteína y, mientras que su actividad inmunológica es normal, su actividad funcional está marcadamente reducida, lo que aumenta el riesgo trombótico. En la deficiencia tipo III, tanto los niveles antigénicos como la actividad funcional de la AT son normales, pero existe un defecto en

su sitio de unión a la heparina que disminuye la eficiencia de interacción con su cofactor [118]. Este tipo de deficiencia es rara, con una prevalencia aproximada de 0,02-0,04 % en caucásicos [118] y se asocia con un incremento de riesgo de TEV de 14 veces respecto a la población general [119]. En estudios prospectivos, el riesgo anual de TEV en individuos con deficiencia de AT aumentaba un 2% respecto al de la población general [119].

#### **1.3.1.4.1.2. Deficiencia de proteína C**

La vía de la ProC es uno de los sistemas anticoagulantes naturales más importantes de la cascada de coagulación. La ProC es activada por el complejo trombina-TM y una vez activada actúa, junto con su cofactor la ProS, inhibiendo a los factores Va y VIIIa. A pesar de tener una baja prevalencia, menor al 1% en la población general, existe un gran número de mutaciones en el gen *PROC* que producen deficiencia de PC [118], en cuyo descubrimiento ha desarrollado una gran labor nuestro laboratorio [120]. Existen dos tipos de deficiencia de ProC: en las de tipo I, la más común, los portadores presentan niveles reducidos de ProC en sangre mientras que, en las de tipo II, los niveles de PC son normales pero su actividad anticoagulante está disminuida. A pesar de la elevada variabilidad en cuanto a los distintos fenotipos producidos por las deficiencias de ProC, se estima que el riesgo estimado de TEV en sus portadores heterocigotos es de entre 4 y 8 veces superior al de la población general [121,122].

#### **1.3.1.4.1.3. Deficiencia de proteína S**

La ProS ejerce su función anticoagulante actuando como cofactor de la APC. Al igual que ocurre con la ProC, la deficiencia de ProS puede estar causada por una gran cantidad de mutaciones diferentes. Estas mutaciones, producidas en alguno de los dos genes homólogos de la ProS (*PROS1* y *PROS2*), pueden dar lugar a tres tipos de fenotipos diferentes: la deficiencia de tipo I, la más común y asociada a unos niveles de ProS total en torno al 50% de los normales y una marcada disminución tanto en los niveles de ProS libre como de su actividad funcional; la de tipo II, caracterizada por niveles de ProS total y libre normales pero una actividad funcional reducida; y la de tipo III, caracterizada por una concentración normal de ProS total pero niveles reducidos de PS libre y una actividad funcional en torno al 40% [118]. Estas mutaciones también son raras, con una prevalencia de 1-5 por 1000 habitantes y la deficiencia de ProS está asociada a un aumento de unas 8-10 veces en el riesgo de TEV [121,122].

### **1.3.1.4.2. Desórdenes de ganancia de función**

#### **1.3.1.4.2.1. Factor V Leiden**

Está producido por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) con cambio de sentido en el gen del FV, que lleva a un cambio de arginina por glutamina, el cual proporciona al FVa resistencia a la acción anticoagulante de la APC. Esto produce un aumento de actividad del FVa y por tanto un aumento del riesgo trombótico. Fue descubierto por Bertina et al [123] en 1994 y tiene una prevalencia aproximada del 5% en la población caucásica [124]. Se estima que el FVL aumenta el riesgo de TEV alrededor de 4-8 veces en personas heterocigotas [123]. La prevalencia de portadores homocigotos en la población caucásica es aproximadamente de 1 cada 5000 individuos [125] y se asocia con un riesgo de TEV de 50 a 80 veces mayor que la población general [123,126].

#### **1.3.1.4.2.2. Mutación en el gen de la protrombina**

La protrombina (FII) es la precursora de la trombina, la cual presenta actividades procoagulantes, anticoagulantes y antifibrinolíticas, por lo que un desorden en esta proteína resulta en múltiples desequilibrios en la hemostasia. En 1996, Poort et al [127], estudiando 28 familias con historia de TEV, descubrieron un SNP en la región 3'-UTR (*untranslated region*) del gen que codifica la protrombina, en el cual se sustituía una guanina por una adenina en el nucleótido 20210. Esta sustitución se correlacionaba con niveles más altos de protrombina en sangre, alrededor del 30% más que la población general, y con un riesgo de TEV 2,8 veces mayor en heterocigotos [127]. En cuanto a su prevalencia, se estima que está entre el 0,7% y el 4% en caucásicos [128], mientras que su presencia en la raza negra y asiática es mucho más baja [129].

#### **1.3.1.4.3. Otros desórdenes en proteínas de la coagulación**

Niveles elevados de muchos otros factores procoagulantes (FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, fibrinógeno y FvW) han sido asociados con un mayor riesgo de TEV [130-136], aunque el papel de la variación genética en estas asociaciones no se conoce con profundidad. Por el contrario, niveles altos de FV, FXII y FXIII no han demostrado tener una clara relación con el riesgo trombótico [137,138].

En un estudio caso-control reciente con 2.377 pacientes diagnosticados de TEV y 2.940 controles, se evaluó la asociación entre los niveles de 8 factores de la coagulación en sangre (FII, FVII, FVIII, FIX, FX, FXI, fibrinógeno y FvW) y el riesgo de TEV. Se

observó que niveles elevados de todos ellos aumentaban el riesgo de TEV, y que el FVIII y el FvW eran los que mostraban una asociación más fuerte [139].

Otro ejemplo de trombofilia asociada a ganancia de función fue la descubierta por Simioni et al [140] en una familia de la ciudad italiana de Padua, a través de un paciente de 23 años diagnosticado de TVP. Ellos encontraron una sustitución de una arginina por una leucina en la posición 338 del FIX. En este caso, los niveles de FIX en sangre eran normales, sin embargo, su actividad era de 8 veces mayor que la normal. Esto producía una activación acelerada de FX, llevando a un aumento del riesgo trombótico. Simioni et al denominaron a esta variante FIX Padua y estudios recientes sugieren que este aumento en la actividad del factor IX se debe a una mejor unión con su cofactor en el complejo tenasa, el FVIIIa [141].

Cabe destacar también la importancia de un SNP ubicado en la posición 10034 de *FGG*, uno de los 3 genes del fibrinógeno, y que produce el cambio de una citosina por una timina, el cual causa niveles reducidos en plasma de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno. Esta variante está presente en un 6% de la población y está asociada a un riesgo trombótico de dos veces más que los no portadores [142].

Otro SNP en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) también ha sido asociado con el riesgo de TEV. La variante C>T en la posición 677 (rs1801133) tiene una prevalencia aproximada del 10% en homocigosis y causa niveles elevados de homocisteína en sangre [143]. Una gran cantidad de estudios han evaluado el papel de este polimorfismo en el riesgo de TEV y encontramos resultados tan variables que van desde que aumenta el riesgo de TEV 2,5 veces respecto a la población general hasta que no tiene ninguna asociación con la enfermedad tromboembólica venosa, o que incluso solamente aumenta el riesgo trombótico en presencia de otras alteraciones trombofílicas, por lo que su implicación en el TEV sigue siendo controvertida [144-149].

Muchos otros SNPs han sido asociados con el riesgo de TEV gracias a los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés). Estos SNPs han sido encontrados principalmente en genes o cerca de genes que codifican proteínas relacionadas con la coagulación [150]. La mayoría de estos polimorfismos, por sí solos, tienen un efecto modesto en el riesgo de TEV, pero el testeo múltiple de muchos de ellos en paneles de secuenciación podría mejorar la capacidad predictiva del riesgo de enfermedad tromboembólica venosa en un individuo concreto.

### **1.3.2. Factores de riesgo adquiridos**

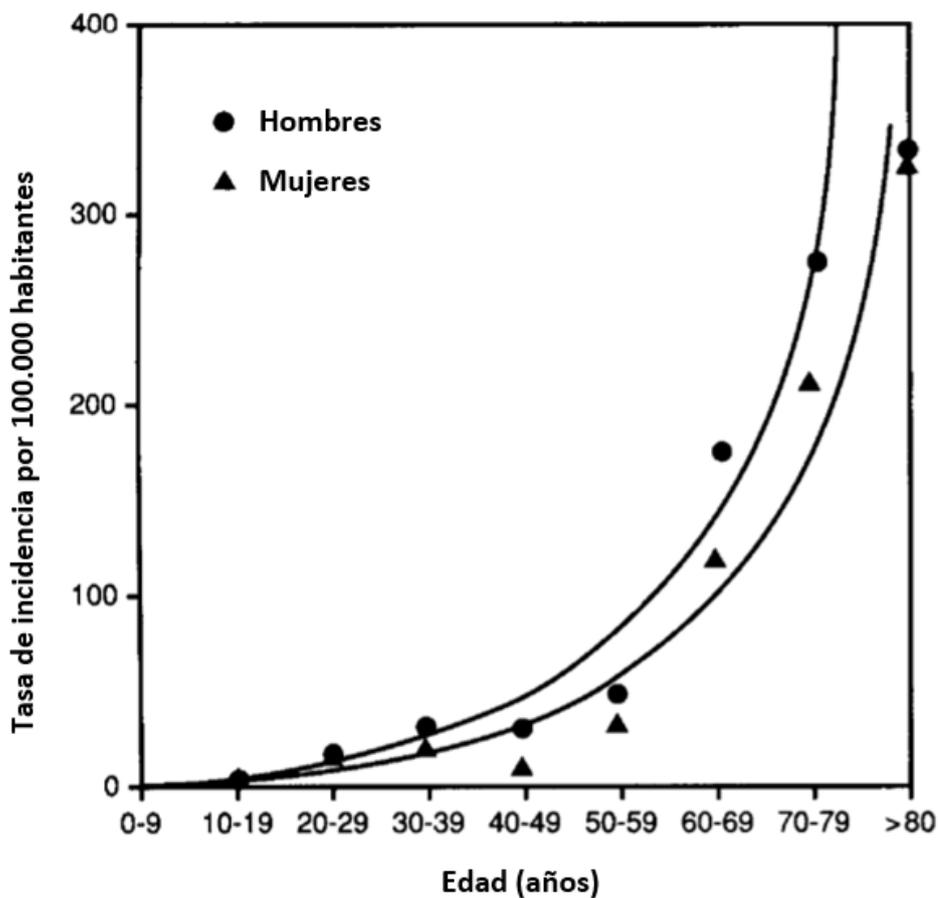
#### **1.3.2.1. Edad**

Existe una gran evidencia de la influencia de la edad en el riesgo de TEV. La incidencia de TEV aumenta exponencialmente desde una tasa de <5 casos por 100.000 habitantes/año en menores de 15 años hasta valores en el rango de 450-600 casos por 100.000 habitantes/año en individuos mayores de 80 años [4,12]. Hansson et al observaron una incidencia de 132 casos por 1000.000 habitantes/año en población entre los 50 y los 59 años de edad, mientras que en individuos de entre 70 y 79 años, la incidencia aumentaba hasta los 522 casos por 100.000 habitantes/año [151]. Naess et al demostraron que la probabilidad de desarrollar un episodio de TEV era de más del triple en personas mayores de 70 años que en individuos entre 45 y 69 años y 9 veces mayor que en personas de entre 20 y 44 años [3]. Las razones de este incremento de la incidencia de TEV con la edad no han sido completamente esclarecidas, si bien se cree que es debida a una acumulación de factores de riesgo ambientales clásicos, como la inmovilidad, cirugía, enfermedades concomitantes, etc. Además, la fuerza muscular general disminuye con el envejecimiento, lo que también afecta a las bombas musculares presentes en la vasculatura y en su eficacia para favorecer el retorno venoso. También existen cambios vasculares relacionados con la edad, como son la dilatación de la pared venosa y la disfunción valvular, lo que lleva a un aumento de la estasis venosa y de la presión venosa distal [152-155]. El envejecimiento también se ha asociado con cambios en los niveles de factores de la coagulación, como por ejemplo el FVIII o el FVIIa, cuyos niveles aumentan con la edad [156,157].

#### **1.3.2.2. Género**

A pesar de que el género es una característica epidemiológica esencial y tiene influencia sobre el riesgo en gran cantidad de enfermedades, su papel en el TEV no ha sido completamente caracterizado. El género masculino sí se ha asociado con un aumento del riesgo de recurrencia [158], pero la relación entre el género y el riesgo de TEV incidente está menos definida y varía dependiendo de si incluimos en el análisis factores de riesgo reproductivos y hormonales [159]. Silverstein et al mostraron una incidencia más alta en mujeres jóvenes que, sin embargo, se invertía hacia una incidencia mayor en hombres cuando la edad era más avanzada [12]. Anderson et al, como podemos ver en la **figura 6**, encontraron incidencias de TEV similares entre hombres y mujeres en la población joven, pero conforme aumentaba la edad, la incidencia cada vez era mayor en hombres [4].

Cushman et al hallaron incidencias similares para ambos sexos excepto para individuos mayores de 75 años, donde los hombres presentaban una tasa de TEV del doble que las mujeres [160], y Nordstrom et al no encontraron diferencias en la incidencia de TVP entre ambos sexos [161]. White et al advirtieron tasas más altas de TEV en mujeres que en hombres, hecho que fue debido principalmente a la mayor incidencia en mujeres en personas mayores de 80 años [103]. Marshall et al, analizando los datos de más de 100.000 pacientes de TEV no hallaron diferencias en cuanto a la mortalidad asociada al género [162]. Como vemos, los datos son muy variables e inconsistentes por lo que es probable que la incidencia de TEV sea similar entre hombres y mujeres.



**Figura 6.** Tasa de incidencia de TEV por 100.000 habitantes en función de la edad y separado por género (Anderson FA et al, 1991).

### 1.3.2.3. Obesidad

La obesidad está definida por un IMC  $> 30 \text{ kg/m}^2$  y está asociada con gran cantidad de enfermedades cardiovasculares [163,164]. En cuanto a su efecto en el TEV, se ha demostrado que la presencia de obesidad aumenta el riesgo de TEV entre 2 y 3 veces respecto a personas con normopeso [165-167], y que este riesgo es incluso mayor en personas con obesidad severa (IMC  $> 40 \text{ kg/m}^2$ ). Estudios de dinámica de flujo sanguíneo mostraron diferencias en las venas profundas de personas obesas, con un aumento significativo del diámetro de la vena femoral respecto a personas con normopeso [168]. Esto podría ser explicado por un aumento de la presión intraabdominal, lo que llevaría a una distensión de la pared venosa, produciendo un aumento de la estasis y una velocidad de flujo sanguíneo reducida en personas obesas [169]. También se ha demostrado que el tejido adiposo sintetiza diversas sustancias proinflamatorias y antifibrinolíticas, como el PAI-1 [170], lo que favorecería un estado de hipercoagulación [171]. Niveles más elevados de fibrinógeno y de algunos factores de la coagulación se han observado en personas obesas [172] y también se ha asociado la obesidad con un aumento de la actividad plaquetaria [173]. En un estudio caso-control reciente, se observó una clara asociación entre la obesidad y la incidencia de TVP, sin embargo, la tasa de mortalidad era significativamente más elevada en personas con normopeso que en personas obesas [174]. Esto nos podría indicar la influencia, en la enfermedad trombótica, del fenómeno de la paradoja de la obesidad, una hipótesis médica que sostiene que la obesidad puede, de forma contradictoria, ser protectora y asociarse con una mayor supervivencia en ciertos grupos de personas, como los individuos muy ancianos o aquellos con ciertas enfermedades crónicas [175,176].

### 1.3.2.4. Síndrome antifosfolípido

El SAF es originado por la producción de un grupo heterogéneo de autoanticuerpos, los cuáles reconocen fosfolípidos presentes en las membranas celulares, complejos fosfolípido-proteína o incluso proteínas con alta afinidad por los fosfolípidos, como la  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI) y la protrombina. Aunque existe un amplio espectro de autoanticuerpos, se suelen clasificar en tres grupos: anticuerpos anticardiolipinas (anti-CLs), anticoagulante lúpico (AL), y anticuerpos  $\beta$ 2-glicoproteína I (anti- $\beta$ 2GPIs). El término "síndrome antifosfolípido primario" se utiliza cuando el SAF aparece en ausencia de otras enfermedades autoinmunitarias, mientras que el término "síndrome antifosfolípido secundario" se utiliza cuando el SAF aparece en el marco de otras

enfermedades autoinmunitarias, siendo el lupus eritematoso sistémico la más común [177]. Estos autoanticuerpos interfieren con los mecanismos fisiológicos de la coagulación y la fibrinólisis, llevando el equilibrio hemostático hacia un estado procoagulante, y su relación con la trombosis venosa y arterial ha sido bien definida [178,179]. En la población sana, la incidencia del SAF es de entre el 1% y el 5% y es más frecuente en mujeres jóvenes [180], siendo causante en muchos casos de abortos y otros problemas obstétricos [181]. La trombosis venosa es la manifestación clínica más común del SAF. Un reciente metaanálisis que estudió la relación entre el AL y los anti-CLs con la trombosis venosa concluyó que todos los estudios reportaban una asociación significativa entre el AL y el TEV, con un riesgo de hasta 16 veces mayor para los pacientes con AL. Sin embargo, la relación entre los anti-CLs y la enfermedad tromboembólica venosa no fue confirmada [182]. La presencia de anti- $\beta$ 2GPIs se ha asociado con un aumento de 5 veces del riesgo de TEV [183]. En dos estudios prospectivos caso-control se observó que no existía asociación entre la presencia de anticuerpos anti-CLs y la incidencia de TEV [184,185]. El mecanismo fisiopatológico por el que el SAF produce este estado procoagulante no está del todo resuelto, si bien es cierto que se ha visto que los autoanticuerpos producidos interaccionan con gran cantidad de proteínas involucradas en la coagulación, entre ellas, la protrombina [186,187], la  $\beta$ 2GPI [188,189], la APC [190], la PS [190], el HMWK [191], el t-PA [192], el FXII [193], el FVII/VIIa [194] y el FXa [195] entre otros. Además, se ha demostrado que los pacientes con SAF tienen unos mayores niveles de activación plaquetaria [196] así como una mayor activación de las células endoteliales [197].

### **1.3.2.5. Tabaco**

Muchos estudios han demostrado la relación entre el tabaco y el riesgo de TEV [198,199]. Además, este incremento del riesgo en fumadores parece ser dosis-dependiente, aumentando en función del número de cigarrillos fumados al día [200-202]. La fisiopatología de esta relación no ha sido del todo esclarecida, sin embargo, se han observado cambios en diversos mecanismos hemostáticos en personas fumadoras, entre ellos, alteraciones en los niveles de diversos factores de la coagulación y fibrinolíticos y desórdenes en la actividad plaquetaria [203-205]. Se piensa que parte de esta relación entre el tabaco y el riesgo de TEV podría estar mediada por enfermedades secundarias relacionadas con el tabaco, la más importante de ellas, el cáncer [204,206,207].

### 1.3.2.6. Cáncer

La conexión entre cáncer y trombosis existe desde hace más de 150 años, cuando Armand Trousseau sugirió una posible relación entre ambas enfermedades [208]. Durante todo este tiempo, se ha demostrado que el TEV es una complicación común en pacientes oncológicos y representa una importante causa de morbilidad y mortalidad. Alrededor del 20% del total de episodios de TEV corresponden a pacientes oncológicos [209,210], siendo más frecuente en pacientes con cáncer de cerebro, páncreas, ovario, colon, estómago, pulmón, riñón o huesos [211,212], y en pacientes con metástasis [212]. Los tratamientos anticancerígenos, como la quimioterapia o la terapia hormonal, también se asocian con un mayor riesgo de TEV [213-218]. Además, el TEV es un marcador de cáncer oculto [219], y hasta un 10% de pacientes con un primer episodio son diagnosticados de cáncer antes de que transcurra un año [220,221]. A pesar de la conocida relación entre cáncer y TEV, los mecanismos fisiopatológicos que promueven la trombosis en pacientes oncológicos no están claros y parecen ser muy heterogéneos [222].

La activación directa de la coagulación y de las plaquetas puede ocurrir a través de muchos factores expresados en la membrana o secretados por las células tumorales [223]. De éstos, el mejor caracterizado es el FT, el cual se expresa en la membrana de las células cancerígenas, pero también en las micropartículas liberadas por éstas [224,225], las cuáles se han asociado a un aumento en el riesgo de TEV en personas con cáncer [223]. Estas micropartículas también pueden participar directa o indirectamente en la generación de un ambiente protrombótico, ya que además de FT en su membrana, pueden poseer fosfatidilserina (PS), la cual aporta una superficie de carga negativa que favorece el ensamblaje de los complejos de coagulación [226]. También se ha demostrado que las micropartículas positivas en FT promueven la activación plaquetaria y favorecen la trombosis en ratones [224]. Por otra parte, los fibroblastos asociados al cáncer producen podoplanina, una proteína que causa la activación y agregación de las plaquetas [227,228]. Además, niveles aumentados de PAI-1 en sangre se han observado en pacientes oncológicos, lo que se traduce en una menor actividad fibrinolítica y un mayor riesgo de TEV [229]. En esta línea, también se ha observado como el efecto trombótico inducido por bevacizumab, un anticuerpo monoclonal antineoplásico, se veía considerablemente reducido por un inhibidor del PAI-1, lo que refuerza el papel de PAI-1 en la trombosis asociada al cáncer [230]. Otros estudios han observado niveles elevados de trombina en algunos tipos de cáncer [231] y de otros agonistas plaquetarios, como el

ADP [232]. Las células tumorales también son capaces de secretar citoquinas proinflamatorias, así como moléculas de adhesión, que pueden causar la activación plaquetaria y promover un fenotipo procoagulante [233,234]. Por último, y de forma más reciente, se ha descrito que, en presencia de factores tumorales, los neutrófilos secretan las denominadas trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés), cuya implicación en la trombosis ha sido ampliamente demostrada [235-238]. Los NETs sirven como un andamio que puede atrapar físicamente a las plaquetas y activarlas, promoviendo también la deposición de fibrina y favoreciendo la formación de coágulos. Los tumores también generan un microambiente altamente hipóxico, lo que promueve la disfunción endotelial y la secreción de agonistas plaquetarios [239] y muchas células tumorales producen el denominado procoagulante del cáncer, una cisteín-proteasa capaz de activar al FX [240,241].

Además de todos estos mecanismos que producen un estado hipercoagulante del paciente oncológico, en muchos casos se dan otras situaciones que aumentan la estasis venosa, incrementando aún más el riesgo trombótico, como son la compresión vascular en pacientes con masas tumorales voluminosas, la inmovilización en cama o un proceso quirúrgico [242].

### **1.3.2.7. Hospitalización**

El factor de riesgo adquirido transitorio más común en pacientes con TEV es la hospitalización. De hecho, hasta un 60% de los casos de TEV ocurre durante un periodo de hospitalización o en los 90 días posteriores, lo que convierte a esta enfermedad en la principal causa evitable de muerte en hospitales [209].

En un estudio caso-control realizado en 2019, un periodo de hospitalización sin inmovilización aumentaba el riesgo de TEV 6 veces, mientras que si la hospitalización también incluía inmovilización el riesgo de TEV llegaba a ser de hasta 20 veces mayor que en la población general. Además, el riesgo aumentaba ligeramente con el total de días pasados en el hospital y con el número de hospitalizaciones acumuladas [243]. En un estudio anterior, la incidencia de TEV entre personas hospitalizadas fue de hasta 100 veces mayor que en la población general [244].

Por otro lado, el TEV hospitalario se asocia a una mayor frecuencia de embolismo pulmonar mortal y a una mayor mortalidad global [245]. En este sentido, también se ha descrito que la frecuencia de TEP mortal es mayor en los pacientes hospitalizados por

patología médica frente a aquellos que lo están por intervención quirúrgica [246]. Este peor pronóstico del TEV hospitalario, y del ingreso médico frente al quirúrgico, podría estar explicado por el mayor grado de comorbilidades y la peor situación clínica de los pacientes hospitalizados [247]. Los resultados de dos grandes estudios transversales epidemiológicos indicaron que entre un 41% y un 52% de los pacientes hospitalizados por patología médica presentan un riesgo moderado o alto de desarrollar TEV [245,246]. En la misma línea, tres grandes ensayos clínicos pusieron de manifiesto la eficacia de la instauración de trombopprofilaxis en pacientes hospitalizados por motivos médicos, demostrando una reducción relativa del riesgo de desarrollar episodios tromboembólicos que osciló entre el 45% y el 63% [245,246,248]. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de la identificación de los pacientes hospitalizados que presenten un elevado riesgo de TEV, con la finalidad de proporcionarles una trombopprofilaxis segura y efectiva.

### **1.3.2.8. Cirugía**

La cirugía es otro importante factor de riesgo adquirido transitorio de TEV. Un estudio caso-control mostró, en personas que habían tenido una intervención quirúrgica con anestesia durante los últimos tres meses, un riesgo de TEV 22 veces mayor que la población general [249]. El efecto de la cirugía en el riesgo de TEV va disminuyendo con el tiempo, pero sigue teniendo influencia hasta al menos un año después del procedimiento. El riesgo de TEV es más alto en pacientes que se someten a una intervención con ingreso hospitalario respecto a una intervención ambulatoria [250], y la duración de la operación está asociada positivamente con el riesgo de TEV [251]. El riesgo de TEV también varía dependiendo del tipo de cirugía, siendo la neurocirugía, la cirugía ortopédica de miembros inferiores y las cirugías torácicas y abdominales las que presentan un mayor riesgo trombótico [250,252].

### **1.3.2.9. Traumatismo**

La existencia de traumatismos severos o fracturas se asocia con un aumento del riesgo de TEV de entre 4,5 y 12 veces respecto a la población general [249,253]. La mortalidad en pacientes hospitalizados por traumatismo parece estar significativamente aumentada por la existencia de TEV [254], y lesiones menores en las piernas (que no requieren cirugía, inmovilización ortopédica o reposo prolongado en cama) también se asocian con un mayor riesgo trombótico [255]. Los traumatismos y fracturas en miembros inferiores, pelvis y médula espinal parecen ser los que producen un mayor aumento de TEV [256],

por lo que una adecuada evaluación y una tromboprolifaxis efectiva son necesarias para disminuir la incidencia de eventos trombóticos en estos pacientes.

#### **1.3.2.10. Inmovilización**

La inmovilización es otro factor de riesgo importante de TEV, presumiblemente debido al aumento de la estasis del flujo sanguíneo en el sistema venoso. Las situaciones más comunes de inmovilización incluyen reposo en cama (de una duración de al menos 4 días), vendaje o yeso en articulaciones y paresia de miembros inferiores debido a afecciones neurológicas. Precisamente, un estudio caso-control mostró que este tipo de pacientes con enfermedad neurológica y paresia de piernas tenían 6 veces más riesgo de padecer TEV que la población general [253]. Otro estudio similar mostró que hasta el 15% de los pacientes que habían estado encamados más de una semana antes de la muerte presentaban trombosis venosa cuando se les hizo la autopsia, y que este porcentaje rozaba el 80% después de un periodo prolongado en cama [257]. Warlow et al observaron, en un estudio realizado en pacientes con hemiplejía derivada de ictus, la presencia de TVP asintomática en el 60% de las extremidades paralizadas, en comparación con un 7% de presencia de TVP en las extremidades no paralizadas [258].

Los viajes de larga duración también suponen situaciones de riesgo de TEV por la inmovilización de miembros inferiores. En un estudio de 231 sujetos sin historia de TEV, los cuales embarcaron en vuelos de más de 8 horas de duración, observaron que ninguno de los individuos que vestía medias de compresión tuvo evidencia de TVP tras el viaje, mientras que el 10% de aquellos que no las llevaban desarrollaron TVP asintomática [259]. Además, se ha visto que el riesgo de TEV es similar en personas que viajan en avión, tren, coche o autobús [260], y que ver la televisión, actividad que puede ser utilizada como medidor de un comportamiento sedentario y de inmovilización, también se ha asociado con el riesgo de TEV siguiendo un patrón dosis-dependiente [261].

#### **1.3.2.11. Catéteres venosos**

La presencia de catéteres venosos o marcapasos se asocia con hasta el 9% de todos los episodios de TEV incidente que se producen [209] y se ha visto que aumenta el riesgo de TEV 5,6 veces respecto a la población general [249]. El riesgo de TEV varía dependiendo del tipo de catéter, del material y del lugar dentro del sistema venoso donde esté insertado [262-264].

### **1.3.2.12. Embarazo y puerperio**

La tasa de incidencia de TEV asociada a embarazo se encuentra alrededor de los 200 eventos por cada 100.000 mujeres/año, un riesgo relativo de 4 veces más respecto a mujeres no embarazadas en edad fértil [265,266]. El riesgo de TEV durante el puerperio es alrededor de 5 veces más alto que durante el embarazo [265]. En un estudio hecho en Suecia que trataba de evaluar la incidencia de la mortalidad materna durante el embarazo, el parto y el puerperio, el TEP fue la principal causa de muerte materna después del parto, con alrededor de un evento de TEP por cada 1.000 nacimientos y alrededor de una muerte por TEP por cada 100.000 nacimientos [267].

La mayor prevalencia de TEV en mujeres embarazadas podría ser explicada por los cambios fisiológicos que se producen en muchas proteínas involucradas en la coagulación. Durante el embarazo, los niveles de algunos factores de la coagulación aumentan, algunos parámetros clínicos que se utilizan para evaluar el equilibrio hemostático de un individuo se tornan hacia el lado procoagulante, las concentraciones de anticoagulantes naturales disminuyen y los niveles de proteínas involucradas en la fibrinólisis también se desregulan [268,269]. Estos cambios tan significativos generan un estado de hipercoagulación en la mujer embarazada que parecen ser una respuesta fisiológica para mantener una función placentaria normal y reducir el riesgo de hemorragia masiva durante el parto [270].

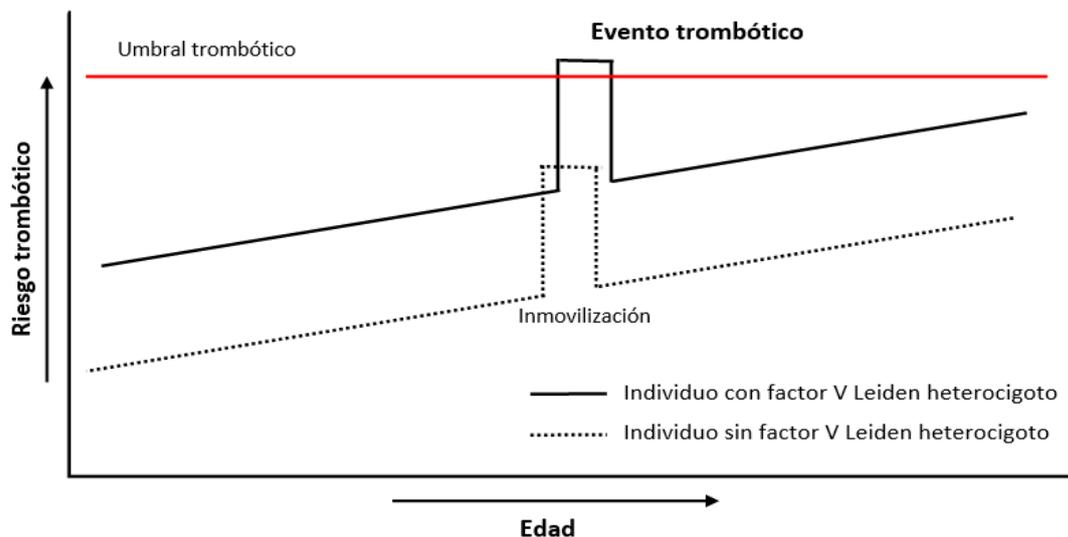
### **1.3.2.13. Anticonceptivos orales y terapia hormonal**

El uso de anticonceptivos orales (ACOs) en mujeres se asocia a un aumento de la incidencia de TEV de entre 2 y 5 veces [253,271-273]. Además, se ha demostrado que el riesgo varía en función del tipo de anticonceptivo oral utilizado, de la duración del tratamiento y que sigue un patrón dosis-dependiente, asociándose un mayor riesgo de TEV a dosis más altas de ACOs [271-273]. Un caso curioso de efecto sinérgico se observa entre el riesgo de TEV producido por los ACOs y la presencia de FVL. Se estima que las mujeres heterocigotas para FVL tienen un riesgo aumentado de TEV de unas 4-8 veces y que el uso de ACOs produce un incremento del riesgo de entre 2 y 5. Sin embargo, en presencia de ambos factores, el riesgo de TEV puede llegar a ser de hasta 34 veces más [274]. Esto probablemente es debido a que el uso de ACOs induce a la resistencia a la APC [275], como se mostró en un estudio en el que hasta el 60% de mujeres que padecieron un evento de TEV durante el uso de ACOs eran APC resistentes [274]. Esta

condición adquirida por los ACOs agravaría el efecto producido por la presencia de FVL y generaría este efecto sinérgico observado en el riesgo de TEV.

En cuanto a la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas, se ha observado que aumenta el riesgo de TEV de 2 a 4 veces respecto a mujeres que no la utilizan [276-280]. La administración transdérmica de estas hormonas podría tener un menor riesgo de TEV que la administración oral [281]. También se ha observado un aumento en el riesgo de TEV en los hombres que reciben tratamiento con estrógenos para el cáncer de próstata [282]. Por el contrario, las altas concentraciones endógenas de hormonas sexuales no se han asociado con un mayor riesgo trombótico [283]. Otros factores de riesgo que se han asociado a la aparición de TEV son la presencia de varices [249], hiperglicemia [284], insuficiencia cardíaca [285-287], dislipemia [288], enfermedades inflamatorias crónicas [289], enfermedades autoinmunes [290,291], enfermedades infecciosas [292], etc

Como hemos visto en el caso del FVL y el uso de ACOs, en muchas ocasiones factores hereditarios interactúan con otros ambientales o adquiridos para aumentar el riesgo trombótico de un individuo [293-297]. Un ejemplo de ello es la gráfica que se muestra en la **figura 7**. Además, también existen interacciones entre factores genéticos distintos [298]. Todas estas situaciones deberían ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar el riesgo de TEV de un individuo, con la finalidad de tomar la mejor decisión clínica posible.



La **figura 7** muestra el riesgo trombótico de un individuo con FVL en heterocigosis y de un individuo sin la mutación. Ambos experimentan, a la misma edad, un período de inmovilización, lo que produce un incremento puntual del riesgo. En el caso del individuo con FVL, este incremento supone superar el umbral trombótico y desarrollar un evento de TEV.

## 1.4. Diagnóstico del TEV

Ante la sospecha clínica de un episodio de TEV, el primer paso es la determinación de la probabilidad clínica pre-test en base a una escala validada, basada principalmente en datos clínicos. La escala más utilizada es la de Wells [299] (hay una específica para TEP y otra para TVP), pero también se utilizan otras como la de Ginebra [300], la de Pisa [301] o la de Constans [302]. Estas escalas permiten estratificar la probabilidad de sufrir un episodio de TEP o de TVP, y en función del resultado se toman diferentes decisiones para continuar con el diagnóstico.

En el caso de pacientes con sospecha de TEP, tras una probabilidad baja o intermedia en la escala de Wells, se determina la concentración plasmática de dímero D, mientras que en pacientes con probabilidad alta deben realizarse directamente las pruebas de imagen de confirmación, una APTC o una gammagrafía pulmonar de perfusión-ventilación (GPPV). En pacientes con probabilidad baja o intermedia de TEP y un resultado negativo de la determinación de dímero D, se puede descartar la existencia de TEP. En los enfermos hospitalizados, tras intervenciones quirúrgicas y traumatismos, así como en embarazadas, la determinación del dímero D tiene una utilidad limitada debido a una alta tasa de falsos positivos. Según las guías clínicas publicadas en 2018 por la Sociedad Americana de Hematología (ASH por sus siglas en inglés) para el diagnóstico del TEV [303], la GPPV tiene preferencia sobre la APTC debido a la menor exposición a la radiación ionizante. En caso de un resultado negativo de la GPPV y persistencia de sospecha clínica de TEP, se recomienda realizar una APTC o una ecografía de las venas profundas de la parte proximal de extremidades inferiores para descartar el evento.

Para los pacientes con sospecha de TVP de miembros inferiores, ante una probabilidad baja en la escala de Wells se recomienda iniciar el proceso diagnóstico con la determinación de la concentración de dímero D. El resultado negativo permite descartar la existencia de TVP. En pacientes con probabilidad intermedia o alta, o con baja y resultado positivo de dímero D, se recomienda la realización de una ecografía Doppler de miembros inferiores, una variedad de la ecografía tradicional basada en el empleo de ultrasonidos. En pacientes con alta probabilidad de TVP y resultado negativo de la ecografía, si no se ha concluido otro diagnóstico, se recomienda realizar otra ecografía de control transcurrida una semana.

En el caso de pacientes con sospecha de TVP de extremidades superiores, la escala diagnóstica pretest más utilizada es la de Constans dicotomizada, la cual separa a los pacientes en sólo dos grupos según tengan baja o alta probabilidad de TVP. En personas con baja probabilidad de TVP, se recomienda determinar la concentración de dímero D, y en caso de un resultado positivo realizar una ecografía Doppler. En el caso de pacientes con probabilidad alta de TVP, debe realizarse directamente la ecografía Doppler. Al igual que en pacientes con sospecha alta de TVP de miembros inferiores, si la ecografía en este grupo de pacientes es negativa, se recomienda realizar otra ecografía transcurrida una semana.

### **1.5. Tratamiento del TEV**

Para ayudar a los clínicos a tomar las mejores decisiones terapéuticas en el manejo del evento trombótico, existen guías con recomendaciones a seguir cuando se diagnostica un caso de TEV. Unas de las más seguidas y más importantes son las guías de la ASH, las cuáles fueron actualizadas en 2020 [304]. La ASH sugiere tratar a los pacientes con TVP o TEP con bajo riesgo de complicaciones en casa en lugar de en el hospital.

En pacientes con TVP, el tratamiento estándar es el tratamiento con anticoagulantes. Se recomienda el uso de ACOD (anticoagulantes orales de acción directa) por delante de los AVK, y no se sugiere que ningún ACOD sea preferible al resto de fármacos de su mismo grupo. Otra posibilidad es el uso de heparina de bajo peso molecular (HBPM). En la mayoría de los pacientes con TVP proximal se sugiere administrar un tratamiento anticoagulante en monoterapia en vez de combinar un tratamiento trombolítico con un tratamiento anticoagulante. La trombólisis puede considerarse en pacientes con TVP donde existe amenaza para las extremidades y en pacientes jóvenes, con bajo riesgo de hemorragia, o con TVP sintomática en venas iliaca o femoral (mayor riesgo de SPT severo). En los pacientes con TVP en los que la trombólisis se considere una opción terapéutica adecuada, se sugiere realizar una trombólisis local (con catéter) en vez de una trombólisis sistémica.

En el caso del TEP, el tratamiento inicial de elección dependerá de la gravedad del episodio. En los pacientes con TEP sin trastornos hemodinámicos, se recomienda administrar un tratamiento anticoagulante en monoterapia en vez de efectuar una trombólisis en combinación con un tratamiento anticoagulante. Por el contrario, en los pacientes con TEP y trastornos hemodinámicos, se recomienda administrar un

tratamiento trombolítico seguido de un tratamiento anticoagulante. En los pacientes en los que la trombólisis se considere una opción terapéutica adecuada, se sugiere realizar una trombólisis sistémica en vez de una trombólisis local con catéter.

Para el tratamiento primario, es decir, el periodo mínimo de tiempo que un paciente debe estar en anticoagulación terapéutica para tratar el TEV inicial, de los pacientes con TVP o TEP o ambas, sean provocados o no, siempre que sea posible, se recomienda utilizar un esquema más breve de anticoagulación (3-6 meses) en lugar de uno prolongado (6-12 meses).

Una vez completado el tratamiento primario, se debe decidir si se interrumpe la terapia anticoagulante o, por el contrario, se continúa con el tratamiento antitrombótico a largo plazo, con la intención de prevenir posibles recurrencias. Es lo que se conoce como prevención secundaria.

En pacientes con TEP o TVP no provocado, lo más recomendable es implantar una pauta de anticoagulación indefinida. Sin embargo, en determinadas circunstancias, como por ejemplo cuando el equilibrio entre riesgos y beneficios es incierto, se pueden utilizar escalas de predicción, determinaciones de dímero D o ecografías rutinarias para detectar trombosis residuales que ayuden a alcanzar una decisión final.

En pacientes con TEP o TVP provocado por un factor de riesgo crónico se recomienda continuar con un tratamiento anticoagulante indefinido. Por el contrario, en pacientes con TEP o TVP provocado por un factor de riesgo transitorio, normalmente se interrumpe la terapia antitrombótica una vez finalizado el tratamiento primario.

Como prevención secundaria se recomienda el uso de tratamiento anticoagulante, en lugar del uso de un antiagregante, como el ácido acetilsalicílico.

En el manejo de recurrencias tromboticas, el tratamiento primario dependerá de la pauta de prevención secundaria que estaban siguiendo en el momento de la aparición de la recurrencia y, también, de la naturaleza de los episodios que ha sufrido el paciente.

Éstas son algunas de las recomendaciones generales que da la ASH para el tratamiento y manejo del TEV, pero obviamente cada caso ha de ser estudiado individualmente, teniendo cuenta las características específicas de cada paciente, con la finalidad de tomar la mejor decisión terapéutica. Es el caso, por ejemplo, de pacientes oncológicos, pacientes con enfermedades crónicas, mujeres embarazadas o de pacientes con alto riesgo de

hemorragia, cuyo manejo es especialmente delicado por las posibles reacciones adversas que se pueden generar.

## **1.6. Biomarcadores de TEV**

Por definición, un biomarcador es una sustancia o característica que debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, estado patológico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Según el uso práctico que tenga en la clínica podrá ser clasificado como biomarcador de diagnóstico, pronóstico o predictivo de la enfermedad. Son muchos los biomarcadores que se han asociado al TEV. A continuación, se describen los más relevantes.

### **1.6.1. Dímero D**

El dímero D es el único biomarcador plasmático usado actualmente en la práctica clínica. Como ya se ha descrito, el dímero D es un producto de degradación de la fibrina cuyos niveles se utilizan para el diagnóstico tanto del TEP como de la TVP. Sin embargo, su utilidad clínica es limitada ya que, aunque tiene una elevada sensibilidad y permite descartar la presencia de TEV con alta fiabilidad, su baja especificidad no permite confirmar la existencia de TEV sin la ayuda de pruebas de imagen. Esto es debido a que los niveles de dímero D pueden estar aumentados en otras condiciones patológicas además del TEV, como enfermedades cardiovasculares, infecciones, cáncer, cirugías recientes, traumatismos, embarazo, edad avanzada, etc [305-311]. Además de para excluir el TEV durante el proceso de diagnóstico, los ensayos de dímero D también han mostrado ser útiles para estratificar el riesgo de recurrencia trombótica en pacientes que finalizan el tratamiento anticoagulante [312-315], e incluso se han propuesto diversos modelos que incluyen los niveles de dímero D, junto con datos clínicos, para predecir la recurrencia [316-318]. Aunque hay diversos tests disponibles para la determinación de dímero-D, el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) es el método de referencia por su alta sensibilidad, capaz de detectar y discriminar niveles muy reducidos del biomarcador [319].

### **1.6.2. P-selectina**

La P-selectina es un miembro de la familia de las selectinas (junto con la L-selectina y la E-selectina), moléculas de adhesión que juegan un papel fundamental en el proceso inflamatorio y durante el reclutamiento y adhesión leucocitaria en el lugar del daño vascular [320,321]. La P-selectina es almacenada en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y en

los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, desde donde, tras su activación, es liberada para llevar a cabo sus funciones [322]. En modelos animales de trombosis, se ha demostrado que la expresión de P-selectina regula la deposición de fibrina y el tamaño del trombo [323,324]. Asimismo, niveles elevados de P-selectina mostraron un efecto trombofílico en ratones, y una terapia basada en P-selectina corregía el estado prohemorrágico de un modelo murino de hemofilia A [325,326].

Además de la P-selectina de membrana, existe una forma soluble de la proteína presente en el plasma, la cual carece de dominio transmembrana [327]. La P-selectina soluble (sP-selectina) puede ser fácilmente detectada y cuantificada por ELISA y se ha convertido en uno de los biomarcadores más prometedores en el estudio de la fisiopatología del TEV. Diversos estudios han mostrado niveles más elevados de sP-selectina en pacientes con TEV [328-334] e incluso se ha observado una disminución considerable de sus niveles tras la finalización del tratamiento anticoagulante en pacientes con TVP y TEP [331,332]. Algunos estudios han evaluado la utilización de la sP-selectina junto con otros parámetros utilizados en la clínica, como el dímero-D o la escala de Wells, para el diagnóstico del TVP [333,334], obteniendo resultados prometedores, e incluso se han asociado los niveles de sP-selectina con el riesgo de recurrencia trombótica [335].

### **1.6.3. Micropartículas**

Las micropartículas son pequeñas vesículas derivadas de la gemación de la membrana plasmática de diversos tipos celulares, como plaquetas, leucocitos, células endoteliales, etc, generadas, principalmente, en respuesta a activación celular, daño o apoptosis [336,337]. Estas micropartículas son ricas, entre otros, en FT, PS y PSGL-1, proteína de unión a P-selectina presente en leucocitos y plaquetas, lo que les proporciona una naturaleza altamente procoagulante [336-338]. Se ha demostrado que las micropartículas están involucradas en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias y vasculares, y niveles elevados de micropartículas circulantes se han observado en pacientes con TEV [339,340].

Sin embargo, resultados contradictorios han sido hallados en diversos estudios, en los que no se aprecian diferencias en sus niveles entre pacientes con TEV y controles sanos [328,341], por lo que la implicación de las micropartículas circulantes en la enfermedad tromboembólica venosa sigue siendo controvertida. Estas diferencias encontradas en los resultados entre estudios podrían ser explicadas por la amplia variabilidad que ofrecen los diferentes métodos utilizados para la cuantificación de los niveles de micropartículas,

y por las variaciones en las condiciones preanalíticas de las actuales técnicas de detección [342,343], factores que se han intentado estandarizar para una mejor comprensión y reproducibilidad de los resultados [344,345].

#### **1.6.4. Proteína C reactiva y otros marcadores inflamatorios**

Un mejor entendimiento de los fundamentos fisiopatológicos del TEV ha puesto de manifiesto que el proceso inflamatorio juega un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad. Es por ello que en los últimos tiempos ha habido un creciente interés en el estudio de marcadores de inflamación en el TEV. Uno de los biomarcadores más estudiados es la proteína C reactiva (PCR), una proteína plasmática circulante que es ampliamente utilizada en el laboratorio clínico de rutina. Diversos estudios han encontrado una asociación entre el riesgo de TEV y niveles elevados de PCR [346-348], e incluso ha mostrado un importante valor predictivo de recurrencia trombótica en pacientes oncológicos [349].

Otros marcadores inflamatorios que se han relacionado con el TEV son el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), y las interleuquinas, IL-6, IL-8 e IL-10 entre otros. Mientras que el TNF- $\alpha$ , la IL-6 y la IL-8 parecen tener un efecto protrombótico, mostrando niveles significativamente más elevados en pacientes de TEV que en controles sanos [350,351], a la IL-10 se le atribuye un papel antiinflamatorio y antitrombótico, con valores disminuidos en pacientes. Incluso, se ha observado en modelo animal, que la neutralización de la IL-10 produce un aumento de la inflamación y del tamaño del trombo, efecto que se pierde cuando se adiciona IL-10 exógena [352].

#### **1.6.5. Generación de trombina**

Como he mencionado antes, la trombina es el eje central de la coagulación, por lo que la capacidad de generar trombina de un individuo nos puede dar mucha información acerca del riesgo trombótico del mismo. Mediante el test de generación de trombina (TGT) es posible obtener una gráfica, tras activar la cascada de la coagulación, que monitoriza tanto la generación como la posterior degradación de la trombina, y de la que se pueden extraer diversos parámetros que nos indican el estado del equilibrio coagulativo de un individuo [353,354]. Se ha demostrado la eficacia del TGT para evaluar el riesgo hemorrágico y trombótico de un individuo, así como para poder identificar aquellos pacientes de TEV con alto riesgo de recurrencia [312,355-358]. Además, es una herramienta que cada vez está teniendo más relevancia en la práctica clínica, con utilidades como la monitorización de tratamientos, tanto antitrombóticos como

antihemorrágicos, o la estratificación de pacientes, con la finalidad de proporcionar un tratamiento individualizado [359-361].

#### **1.6.6. Factor VIII**

Es evidente que un aumento en los niveles de los factores de la coagulación genera una tendencia procoagulante en el equilibrio hemostático. Entre ellos, el FVIII es el que más se ha relacionado con el riesgo de TEV y diversos estudios han hallado niveles más elevados del mismo en pacientes de TEV respecto a controles sanos [135,136,362,363]. El FVIII también ha demostrado ser un buen predictor de recurrencia trombótica [364,365], y sus niveles han mostrado ser independientes de la fase aguda del evento, exhibiendo así un efecto de causa y no de consecuencia del episodio trombótico [366,367]. Además, el 60% de las variaciones en la actividad del FVIII depende de factores no genéticos [368], y variables como la edad, la obesidad, la diabetes y enfermedades como algunos tipos de cáncer se asocian con niveles más elevados de FVIII [369,370,371,372].

#### **1.6.7. NETs**

Los NETs son estructuras en forma de red, cuyo principal componente son fibras de cromatina descondensada que forman complejos junto con los cinco tipos de histonas y proteínas granulares con actividad citotóxica, que permiten el atrapamiento y eliminación de patógenos [373]. Aunque su liberación por los neutrófilos, durante un proceso denominado NETosis, es beneficiosa durante una infección, una excesiva y descontrolada formación de NETs podría suponer un aumento del riesgo trombótico de un individuo. Se ha demostrado que son muchos los efectos protrombóticos generados por los NETs, algunos de los cuáles son la promoción de la activación y agregación plaquetaria [374], junto a la atracción y ensamblaje de moléculas procoagulantes, como el FvW, fibrinógeno [374], FXII [375], FT [376] e incluso micropartículas procoagulantes [377]. Además, gran cantidad de estudios han descrito niveles más elevados de NETs o de algunas de las moléculas que los forman en pacientes de TEV respecto a controles sanos [378-380].

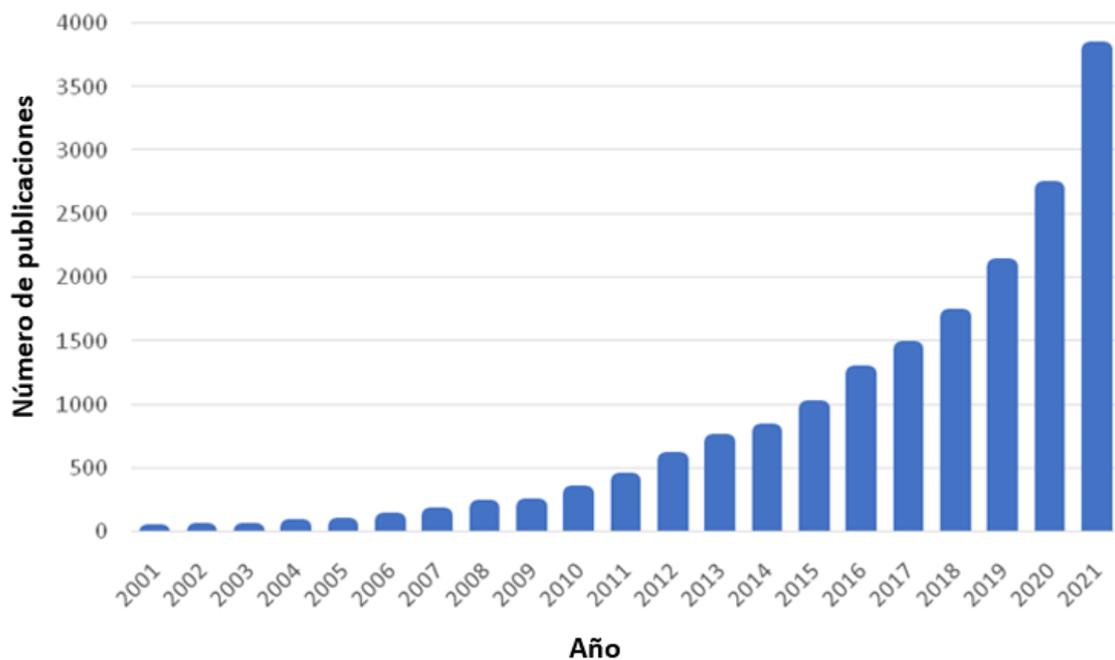
Muchos otros biomarcadores se han asociado con la fisiopatología del TEV en estudios epidemiológicos. Algunos ejemplos de ello son los monómeros de fibrina [381,382], los cuales hace décadas ya mostraron un valor predictivo y diagnóstico en el TEV, o los microRNAs [383-386], pequeños fragmentos circulantes de RNA que pueden regular la

expresión genética post-transcripcionalmente y que en los últimos años se han postulado como unos de los biomarcadores con más interés y posibilidades traslacionales.

A pesar de todos estos avances y aunque muchos de estos biomarcadores muestran un futuro muy prometedor, actualmente únicamente los niveles de dímero-D son utilizados en la práctica clínica de rutina, por lo que muchos más estudios y validaciones son necesarios en este campo. En este sentido, las tecnologías ómicas se han desmarcado como una de las herramientas más útiles e innovadoras para el descubrimiento de nuevos biomarcadores, exhibiendo unas capacidades y posibilidades nunca antes vistas.

### 1.7. Tecnologías ómicas y TEV

En los últimos años se ha producido un cambio radical en las aproximaciones y técnicas utilizadas para el estudio de las ciencias biológicas. Gran parte de la culpa de este cambio lo tienen las tecnologías ómicas, cuyo crecimiento ha sido vertiginoso en los últimos 20 años (**Figura 8**).



**Figura 8.** Número de publicaciones que contienen el término “omics” en el *abstract* o en el título desde el año 2001 al 2021.

El término “ómicas” se refiere al empleo de tecnologías tales como la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, lipidómica, etc en las que, semánticamente hablando, se estudia “la totalidad o el conjunto de algo”.

La primera de ellas en desarrollarse y la que ha experimentado un mayor recorrido es la genómica, cuya gran revolución comenzó hace unos años con la aparición de los GWAS. Los GWAS permiten estudiar todo el genoma de un individuo y asociar determinadas variantes genéticas con fenotipos específicos. En los últimos años, estos estudios han ampliado nuestro conocimiento sobre la heredabilidad del TEV y muchos polimorfismos se han asociado con riesgos más elevados de TEV, sin embargo, estos hallazgos aún no han sido trasladados a la práctica clínica [387-389].

La siguiente en surgir fue la proteómica, la cual se encarga del estudio de todas las proteínas presentes en un sistema biológico. La proteómica se ha utilizado y se utiliza para encontrar proteínas que actúen como biomarcadores de la enfermedad o como posibles dianas de tratamiento. En el campo del TEV, la proteómica se ha convertido en una herramienta muy importante para dilucidar algunos aspectos de la patogénesis y las interacciones moleculares que tienen lugar durante la enfermedad.

La mayor parte de los esfuerzos se han centrado en la realización de estudios caso-control en biofluidos como plasma o suero con los que es posible obtener perfiles proteicos capaces de diferenciar pacientes con TEV de controles sanos. Prueba de ello es el trabajo de Jensen et al [390], en el que llevaron a cabo un estudio prospectivo no dirigido, mediante espectrometría de masas, en el que compararon los perfiles proteicos de 100 controles sanos y de 100 pacientes de TEV en plasma recogido antes del evento. Detectaron 501 proteínas en un número suficiente de muestras como para realizar el análisis estadístico y de éstas, los niveles de 46 proteínas mostraron asociación con la aparición del evento trombótico. En otro estudio caso-control, Bruzelius et al [391] identificaron una nueva asociación entre los niveles de la proteína PDGFB y el TEV. Para ello, llevaron a cabo una primera fase de *screening* con el plasma de 88 pacientes de TEV y 85 controles sanos, en la cual, mediante un inmunoensayo de partículas en suspensión recubiertas por 755 anticuerpos, lograron capturar, identificar y cuantificar los niveles de 408 proteínas. De éstas, 4 mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de pacientes y controles.

Para validar estos resultados, compararon, mediante el mismo sistema, los niveles de estas 4 proteínas en el plasma de 580 casos de TEV y 589 controles sanos, y confirmaron el papel de PDGFB como un potencial biomarcador de TEV.

En cuanto a la metabolómica, su relación con el TEV es todavía más reciente y son pocos los trabajos publicados que relacionen ambos campos. Uno de los primeros fue el estudio de Deguchi et al [392], en el que compararon, mediante espectrometría de masas no dirigida, el metaboloma en plasma de 40 hombres con TEV con el de 40 controles sanos. Identificaron niveles disminuidos de varias acilcarnitinas de cadena larga (>10 átomos de carbono) en el plasma de pacientes. Además, demostraron que la adición de acilcarnitinas de cadena larga en ensayos de coagulación disminuía la actividad del factor Xa, ejerciendo así un efecto anticoagulante. Zeleznik et al [393], por su parte, llevaron a cabo un análisis metabolómico en el plasma de 92 pacientes de TEP. Compararon el perfil metabólico de 46 pacientes con TEP de riesgo bajo y de 46 pacientes de TEP de riesgo intermedio-alto, a las 24 horas del diagnóstico del evento, y advirtieron que 50 de los metabolitos obtenidos tenían diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones. Estos metabolitos pertenecían mayoritariamente a las rutas metabólicas del ciclo de Krebs, al metabolismo de los ácidos grasos y al de las purinas.

El primer estudio metabolómico realizado de forma prospectiva fue el descrito por Jiang et al [394], en el que analizaron y compararon muestras de plasma de 240 pacientes con TEV y de 6.963 controles sanos, todas ellas procedentes de 3 grandes cohortes recogidas específicamente para el diseño de estudios prospectivos. Fueron capaces de identificar 211 metabolitos en un número suficiente de muestras, la mayoría de ellos lípidos, y encontraron que la clase lipídica de los diacilgliceroles y la carnitina C5 mostraban diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles y estaban asociados con la aparición de TEV.

En otro estudio, Fraser et al [395] compararon los perfiles metabólicos de 42 controles sanos y de 42 pacientes de TEV, cuyo plasma fue recogido al menos 3 meses después del evento. Identificaron 512 metabolitos y obtuvieron un panel de 21 metabolitos, 12 de ellos lípidos, como biomarcadores de TEV. Individualmente, ninguno de ellos diferenciaba de forma robusta pacientes y controles sanos. Sin embargo, combinados en un modelo, eran capaces de discriminar ambas poblaciones con una sensibilidad de 0,960 y una especificidad de 0,832, mostrando así una notable potencia estadística.

A pesar de la conocida relación de algunos lípidos y lipoproteínas con la fisiopatología del TEV, llevando a cabo actividades tanto pro- como anticoagulantes, y de la gran cantidad de lípidos detectados en estudios metabolómicos, ningún estudio lipídico específico ha sido llevado a cabo en el campo del TEV hasta la fecha.



# **OBJETIVOS**



## 2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es la búsqueda de biomarcadores específicos del TEV mediante el empleo de aproximaciones ómicas. Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Proteómica
  - 1.1. Identificación, mediante una primera fase de *screening* caso-control, de un perfil de proteínas asociadas al TEV.
  - 1.2. Validación, en una cohorte diferente y de mayor tamaño, de las diferencias observadas en la fase de *screening*.
  - 1.3. Puesta a punto de una técnica inmunoanalítica para la cuantificación proteica más sencilla, eficiente y económica que las disponibles actualmente.
  
2. Metabolómica
  - 2.1. Identificación, mediante una primera fase de *screening* caso-control, de un perfil metabólico asociadas al TEV.
  - 2.2. Validación, en una cohorte diferente y de mayor tamaño, de las diferencias observadas en la fase de *screening*.
  - 2.3. Estudio del efecto *in vitro* de los metabolitos validados en un test global de la coagulación como el TGT.
  - 2.4. Estudio del grado de correlación entre los metabolitos validados y variables clínicas, parámetros del TGT y, marcadores de inflamación, apoptosis y NETosis.
  
3. Lipidómica
  - 3.1. Identificación, mediante un estudio caso-control, de un perfil lipídico asociado al TEV.
  - 3.2. Estudio del grado de correlación entre los lípidos identificados y diferentes variables clínicas relacionadas con el metabolismo del colesterol.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3. Material y métodos

### 3.1. Grupos clínicos

Todos los pacientes de TEV y controles sanos incluidos en la presente Tesis Doctoral dieron su consentimiento informado previo a la toma de muestras. Además, todos los estudios fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y la investigación fue llevada a cabo según los principios de la Declaración de Helsinki.

#### 3.1.1. Pacientes con TEV

El diagnóstico de la TVP y del TEP fue realizado y comprobado objetivamente mediante probabilidad clínica, niveles de dímero D, ecografía Doppler y APTC. Todos los pacientes fueron incluidos en el estudio al menos 6 meses después del evento trombótico (media de un año) y una vez la terapia anticoagulante había finalizado. Se seleccionaron pacientes con TEV sin ninguno de estos factores de riesgo conocidos: trombofilia adquirida o congénita, historia familiar de trombosis, uso de anticonceptivos orales o terapia hormonal, embarazo, puerperio ni cirugía o inmovilizaciones en los últimos 3 meses. Los pacientes con TVP esplácnica, síndrome nefrótico, disfunción hepática o renal, enfermedades infecciosas o inflamatorias, síndrome antifosfolípido, cáncer activo o en terapia oncológica fueron también excluidos.

#### 3.1.2. Controles sanos

Todos los individuos incluidos en el grupo control estaban aparentemente sanos, no presentaban historia personal o familiar de trombosis y fueron reclutados, paralelamente a la inclusión de pacientes, entre el personal investigador y sanitario del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Dependiendo del estudio, se seleccionaron individuos con una distribución de edad y sexo similar a la del grupo de pacientes.

### 3.2. Colección de muestras

Las muestras sanguíneas fueron recogidas entre las 8h y las 10h de la mañana, en ayunas, en condiciones basales y clínicamente estables. La extracción de sangre se realizó por punción de la vena cubital de forma no traumática, utilizando agujas de calibre 21, y recogida en tubos Vacutainer® (Becton Dickinson), los cuales contenían citrato trisódico

0,109 M como anticoagulante. Posteriormente, la sangre citratada se centrifugó a 1.500 g durante 30 minutos a 4 °C y el plasma obtenido fue alicuotado en tubos a diferentes volúmenes, permaneciendo almacenado a – 80 °C hasta su utilización.

### 3.3. Proteómica

#### 3.3.1. Fase de screening

##### 3.3.1.1. Características clínicas de los sujetos del estudio

Un total de 18 pacientes, con al menos un episodio confirmado de TEV, y 18 voluntarios sanos, pareados por edad y sexo con los pacientes, fueron reclutados para este estudio. Las características clínicas de los sujetos del estudio se muestran en la **Tabla 1**. De los 18 pacientes, 10 de ellos (55,55%) fueron diagnosticados de TVP, 3 de TEP (16,67%) y 5 (27,77%) de TVP+TEP. De estos 10 pacientes con TVP, 4 sufrieron, al menos, dos episodios, y de los 3 pacientes con TEP, 1 tuvo una recurrencia.

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes con TEV y los controles sanos estudiados

	<b>TEV (N=18)</b>	<b>Controles (N=18)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Edad, años</b>	42,65 (12,16)	37,26 (14,54)	0,0346
<b>Género masculino, N (%)</b>	7 (38,88%)	8 (44,44%)	-
<b>IMC, Kg/m<sup>2</sup></b>	25,31 (5,48)	23,62 (3,10)	0,2383
<b>Colesterol total, mg/dL</b>	218,84 (297,76)	191,20 (30,35)	0,0235
<b>Colesterol HDL, mg/dL</b>	62,86 (12,38)	56,32 (15,90)	0,1275
<b>Colesterol LDL, mg/dL</b>	113,40 (58,14)	123,63 (28,78)	0,6545
<b>Triglicéridos, mg/dL</b>	137,40 (31,65)	88,62 (40,05)	0,0613

<b>Localización de la trombosis, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	10 (55,55%)	-	-
<b>TEP</b>	3 (16,67%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	5 (27,77%)	-	-
<b>TEV recurrente, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	4 (22,22%)	-	-
<b>TEP</b>	0 (0%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	1 (5,55%)	-	-

Las variables continuas son presentadas como la media y la desviación estándar. Las variables categóricas son presentadas como la cantidad y el porcentaje. Las diferencias en las variables continuas entre pacientes y controles fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Se consideró una relación estadísticamente significativa un P-valor < 0,05.

### **3.3.1.2. Determinación de parámetros bioquímicos**

Los niveles de triglicéridos (TGs) plasmáticos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ApoA1 y ApoB se determinaron mediante técnica enzimáticas de rutina en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital.

### **3.3.1.3. Extracción de proteínas**

Las muestras plasmáticas fueron sometidas a un proceso de depleción proteica mediante una columna de inmunoafinidad para varios analitos simultáneamente (MARS Human 14, Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta columna elimina las 14 proteínas de mayor abundancia en el plasma humano (albúmina, inmunoglobulina G (IgG), antitripsina, inmunoglobulina A (IgA), transferrina, haptoglobina, fibrinógeno,  $\alpha$ 2-macroglobulina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, inmunoglobulina M (IgM), apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, componente 3 del complemento y transtiretina), las cuales comprenden el 94% del total de proteínas humanas. Este proceso se realizó para mejorar el rango dinámico del análisis proteómico, ya que con frecuencia las proteínas de gran abundancia en plasma ejercen un efecto de enmascaramiento en el análisis sobre las proteínas minoritarias, y que son de interés para nuestro estudio. Para cada una de las muestras, la elución no retenida en su columna de afinidad, se pasó a un tubo y se guardó para su posterior análisis.

A continuación, se realizó la extracción de las proteínas presentes en cada muestra de plasma deplecionado, llevada a cabo en la Unidad de Proteómica del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental de la Universidad de Valencia (SCSIE). Para ello, las fracciones correspondientes a las proteínas no retenidas fueron tratadas con una dilución de 10% de ácido tricloroacético en agua (TCA)(v/v) a 5 °C, agitadas y dejadas en hielo durante 15 minutos. Las muestras fueron entonces centrifugadas (14.000 g, a 4 °C durante 20 min) y los sedimentos resultantes fueron lavados dos veces con 1 mL de acetona fría y centrifugados a las mismas condiciones que el paso anterior. Los *pellets* se dejaron a temperatura ambiente *overnight* para eliminar la acetona residual y, una vez secos, fueron diluidos en 30 µL de reactivo de extracción proteica (urea 8M y tampón de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 0,5 M, pH=8), sonicados y dejados en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. La concentración proteica fue medida con un fluorímetro Qubit™ (Invitrogen) y un *pool* de muestras, compuesto por 6 µg de proteína de cada una de las muestras deplecionadas, fue generado para su posterior análisis.

### **3.3.1.4. Creación de la librería de espectros**

#### **3.3.1.4.1. Procesamiento en gel de poliacrilamida de una dimensión (1D PAGE) del *pool* de muestras**

Se parte de un volumen del *pool* de muestras equivalente a 100 µg de proteína, el cual es sometido a un proceso de desecación mediante un evaporador rotativo o rotavapor. A continuación, la muestra proteica fue resuspendida en tampón Laemmli (Thermo Scientific) y sometida a un proceso de separación por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% (12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µL, BioRad). La carrera del gel fue cortada en 5 fragmentos del mismo tamaño y digerida con tripsina (Promega). La digestión se realizó empleando 1µg de tripsina en cada fragmento y se llevó a cabo a 37 °C *overnight*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La digestión fue detenida con ácido trifluoroacético (TFA) al 10%, el sobrenadante fue recogido y los fragmentos de gel se deshidrataron con acetonitrilo (ACN) puro. Las nuevas soluciones peptídicas fueron combinadas con su correspondiente sobrenadante, secadas a vacío mediante un sistema *SpeedVac* y resuspendidas en 15 µL de 2% ACN, 0,1% TFA.

### 3.3.1.4.2. Procesamiento en solución del *pool* de muestras

100 µg de proteína del *pool de muestras* fueron digeridos con tripsina siguiendo las instrucciones del fabricante, y la mezcla peptídica obtenida fue secada mediante un rotavapor para el proceso de isoelectroenfoque (IEF). Para ello, la mezcla digerida de péptidos fue disuelta en 200 µL de tampón de hidratación (Urea 7M/Tiourea 2M/1,6% anfolitos pH 3-11NL (no lineal)), con la cual se rehidrató la tirilla IPG (*Immobilized pH gradient*) con rango pH 3-11 de 13 cm (GE Healthcare) *overnight* a temperatura ambiente. Los péptidos presentes en la muestra fueron separados en función de su punto isoeléctrico por IEF (IPGphor Isoelectric Focusing System, GE Healthcare), mediante un protocolo de aumento progresivo de voltaje de 5000 V hasta 25000 Vh. Una vez finalizado el proceso, la tirilla fue lavada con agua bidestilada y cortada en 10 fragmentos iguales. Los péptidos presentes en cada uno de los fragmentos fueron extraídos mediante la utilización secuencial de 120 µL de las siguientes 4 soluciones de extracción: (1) 5% ACN, 0,1% TFA, (2) 50% ACN, 0,1% TFA, (3) 70% ACN, 0,1% TFA y (4) 99.9% ACN, 0,1% TFA. Todas las fracciones peptídicas fueron combinadas, secadas mediante centrifugación al vacío y resuspendidas con 40 µL de 2% ACN, 0,1% TFA. A continuación, la mezcla de todas las fracciones fue purificada y concentrada mediante una columna POROS R2 (EMD Millipore), y por último secada al vacío mediante un sistema *SpeedVac* y resuspendida hasta una concentración de 0,3 µg/µL en 2% ACN, 0,1% TFA.

### 3.3.1.4.3. Espectrometría de masas DDA o *shotgun* del *pool* de muestras

Las fracciones peptídicas del *pool* de muestras extraídas por electroforesis unidimensional, así como las obtenidas por IE, fueron analizadas por espectrometría de masas para la creación de una biblioteca de espectros. Para ello, 5 µL de cada una de ellas fueron cargadas en una columna separadora (Columna NanoLC, 3 µm C18-CL, 75 µm x 15 cm; Eksigen) y desalinizadas con 0.1% TFA a 3 µl/min durante 5 min. Los péptidos fueron entonces cargados en una columna analítica (LC column, 3 µm C18-CL, 75 µm x 12 cm, Nikkyo), la cual fue equilibrada con 5% ACN, 0,1% FA (ácido fórmico). La elución peptídica fue llevada a cabo con un flujo de 300 nL/min y un gradiente lineal de 5 a 35% de B en 180 minutos (A: 0,1% FA en agua; B: 0,1% FA en ACN). Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de masas en tándem tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo acoplado a una fuente de ionización con electrospray nanoESI-QqTOF (5600 TripleTOF, ABSCIEX). El análisis se llevó a cabo en modo de adquisición dependiente

de datos (DDA, por sus siglas en inglés), más concretamente en modo *shotgun*, en el que se realizó un escaneo de los iones precursores entre 350 y 1.250 m/z durante 250 ms, seguido de escaneos de productos iónicos de entre 350 y 1.500 m/z durante 150 ms. Los 25 iones más intensos con una carga entre 2+ y 5+ fueron seleccionados para fragmentación tras cada escaneo.

#### **3.3.1.4.4. Identificación de proteínas del *pool* de muestras**

Para la identificación de las proteínas detectadas mediante el análisis por espectrometría, se utilizaron los parámetros por defecto del *software* ProteinPilot v5.0 (AB SCIEX), con el que generamos una lista de picos a partir de los archivos *wiff* obtenidos directamente del análisis LC-MS/MS en modo DDA del *pool* de muestras. El algoritmo Paragon de ProteinPilot v5.0 fue utilizado para realizar la búsqueda en la base de datos proteica de ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) con los siguientes parámetros: especificidad por la tripsina con un *missed cleavage* permitido, cys-alquilación (yodoacetamida) y taxonomía restringida a humanos. Para evitar utilizar las mismas señales espectrales en más de una identificación, las proteínas identificadas fueron agrupadas en función de sus espectros mediante el algoritmo ProGroup de ProteinPilot v5.0. Así, las proteínas que compartían espectro fueron agrupadas independientemente de la secuencia peptídica asignada, y la proteína que más información espectral compartía se mostró como la proteína principal del grupo. Las proteínas que mostraron un *ProtScore* > 1,3 se identificaron con una confianza de  $\geq 95\%$ .

#### **3.3.1.5. Detección de proteínas en las muestras de los sujetos del estudio**

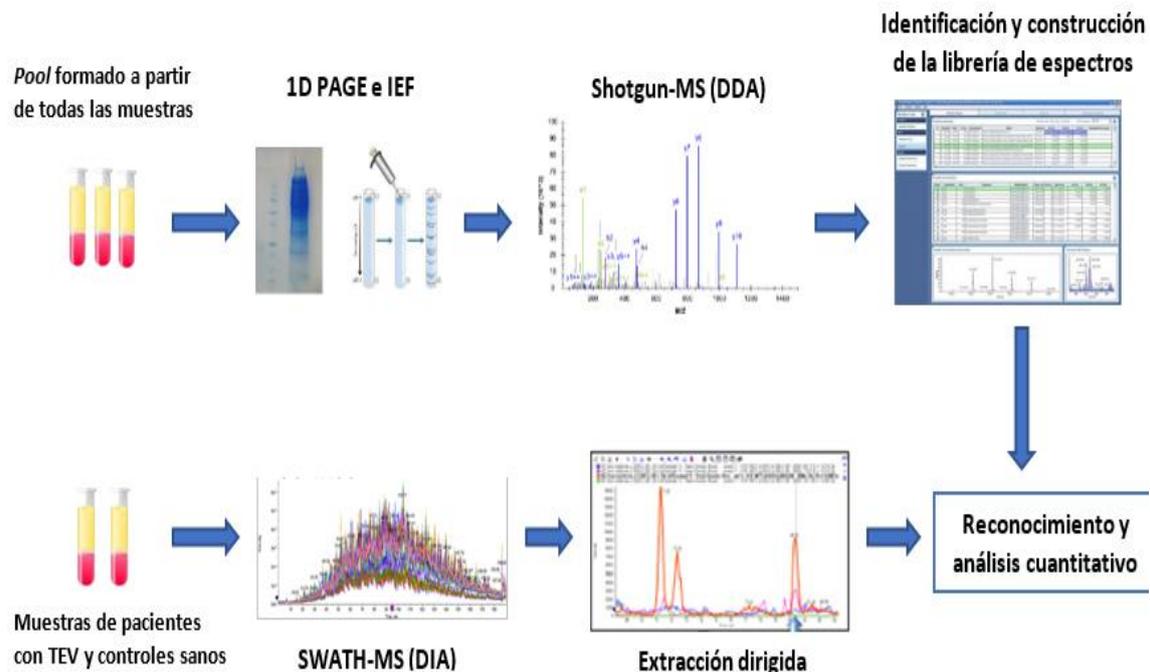
##### **3.3.1.5.1. Extracción de péptidos y espectrometría de masas DIA o SWATH**

Los péptidos presentes en las muestras de pacientes y controles se separaron en el mismo sistema cromatográfico y en las mismas condiciones que el *pool* de muestras, información descrita en el apartado anterior. También se utilizó el mismo espectrómetro de masas en tándem tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo acoplado a una fuente de ionización con electrospray nanoESI-QqTOF (5600 TripleTOF, AB SCIEX), pero en este caso operó en modo de adquisición independiente de datos (DIA, por sus siglas en inglés), concretamente en modo SWATH (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Fragment-Ion Spectra*). En este análisis se realizó un escaneo de los iones precursores en un rango entre 350 y 1.250 m/z con un tiempo de acumulación de 0,05 s, seguido de escaneos de productos iónicos de 0,08 s entre 350 y 1.250 m/z en un total de 32 ventanas.

Cada ciclo tuvo una duración de 3,05 s. Todos los iones con una carga superior a +2 se fragmentaron en el análisis.

### 3.3.1.5.2. Identificación y cuantificación de proteínas

Para la identificación y cuantificación de proteínas, los archivos obtenidos a partir del análisis LC-MS/MS en modo DIA fueron analizados con el software PeakViek 2.1 (AB SCIEX). El algoritmo seleccionó hasta 20 péptidos para cada proteína, presentes en la librería anteriormente generada, y se seleccionaron las 5 transiciones por péptido con mayor intensidad, preferentemente con una  $m/z$  mayor que la del ion precursor (**Figura 9**). Se fijó un umbral de confianza peptídica superior al 97% y un FDR (*False Discovery Rate*) menor al 1%. A continuación, se extrajo el área cromatográfica de cada transición y la cuantificación de las proteínas se realizó sumando las áreas de todas las transiciones de los péptidos seleccionados para cada proteína. La cuantificación mediante SWATH nos permitió detectar y cuantificar proteínas de baja abundancia con mayor precisión y reproducibilidad.



**Figura 9.** Esquema del flujo de trabajo seguido para el análisis cuantitativo de las proteínas presentes en las muestras de plasma de pacientes con TEV y controles sanos.

### 3.3.1.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (versión v.3.5.1). Un modelo de regresión logística con penalización *Elastic Net* fue llevado a cabo con los niveles de las proteínas identificadas en ambas poblaciones. La capacidad predictiva del modelo fue evaluada mediante la estimación del área bajo la curva (AUC) del análisis ROC (*receiver operating characteristic*), ajustando el número de réplicas bootstrap a 1.000.

### 3.3.1.7. Anotación funcional

Para explorar la función biológica de las proteínas obtenidas en el modelo tras el análisis estadístico, se utilizaron tres herramientas bioinformáticas integrales para la anotación funcional: UniProtKB (<https://www.uniprot.org/uniprot/>), RCSB-PDB (<https://www.rcsb.org/>) y STRING (<https://string-db.org/>).

## 3.3.2. Fase de validación

### 3.3.2.1. Características clínicas de los sujetos del estudio

Un total de 60 pacientes, con al menos un episodio confirmado de TEV, y 60 voluntarios sanos, pareados por edad y sexo con los pacientes, fueron reclutados para este estudio. Las características clínicas de los sujetos del estudio se muestran en la **Tabla 2**. De los 60 pacientes, 40 de ellos (66,66%) fueron diagnosticados de TVP, 14 de TEP (23,33%) y 6 (10%) de TVP+TEP. De los pacientes con TVP, 8 sufrieron, al menos, dos episodios, y de los pacientes con TVP+TEP, 3 de ellos tuvieron una recurrencia.

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes con TEV y los controles sanos estudiados.

	TEV (N=60)	Controles (N=60)	P-valor
Edad, años	43,42 (14,22)	37,64 (13,91)	0,016
Género masculino, N (%)	25 (42,37%)	27 (46,55%)	-
IMC, Kg/m <sup>2</sup>	26,11 (5,62)	24,08 (3,87)	0,077
Colesterol total, mg/dL	190,14 (41,73)	198,33 (37,43)	0,2431
Colesterol HDL, mg/dL	53,63 (13,31)	58,21 (14,73)	0,1234
Colesterol LDL, mg/dL	111,23 (35,88)	125,12 (29,05)	0,0303
Triglicéridos, mg/dL	116,23 (81,42)	89,84 (60,23)	0,0762

<b>Localización de la trombosis, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	40 (66,66%)	-	-
<b>TEP</b>	14 (23,33%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	6 (10%)	-	-
<b>TEV recurrente, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	8 (13,33%)	-	-
<b>TEP</b>	0 (0%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	3 (5%)	-	-

Las variables continuas son presentadas como la media y la desviación estándar. Las variables categóricas son presentadas como la cantidad y el porcentaje. Las diferencias en las variables continuas entre pacientes y controles fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Se consideró una relación estadísticamente significativa un *P*-valor < 0,05.

### 3.3.2.2. Determinación de parámetros bioquímicos

Los niveles de TGs plasmáticos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ApoA1 y ApoB se determinaron mediante técnica enzimáticas de rutina en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital.

### 3.3.2.3. Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de proteínas

El procesado y tratamiento de las muestras se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del SCSIE de la Universidad de Valencia, según protocolos estandarizados. Para la identificación inequívoca y la cuantificación absoluta (mediante la generación de curvas de calibrado) de las proteínas candidatas para esta fase de validación, 2 péptidos específicos de cada una de ellas fueron sintetizados y adquiridos en el Servicio de Química de Proteínas del CNB - CSIC de la RED de laboratorios de la Comunidad de Madrid.

La técnica escogida para esta fase de validación fue la LC-MS/MS en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), la cual proporciona actualmente la mayor sensibilidad, robustez y selectividad para la cuantificación de proteínas en muestras complejas.

Antes del análisis del total de muestras, se realizó una prueba de puesta a punto de la técnica, en la que se evaluó la señal analítica de los péptidos adquiridos en las muestras plasmáticas de 10 pacientes con TEV y 10 controles sanos.

### **3.3.2.4. Validación por técnicas inmunoanalíticas**

#### **3.3.2.4.1. ELISAs comerciales**

Los niveles de RBP4 (*Retinol binding protein 4*) y LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*) fueron cuantificados utilizando ensayos inmunoenzimáticos (ELISA tipo sándwich) disponibles comercialmente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de LBP, se utilizó el kit comercial de Biometec y se analizaron las muestras por duplicado. Para el cálculo de la concentración de LBP en las muestras de plasma, se generó una curva estándar de 8 puntos realizando diluciones seriadas a 1/2 a partir de un patrón de LBP humana a una concentración de 50 ng/mL. En primer lugar, se añadieron 100  $\mu$ L de cada muestra, a una dilución 1/800 (v/v) en tampón de dilución, a cada pocillo, ya tapizado con el anticuerpo de captura. Se incubó la placa durante 1 hora en agitación suave y a temperatura ambiente. Tras la incubación, se lavó 3 veces con PBST (tampón fosfato salino con 0,05% (m/v) de Tween-20) y se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección, marcado con HRP (peroxidasa de rábano). Se dejó incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación suave. Se lavó por triplicado con PBST, se añadieron 100  $\mu$ L de disolución de sustrato a cada pocillo y se incubó la placa durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado este tiempo, se añadieron 100  $\mu$ L de solución de parada (solución *stop*) a cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de placas Victor 1420 (Wallac Oy Perkin Elmer).

En el caso de RBP4, utilizamos el kit comercial de Proteintech y también analizamos las muestras plasmáticas por duplicado. Generamos una curva estándar de 7 puntos mediante diluciones seriadas a 1/2 a partir de un patrón de RBP4 a una concentración de 1.000 pg/mL. En primer lugar, añadimos 100  $\mu$ L de cada muestra, a una dilución 1/100.000 (v/v) en diluyente de muestra, a cada uno de los pocillos tapizados con el anticuerpo de captura. Dejamos incubar durante 120 minutos a 37 °C y en agitación suave. Tras la incubación, se lavó 4 veces con tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección a cada pocillo. Se incubó la placa durante 1 hora a 37 °C y en agitación suave, y se lavó 4 veces con tampón de lavado. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de estreptavidina conjugada con HRP e incubamos la placa durante 40 minutos en agitación

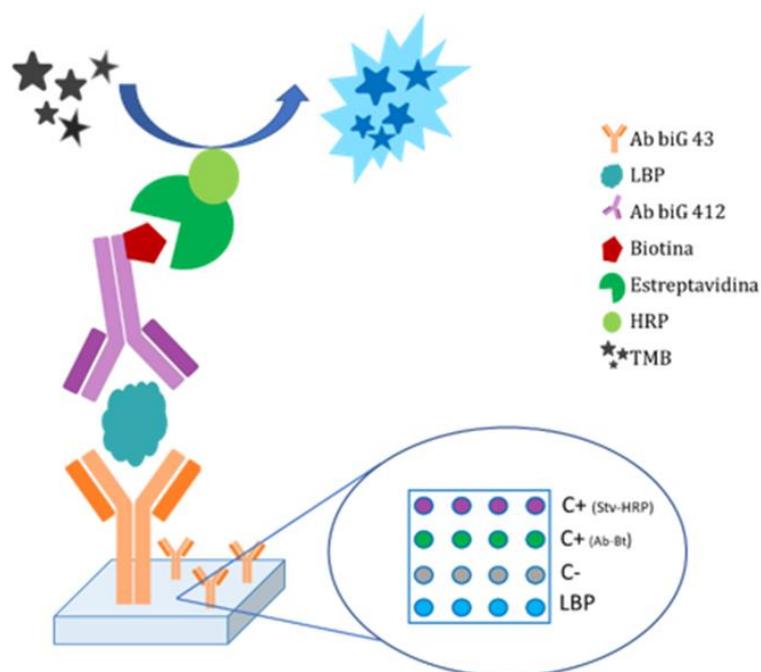
suave y a 37 °C. Posteriormente, lavamos 4 veces con tampón de lavado y añadimos 100 µL de sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a cada pocillo. Incubamos durante 15 minutos, en oscuridad, a 37 °C y en agitación suave. Tras este tiempo, detuvimos la reacción con 100 µL de solución *stop* y medimos la absorbancia a 450 nm en un lector de placas HaloLed 96 (Dynamica Scientific Ltd).

En ambos ELISAs, utilizamos la plataforma online *myassays* ([www.myassays.com](http://www.myassays.com)) para generar las curvas estándar mediante un análisis de regresión logística de 4 parámetros. Las señales analíticas de cada muestra se interpolaron en dichas curvas para obtener las concentraciones de cada una de las proteínas estudiadas.

#### **3.3.2.4.2. Puesta a punto de un inmunoensayo en DVD para la cuantificación de las proteínas candidatas**

Los niveles de LBP y de PLA2G7 (*Phospholipase A2 Group VII*) en el plasma de pacientes y controles fueron cuantificados mediante un inmunoensayo tipo sándwich en formato *microarray*, el cual utiliza anticuerpos monoclonales específicos y un disco en formato DVD (disco versátil digital) comercial de policarbonato como superficie de ensayo. Estos análisis fueron llevados a cabo en el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia.

Un esquema del inmunoensayo desarrollado para la LBP se representa en la **figura 10**.



**Figura 10.** Esquema del inmunoensayo en formato *microarray* desarrollado para la cuantificación de LBP en las muestras plasmáticas de pacientes de TEV y controles sanos.

En primer lugar, se imprimieron 50 nL del anticuerpo de captura sobre la superficie de policarbonato del DVD. En el caso de LBP, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-LBP humana (biG 43) (Biometec) a una concentración de 50 mg/L en tampón Tris 50 mM, pH 8,5. Para el PLA2G7, también denominada PAFAH (*Platelet-activating factor acetylhydrolase*), también utilizamos un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PLA2G7 humana (Cusabio) y realizamos diversas pruebas en las que variamos la concentración del anticuerpo de captura desde 45 mg/L hasta 200 mg/L. Como controles positivos (C+) empleamos una IgG de cabra anti-ratón (*GAM*) (Abcam) y una IgG de conejo biotilada (*RIgG-Bt*) (Abcam), a unas concentraciones de impresión de 25 y 4,5 mg/L respectivamente. Como control negativo (C-) utilizamos albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich). Los 4 reactivos se imprimieron en formato *microarray* (2b0 arrays de 4x4 puntos por disco), usando un dispositivo de impresión sin contacto (AD 1500, BioDot Inc.) a 25°C y con una humedad relativa del 90%. Tras la impresión, los discos se incubaron durante 16 horas a 37°C. Pasado este tiempo, los discos fueron lavados con PBST, enjuagados con agua destilada y secados por centrifugación durante 1 minuto a 1.000 revoluciones por minuto (rpm). A

continuación, añadimos 30  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras plasmáticas, previamente diluidas a 1/200 (v/v) en PBST, a cada *microarray*.

Para el cálculo de la concentración plasmática de LBP y PAF-AH en las muestras de pacientes de TEV y controles sanos, generamos dos curvas estándar de 7 puntos mediante diluciones seriadas a 1/2 a partir de un patrón de LBP humana recombinante (Biometec) a una concentración de 800 ng/mL, y un patrón de PAF-AH humana recombinante (Cloud-Clone Corp.) a 250 ng/mL.

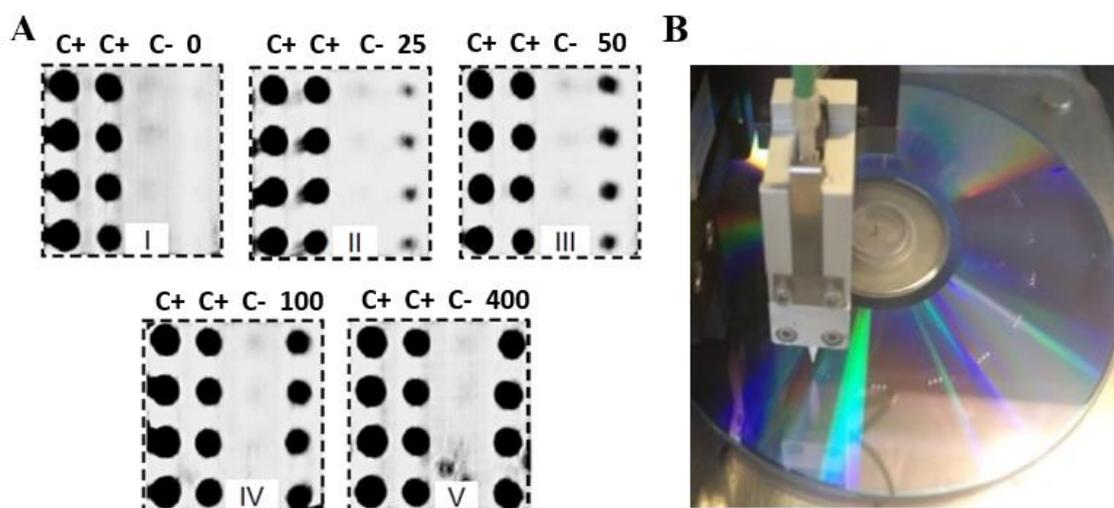
Una vez añadidas las muestras o las diferentes diluciones de la curva estándar, se dejó incubar durante 30 minutos, se lavó el disco con PBST, se enjuagó con agua destilada y se secó por centrifugación en las mismas condiciones que en el paso anterior. A continuación, se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del anticuerpo de detección a cada *microarray*. En el caso de la LBP, se utilizó, a una concentración de 20 mg/L, un anticuerpo monoclonal de ratón específico de LBP humana (biG 412) (Biometec), el cuál fue biotinilado utilizando el kit de biotinilación EZ-Link Micro NHS-PEG4 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación de PAF-AH, utilizamos un anticuerpo monoclonal de conejo biotinilado anti-PAF-AH humana (Cusabio) y probamos diferentes concentraciones entre 1 y 20 mg/L.

En ambos casos, incubamos durante 15 minutos y lavamos, enjuagamos y secamos de la misma forma que en los pasos anteriores. A continuación, añadimos 30  $\mu\text{L}$  de estreptavidina-HRP a una dilución 1/1.000 a cada *microarray*, incubamos durante 15 minutos, y lavamos y secamos el disco. Finalmente, agregamos 1 mL de solución de sustrato TMB (Dr. Fooke Labororien), la cual se distribuyó de manera homogénea por toda la superficie del DVD con la ayuda de un disco de policarbonato. Pasados 10 minutos, detuvimos la reacción lavando y secando el disco como se ha descrito anteriormente.

Las señales analíticas de los discos las obtuvimos empleando un lector de discos digitales modificado, como se describió previamente [396]. Las señales son digitalizadas y convertidas en imágenes, cada una correspondiente a una de las 20 matrices del disco, y un algoritmo de análisis de imágenes y datos identifica cada *spot* en la imagen y obtiene

los valores analíticos. Un ejemplo de las imágenes obtenidas y del proceso de impresión de las matrices en el disco se muestra en la **figura 11**.



**Figura 11.** A) Ejemplo de imágenes de las matrices obtenidas tras los análisis desarrollados en el disco. Los paneles I-V muestran los resultados de los ensayos para 0, 25, 50, 100 y 400  $\mu\text{g/mL}$  de LBP, respectivamente. B) Imagen del proceso de impresión del anticuerpo de captura en cada una de las matrices del disco.

Para el cálculo de las concentraciones de cada una de las dos proteínas, generamos las curvas estándar mediante un análisis de regresión logística de 4 parámetros con el *software* SigmaPlot 11.0. Las señales analíticas de cada muestra se interpolaron en dichas curvas para obtener las concentraciones de cada una de las proteínas estudiadas.

### 3.3.2.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (versión v.3.5.1). Las diferencias en los niveles de RBP4 y LBP en ambas poblaciones de estudio se analizó mediante un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. La correlación de ambos métodos de cuantificación de la LBP se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson y la concordancia mediante un análisis de Bland-Altman. Un análisis ROC fue llevado a cabo para evaluar la potencia estadística de ambos métodos de cuantificación de la LBP y para extraer el punto de corte "óptimo" (mediante el índice de Youden en base a sus valores de especificidad y sensibilidad) de cada uno de ellos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0,05$ .

### 3.4. Metabolómica

#### 3.4.1. Reactivos y productos químicos

Los reactivos utilizados fueron adquiridos con un grado de pureza analítico. El acetonitrilo, el ácido fórmico (99%), el agua ultrapura y los estándares internos (ISs) fenilalanina-d5, leucina-encefalina y reserpina fueron adquiridos de Merck, mientras que la cafeína-d9 la obtuvimos de Toronto Research Chemicals. La L-acetilcarnitina, la oleamida, la L-arginina y el Aldo-PC fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, y el Xestoaminol C lo obtuvimos gracias a una colaboración con el grupo del Dr. Robert A. Keyzers (*Center for Biodiscovery and School of Chemical and Physical Sciences, Victoria University of Wellington, New Zealand*).

#### 3.4.2. Fase de screening

##### 3.4.2.1. Características clínicas de los sujetos del estudio

Un total de 40 pacientes, con al menos un episodio confirmado de TEV, y 40 voluntarios sanos, pareados por edad y sexo con los pacientes, fueron reclutados para este estudio. Sin embargo, debido a problemas con el procesado y la extracción de metabolitos, las muestras de 1 paciente con TEV y de 8 controles sanos fueron descartadas. Las características clínicas de los sujetos incluidos finalmente en el estudio se muestran en la **Tabla 3**. De los 39 pacientes, 24 de ellos (61,53%) fueron diagnosticados de TVP, 8 de TEP (20,51%) y 7 (17,95%) de TVP+TEP. De los pacientes con TVP, 5 sufrieron, al menos, dos episodios trombóticos, y de los pacientes con TVP+TEP, 3 de ellos tuvieron una recurrencia.

**Tabla 3.** Características clínicas de los pacientes con TEV y los controles sanos estudiados.

	<b>TEV</b> (N=39)	<b>Controles</b> (N=32)	<b>P-valor</b>
<b>Edad, años</b>	43,56 (12,16)	34,26 (14,54)	0,0076
<b>Género masculino, N (%)</b>	13 (33,33%)	15 (46,87%)	-
<b>IMC, Kg/m<sup>2</sup></b>	26,71 (5,48)	24,35 (3,10)	0,1783

<b>Colesterol total, mg/dL</b>	213,60 (29,79)	191,20 (30,35)	0,0125
<b>Colesterol HDL, mg/dL</b>	57,86 (11,18)	56,32 (15,90)	0,1085
<b>Colesterol LDL, mg/dL</b>	110,40 (65,14)	123,63 (28,78)	0,8535
<b>Triglicéridos, mg/dL</b>	133,20 (28,75)	88,62 (40,05)	0,0824
<b>Localización de la trombosis, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	24 (61,53%)	-	-
<b>TEP</b>	8 (20,51%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	7 (17,95%)	-	-
<b>TEV recurrente, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	5 (12,82%)	-	-
<b>TEP</b>	0 (0%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	3 (7,69%)	-	-

Las variables continuas son presentadas como la media y la desviación estándar. Las variables categóricas son presentadas como la cantidad y el porcentaje. Las diferencias en las variables continuas entre pacientes y controles fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Se consideró una relación estadísticamente significativa un P-valor < 0,05.

#### **3.4.2.2. Determinación de parámetros bioquímicos**

Los niveles de TGs plasmáticos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ApoA1 y ApoB se determinaron mediante técnica enzimáticas de rutina en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital.

#### **3.4.2.3. Procesado de muestras y secuencia analítica**

El procesado y tratamiento de las muestras se llevó a cabo en la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia, según protocolos estandarizados. En primer lugar, se añadieron 150  $\mu$ L de ACN frío (0,1%, v/v) a 50  $\mu$ L de cada muestra plasmática, se agitaron en vórtex y se mantuvieron a -20 °C durante 30 min para la precipitación de las proteínas. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13.000 g, durante 10 min a 4 °C, se transfirieron 120  $\mu$ L del sobrenadante a un nuevo eppendorf y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se trasladaron 25  $\mu$ L de cada muestra a una placa de 96 pocillos y se añadieron 125  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O (HCOOH

al 0,1%, v/v) y 5  $\mu\text{L}$  de una solución de mezcla que contenía los estándares internos (20  $\mu\text{M}$ ). El control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) se preparó mezclando 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra plasmática. También se preparó un blanco reemplazando el plasma por agua ultrapura en los mismos tubos en los que se realizó la extracción de sangre, con el fin de identificar posibles artefactos del tubo, reactivos y otros materiales. Finalmente, las muestras se inyectaron aleatoriamente en el sistema cromatográfico para evitar la variabilidad intra-lote. Un QC fue inyectado cada 6 muestras para mejorar la calidad y la reproducibilidad de los datos, y el blanco se inyectó al final de la secuencia analítica. La estabilidad de las muestras y la variabilidad analítica fueron comprobadas a través de las intensidades de los estándares internos.

### 3.4.2.4. Análisis UPLC-QToF-MS

El análisis metabolómico se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC, por sus siglas en inglés) acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador QToF iFunnel Agilent 6550 (Agilent Technologies). Los analitos se separaron en una columna cromatográfica de fase reversa UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) de Waters. La temperatura del inyector automático y de la columna se mantuvo a 4  $^{\circ}\text{C}$  y 45  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, y el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$ . La fase móvil A estaba compuesta por  $\text{H}_2\text{O}$  y la fase móvil B por acetonitrilo, ambas con un 0,1 % de ácido fórmico, y los analitos fueron separados mediante un gradiente de elución a un caudal de 400  $\mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$  durante 12 minutos. La fase A se mantuvo al 98% durante 4 min, y luego disminuyó hasta el 80 % en 4 minutos y al 5% en 1 min. La fase móvil B se mantuvo al 95% durante 4 min y luego se usó un gradiente de 15 s para volver a las condiciones iniciales, las cuales se mantuvieron durante 2 min 45 s hasta la recuperación total de la columna. La adquisición de datos se llevó a cabo en modo de barrido completo (*full scan*) entre 50 y 1700  $m/z$  tanto en modo de ionización positiva como negativa. Las condiciones de ionización por *electrospray* fueron: la temperatura del gas de secado se fijó en 200  $^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de flujo de 14 L/min. La presión del nebulizador fue de 60 psi y el *sheath* gas se mantuvo a una temperatura de 350  $^{\circ}\text{C}$  y una velocidad de flujo de 11  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los QCs también fueron analizados mediante los modos de fragmentación auto MS/MS y *all-ion* para obtener mayor información para la posterior anotación de metabolitos.

### 3.4.2.5. Procesamiento de datos

En primer lugar, los datos sin procesar fueron convertidos a formato mzXML utilizando el *software* ProteoWizard (<http://proteowizard.sourceforge.net/>). La detección e integración de picos, el filtrado de ruido y la alineación de picos se realizaron utilizando el *software* XCMS Online (<http://metlin.scripps.edu/xcms/>). El algoritmo *centWave* fue utilizado para la detección de picos con los siguientes parámetros: rango de  $m/z = 100-1700$ ,  $ppm = 10$  (definido como la desviación  $m/z$  máxima tolerada en determinaciones consecutivas), *peak width* = 3,20 (ancho de pico aproximado esperado en el espacio cromatográfico, dado como un rango en segundos), *snthresh* = 25 (punto de corte del ratio señal/ruido). Se seleccionó una diferencia mínima de 10 milidaltos (mDa) en  $m/z$  para picos con tiempos de retención (tR) superpuestos. Los valores ponderados de intensidad de cada variable identificada se calcularon utilizando la función *wMean*. La agrupación de picos se llevó a cabo utilizando el método '*nearest*' con los siguientes parámetros:  $mzVsRT=1$  y una tolerancia de RT y  $m/z$  de 6 s y 15 mDa, respectivamente. Tras la agrupación de picos, se aplicó el método *FillPeaks* con los parámetros predeterminados para completar los datos de los picos restantes. La matriz de datos generada incluyó 1.113 determinaciones moleculares ( $m/z$ , tR), identificador de la muestra (observaciones) e intensidad de los picos. Luego, el conjunto de datos se filtró de acuerdo con los siguientes criterios de garantía de calidad: coeficiente de variación < 30% en los QCs y la presencia de la variable en el 60% de las muestras de, al menos, uno de los grupos comparados. Antes del análisis estadístico, las intensidades de los picos se normalizaron mediante una aproximación de múltiples estándares internos.

### 3.4.2.6. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (versión v.3.5.1). Se realizaron 3 análisis estadísticos con el objetivo de seleccionar aquellas variables capaces de diferenciar entre pacientes con TEV y controles sanos.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA, por sus siglas en inglés) validado mediante una aproximación de validación cruzada iterativa de siete repeticiones utilizando el software Simca 14.1 (Sartorius Stedim Biotech). La validez y solidez de los modelos se evaluó mediante los parámetros  $R^2(Y)$  (bondad de ajuste del modelo) y  $Q^2(Y)$  (capacidad predictiva del modelo). La calidad de  $Q^2(Y)$  se valoró mediante un análisis CV-ANOVA. Los valores

de los *intercepts*  $R^2(Y)$  y  $Q^2(Y)$  del test de permutaciones de 1.000 repeticiones se usaron para evaluar si el modelo estaba sobreajustado. Las variables más discriminantes fueron seleccionadas según sus valores de la Importancia de la Variable en la Proyección (VIP, por sus siglas en inglés  $>1.0$ ) y un intervalo de confianza *jackknife* que no incluía el 0.

También realizamos un modelo de regresión logística con penalización *Elastic Net*. Calculamos un valor lambda promedio  $\lambda$  tras 100 repeticiones, con la aproximación del modelo optimista. El análisis mostró la lista de variables que discriminaba ambos grupos de estudio.

Finalmente, llevamos a cabo un análisis no lineal alternativo utilizando el algoritmo *Random Forest*. Realizamos una predicción con 2.000 árboles, y repetimos 10 veces el análisis, tomando como resultado las variables que se repetían.

A través de estos 3 análisis estadísticos hemos intentado tener en cuenta la multifactorialidad de la enfermedad tromboembólica venosa, utilizando 3 enfoques para obtener los resultados más discriminantes.

### **3.4.2.7. Anotación de metabolitos**

La identificación de variables se realizó comparando su masa exacta con las registradas en las bases de datos *online* del *Human Metabolome Database* (HMDB) (<http://www.hmdb.ca/>) y Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) utilizando un rango de masa de  $\pm 5$  ppm. Se incluyeron los siguientes aductos: [M+H], [M+Na] y [M-H<sub>2</sub>O+H] para el modo de ionización ESI+, y [M-H], [M+HCOOH-H] y [M-H<sub>2</sub>O-H], para el modo de ionización ESI-. También comparamos los espectros de fragmentación MS/MS obtenidos con los propuestos experimentalmente en las bases de datos, lo que ayudó a una realizar una anotación más certera. Algunos metabolitos fueron completamente confirmados mediante la comparación de la masa exacta, el tR y los espectros de MS/MS obtenidos en las muestras y los generados a partir de estándares químicos disponibles comercialmente.

### **3.4.3. Fase de validación**

#### **3.4.3.1. Características clínicas de los sujetos del estudio**

Un total de 60 pacientes, con al menos un episodio confirmado de TEV, y 60 voluntarios sanos, pareados por edad y sexo con los pacientes, fueron reclutados para este estudio. Las características clínicas de los sujetos del estudio se muestran en la **Tabla 4**. De los 60 pacientes, 40 de ellos (66,66%) fueron diagnosticados de TVP, 14 de TEP (23,33%) y

6 (10%) de TVP+TEP. De los pacientes con TVP, 8 sufrieron, al menos, dos episodios, y de los pacientes con TVP+TEP, 3 de ellos tuvieron una recurrencia.

**Tabla 4.** Características clínicas de los pacientes con TEV y de los controles sanos estudiados.

	<b>TEV (N=60)</b>	<b>Controles (N=60)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Edad, años</b>	43,68 (14,37)	37,48 (14,17)	0,011
<b>Género masculino, N (%)</b>	25 (41,66%)	28 (46,66%)	-
<b>IMC, Kg/m<sup>2</sup></b>	26,32 (5,87)	23,97 (3,87)	0,071
<b>Colesterol total, mg/dL</b>	191,00 (42,22)	199,10 (38,20)	0,2422
<b>Colesterol HDL, mg/dL</b>	53,74 (13,50)	57,78 (14,90)	0,1216
<b>Colesterol LDL, mg/dL</b>	110,80 (35,50)	125,60 (29,12)	0,0281
<b>Triglicéridos, mg/dL</b>	117,00 (81,77)	89,71 (62,39)	0,0738
<b>Localización de la trombosis, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	40 (66,66%)	-	-
<b>TEP</b>	14 (23,33%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	6 (10%)	-	-
<b>TEV recurrente, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	8 (13,33%)	-	-
<b>TEP</b>	0 (0%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	3 (5%)	-	-

Las variables continuas son presentadas como la media y la desviación estándar. Las variables categóricas son presentadas como la cantidad y el porcentaje. Las diferencias en las variables continuas entre pacientes y controles fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Se consideró una relación estadísticamente significativa un P-valor < 0,05.

#### 3.4.3.2. Determinación de parámetros bioquímicos

Los niveles de TGs plasmáticos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ApoA1 y ApoB se determinaron mediante técnica enzimáticas de rutina en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital. Los marcadores de NETosis mieloperoxidasa (MPO) y calprotectina

fueron cuantificados mediante ELISAs comerciales de Abnova y Hycult Biotech respectivamente. El DNA libre circulante fue cuantificado mediante el kit Quant-iT™ PicoGreen dsDNA de Life Technologies.

#### **3.4.3.3. Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de metabolitos**

Para el presente estudio, se desarrollaron y validaron internamente dos métodos sensibles y específicos que utilizan un sistema de cromatografía UPLC acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (QqQ) Agilent 65460 (Agilent Technologies) para la cuantificación de los metabolitos confirmados en el análisis no dirigido. La preparación de la muestra se realizó con un primer paso de desproteización y un procedimiento de extracción mediante el uso de acetonitrilo o metanol (MeOH) utilizando 50 µL de plasma de cada muestra. Se emplearon dos columnas UPLC de fase reversa (Acquity BEH C18, 50 × 2,1 mm, 1,8 µm, Waters; Hypersil Gold, 50 × 2,1 mm, 1,9 µm, Thermo Scientific) y se utilizó H<sub>2</sub>O y ACN, ambos con un 0.1% de FA, como fases móviles. El análisis se llevó a cabo tanto en modo de ionización positiva como negativa y dos transiciones de MRM fueron monitorizadas para cada metabolito, para su cuantificación e identificación respectivamente.

#### **3.4.3.4. Análisis del efecto de los metabolitos en un ensayo de coagulación *in vitro***

Las propiedades coagulantes de los metabolitos seleccionados se determinaron mediante un ensayo de coagulación global *in vitro*, el TGT [353,3354]. Llevamos a cabo un ensayo de generación de trombina automatizado y calibrado (CAT, *Calibrated Automated Thrombogram*) capaz de evaluar la capacidad de una muestra de plasma para generar trombina. Para ello, 60µL de plasma de un *pool* (realizado con plasma de 19 voluntarios sanos), previamente descongelado durante 10 minutos en un baño a 37 °C, fueron añadidos a cada pocillo de una placa de 96 de base redonda (Immulon 2HB, Thermo Scientific). Al plasma incorporamos 20 µL de una solución de FT (concentración final de 4 pM) y fosfolípidos (Innovin, Dade Behring) o 20 µL de calibrador de trombina (Thrombinoscope BV) en pocillos separados. A todos los pocillos añadimos 20 µL de una solución con concentraciones crecientes de cada uno de los metabolitos seleccionados, teniendo en cuenta las concentraciones fisiológicas a las que se encuentra cada metabolito en el plasma sanguíneo del ser humano y las medias y rangos obtenidos en nuestro análisis para cada uno de ellos (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Concentraciones crecientes utilizadas en el TGT de cada uno de los metabolitos para evaluar su efecto en el estado coagulativo de una muestra de *pool* de plasma de controles sanos.

Metabolito	[1] ( $\mu\text{M}$ )	[2] ( $\mu\text{M}$ )	[3] ( $\mu\text{M}$ )	[4] ( $\mu\text{M}$ )	[5] ( $\mu\text{M}$ )	[6] ( $\mu\text{M}$ )	[7] ( $\mu\text{M}$ )	[8] ( $\mu\text{M}$ )	[9] ( $\mu\text{M}$ )	[10] ( $\mu\text{M}$ )
<b>L-Acetilcarnitina</b>	0	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	82	
<b>L-Arginina</b>	0	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	200
<b>Oleamida</b>	0	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	200
<b>Aldo-PC</b>	0	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25			

Una vez adicionados estos reactivos, la placa se incubó durante 10 min a 37 °C dentro del fluorímetro *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Labsystems). La reacción comenzó con la dispensación automática por parte del fluorímetro de 20  $\mu\text{L}$  de sustrato cromogénico (Z-Gly-Gly-Arg-aminometilcumarina (AMC)) y cloruro de calcio (Thrombinoscope BV) a cada pocillo. El fluorímetro realiza mediciones cada 15 segundos durante 45 min y toda la reacción se lleva a cabo a 37 °C. Utiliza una longitud de onda de excitación de 390 nm y de emisión de 450 nm y los trombogramas fueron obtenidos gracias al *software* Thrombinoscope (Thrombinoscope BV). De los trombogramas, los siguientes parámetros fueron automáticamente calculados: tiempo de latencia (*lag time*), tiempo al pico (*ttPeak*), área bajo la curva de generación de trombina (ETP, *endogenous thrombin potential*), pico máximo (*peak*) e índice de velocidad (*VelIndex*).

### 3.4.3.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (versión v.3.5.1). Las diferencias en las concentraciones de los 4 metabolitos en ambas poblaciones de estudio se analizaron mediante un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Realizamos un análisis ROC para evaluar la potencia estadística de cada uno de los metabolitos y un modelo de regresión logística con penalización *Elastic Net* fue llevado a cabo con los niveles de los 4 metabolitos. La potencia estadística el modelo fue evaluada mediante un análisis ROC. El grado de correlación entre los metabolitos cuantificados y las diferentes variables estudiadas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson. La influencia de las concentraciones crecientes de los metabolitos en el TGT la analizamos mediante un análisis de regresión binomial, comparando los valores para cada variable

del TGT sin y con la adición del metabolito. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0,05$ .

### 3.5. Lipidómica

#### 3.5.1. Características clínicas de los sujetos del estudio

Un total de 30 pacientes, con al menos un episodio confirmado de TEV, y 30 voluntarios sanos, pareados por edad y sexo con los pacientes, fueron reclutados para este estudio. Las características clínicas de los sujetos del estudio se muestran en la **Tabla 6**. De los 30 pacientes, 19 de ellos (63,33%) fueron diagnosticados de TVP, 7 de TEP (23,33%) y 4 (13,33%) de TVP+TEP. De estos 19 pacientes con TVP, 7 sufrieron, al menos, dos episodios, y de los 4 pacientes con TEP, 1 tuvo una recurrencia.

**Tabla 6.** Características clínicas de los pacientes con TEV y de los controles sanos estudiados.

	<b>TEV (N=30)</b>	<b>Controles (N=30)</b>	<b>P-valor</b>
<b>Edad, años</b>	45,73 (14,82)	36,67 (13,65)	0,0077
<b>Género masculino, N (%)</b>	13 (43,33%)	15 (50%)	-
<b>IMC, Kg/m<sup>2</sup></b>	26,12 (4,73)	24,72 (3,45)	0,2327
<b>Colesterol total, mg/dL</b>	205,33 (31,70)	198,88 (30,17)	0,3906
<b>Colesterol HDL, mg/dL</b>	58,93 (13,77)	56,32 (15,90)	0,3966
<b>Colesterol LDL, mg/dL</b>	125,67 (28,01)	123,63 (28,78)	0,9911
<b>Triglicéridos, mg/dL</b>	102,96 (44,19)	88,62 (40,05)	0,2362
<b>Ratio ApoB/ApoA1</b>	0,65 (0,21)	0,60 (0,18)	0,4040

<b>Localización de la trombosis, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	19 (63,33%)	-	-
<b>TEP</b>	7 (23,33%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	4 (13,33%)	-	-
<b>TEV recurrente, N (%)</b>			
<b>TVP</b>	7 (23,33%)	-	-
<b>TEP</b>	0 (0%)	-	-
<b>TVP + TEP</b>	1 (3,33%)	-	-

Las variables continuas son presentadas como la media y la desviación estándar. Las variables categóricas son presentadas como la cantidad y el porcentaje. Las diferencias en las variables continuas entre pacientes y controles fueron analizadas con el test de Mann-Whitney. Se consideró una relación estadísticamente significativa un P-valor < 0,05.

### **3.5.2. Reactivos y productos químicos**

Todos los reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítico. El isopropanol, el ACN, el formiato de amonio, el acetato de amonio, el FA (99%) y el agua ultrapura se obtuvieron de Merck, mientras que el conjunto de lípidos utilizados como estándares internos (LysoPC(17:0), PC(17:0/17:0), PE(17:0/17:0), DG(17:0/17:0), TG(17:0/17:0/17:0), CE(17:0), PG(17:0/17:0), ceramida(18:1/17:0) y FA(17:0)) fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids.

### **3.5.3. Determinación de parámetros bioquímicos**

Los niveles de TGs plasmáticos, colesterol total, colesterol HDL y LDL, ApoA1 y ApoB se determinaron mediante técnicas enzimáticas de rutina en el servicio de análisis clínicos de nuestro hospital.

### **3.5.4. Extracción de lípidos**

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia según protocolos estandarizados. Los lípidos fueron extraídos agregando 150  $\mu$ L de isopropanol frío a 50  $\mu$ L de cada muestra de plasma. La mezcla se agitó y se mantuvo a -20 °C durante 20 min para la precipitación de proteínas. Después de centrifugar a 13.000 g durante 10 min a 4 °C, se transfirieron 90  $\mu$ L del sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se agregaron 10  $\mu$ L de una solución de ISs a 20  $\mu$ M, que contenía lípidos de diferentes clases, a cada muestra. También se

preparó un QC mezclando 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra y un blanco fue utilizado para identificar posibles artefactos de los reactivos del tubo y otros materiales. Finalmente, las muestras se inyectaron aleatoriamente en el sistema cromatográfico para evitar la variabilidad intra-lote. Se inyectó una muestra de QC cada 5 muestras para mejorar la calidad y la reproducibilidad de los datos, y el blanco fue inyectado al final de la secuencia analítica. La estabilidad y la variabilidad analítica fue comprobada a través de las intensidades de los estándares internos.

### 3.5.5. Análisis UPLC-QToF-MS

Las muestras se analizaron en un sistema de cromatografía UPLC acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador QTOF iFunnel Agilent 6550 (Agilent Technologies). La separación cromatográfica de lípidos se llevó a cabo utilizando una columna cromatográfica Acquity UPLC C18 CSH (100 x 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) de Waters. El método UPLC-MS empleado fue descrito previamente por Alcoriza et al [399]. Brevemente, para el modo ESI +, las fases móviles consistieron en (A) formiato de amonio 10 mM en ACN:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v) y (B) formiato de amonio 10 mM en isopropanol:ACN 90:10 (v/v) y se utilizó un caudal de 0,4 mL/min. Para el modo ESI -, utilizamos acetato de amonio como modificador, y el caudal empleado fue de 0,6 ml/min. Las temperaturas del inyector automático y de la columna se fijaron en 4 °C y 65 °C, respectivamente, y el volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$ . La adquisición de datos de las muestras y de los QCs se llevó a cabo en modo de barrido completo (*full scan*) entre 50 y 1700 m/z con una frecuencia de barrido de 6 Hz. Algunos QCs también fueron analizados mediante DDA, con el modo de fragmentación auto MS/MS, y mediante DIA, utilizando el modo de fragmentación *all-ion*, con la finalidad de obtener mayor información para la posterior identificación de lípidos.

### 3.5.6. Procesamiento y análisis de datos

El procesamiento de los datos adquiridos de las muestras y de los QCs se realizó mediante un *script* de procesamiento interno de R (v.3.6.1) con los paquetes XCMS y CAMERA para la detección de picos, filtrado de ruido y alineamiento de picos, desarrollado en la Unidad Analítica del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de Valencia [397]. Los parámetros utilizados se seleccionaron en base a la experiencia previa en el análisis de datos similares. La matriz de datos resultante se generó incluyendo características moleculares (m/z, tR), identificador de la muestra (observaciones) e intensidades de los

picos. Luego, el conjunto de datos se normalizó mediante regresión local (o LOESS, por sus siglas en inglés) y se filtró de acuerdo con los siguientes criterios de garantía de calidad: coeficiente de variación < 30% en los QCs y la presencia de la variable en el 60% de las muestras en al menos uno de los grupos comparados.

Por otro lado, los datos de los QCs adquiridos mediante DDA y DIA se procesaron y anotaron utilizando el paquete de R *LipidMS* [399] desarrollado en la Unidad Analítica. Luego, la matriz de datos resultante se acopló con la matriz de datos obtenida para las muestras para generar el conjunto de datos final (tanto en modo positivo como negativo) con los lípidos identificados. Los valores para cada clase lipídica se calcularon como la suma de las especies lipídicas individuales pertenecientes a cada clase.

### **3.5.7. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software R (versión v.3.5.1). Las diferencias en las concentraciones de las clases y las especies lipídicas identificadas en las muestras de pacientes con TEV y de controles sanos se analizaron mediante un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Las diferencias en las concentraciones de las clases plasmáticas en pacientes con TEV con y sin retrombosis también se analizaron mediante un test de Wilcoxon-Mann-Whitney. Un modelo de regresión logística con penalización *Elastic Net* fue llevado a cabo con los niveles de las clases y las especies lipídicas identificadas en ambas poblaciones. La potencia estadística de los modelos obtenidos fue evaluada mediante un análisis ROC. El grado de correlación entre las clases lipídicas identificadas y las diferentes variables clínicas relacionadas con el metabolismo del colesterol se analizó mediante el coeficiente de correlación de *Pearson*. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con una  $P < 0,05$ .





# **RESULTADOS**



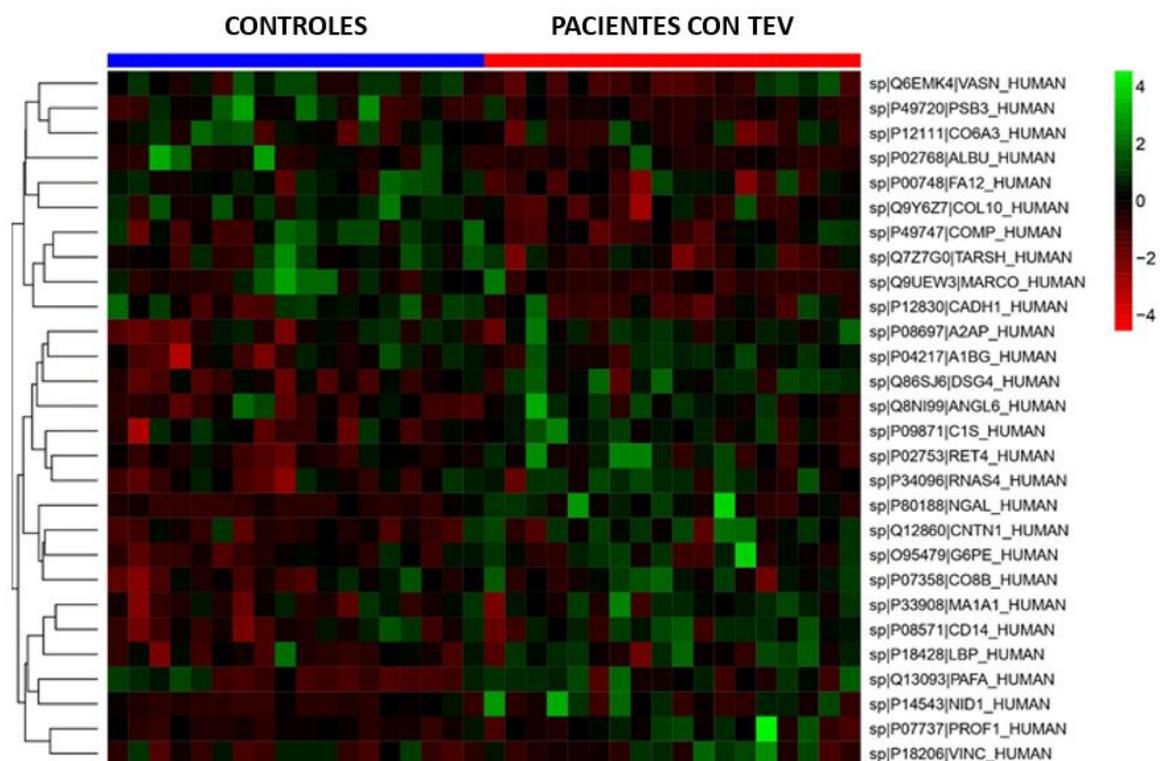
## 4. Resultados

### 4.1. Proteómica

#### 4.1.1. Fase de screening

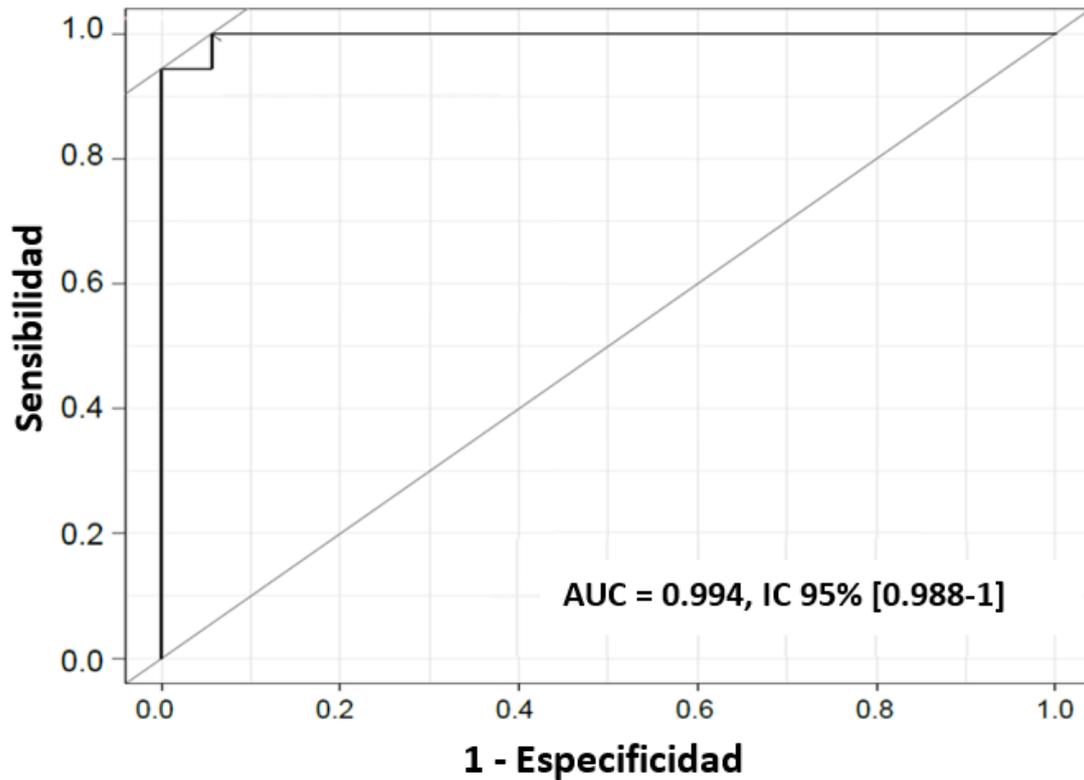
El análisis de espectrometría de masas permitió identificar y cuantificar un total de 429 proteínas en las muestras de los 18 pacientes con TEV y de los 18 controles sanos, con las condiciones de filtrado anteriormente descritas, y con una confianza mayor del 97%.

Los niveles de estas 429 proteínas fueron sometidos a un análisis de regresión logística con penalización *Elastic Net*, con el cuál obtuvimos un modelo de 28 proteínas, capaz de clasificar casi con total perfección las muestras de pacientes con TEV y de controles sanos. Los niveles relativos de las 28 proteínas se pueden visualizar en la **Figura 12** en forma de *heatmap*, en el cual es posible observar dos grupos bien diferenciados de proteínas infra- o sobreexpresadas en las muestras de pacientes respecto a las de controles.



**Figura 12.** *Heatmap* de las 28 proteínas seleccionadas en nuestro modelo. En el gráfico se representan los *fold-changes* obtenidos con los niveles de expresión proteica de los en las muestras plasmáticas de los 18 pacientes con TEV y los 18 controles sanos (verde, aumento relativo; rojo, disminución relativa).

La potencia estadística del modelo la evaluamos mediante la generación de una curva RO), con la que obtuvimos un AUC de 0,994 IC 95% [0.988-1], mostrando una potencia estadística realmente elevada (**Figura 13**).



**Figura 13.** Curva ROC y valor de AUC del modelo obtenido con los niveles plasmáticos de las 28 proteínas incluidas en el perfil.

Para explorar la función biológica de las proteínas incluidas en el modelo utilizamos las tres herramientas bioinformáticas de anotación funcional: UniProtKB, RCSB-PDB y STRING, descritas en el apartado de material y métodos. En la **tabla 7** podemos ver la principal función biológica en la que cada una de las 28 proteínas incluidas en el modelo está involucradas.

**Tabla 7.** Proteínas incluidas en nuestro modelo, número de accesoión, principal función biológica en la que intervienen y relación con la coagulación.

Nombre	Número de accesoión	Función biológica principal	Relación con la coagulación
<b>Receptor de macrófagos (MARCO)</b>	Q9UEW3	Respuesta inmune a bacterias Grampositivas y Gramnegativas	NO
<b>Albúmina (ALBU)</b>	P02768	Homeostasis y transporte molecular	SÍ
<b>Subunidad <math>\beta</math> tipo 3 del proteasoma (PSB3)</b>	P49720	Degradación proteolítica de proteínas intracelulares.	NO
<b>Vasorina (VASN)</b>	Q6EMK4	Respuesta celular	NO
<b>Cadherina-1 (CADH1)</b>	P12830	Adhesión celular	NO
<b>Cadena <math>\alpha</math>-3 de colágenos tipo VI (CO6A3)</b>	P12111	Adhesión celular y organización de la matriz extracelular	NO
<b>Proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP)</b>	P49747	Mantenimiento de la integridad estructural del cartílago	SÍ
<b>Target of Nesh-SH3 (TARSH)</b>	Q7Z7G0	Organización de la matriz extracelular	NO
<b>Colectina 10 (COL10)</b>	Q9Y6Z7	Activación del complemento	NO
<b>FXII de la coagulación (FA12)</b>	P00748	Vía intrínseca de la coagulación	SÍ
<b>Cadena <math>\alpha</math> de la glicoproteína 1B (A1BG)</b>	P04217	Degranulación de plaquetas y neutrófilos	SÍ
<b>Subcomponente C1s del complemento (C1S)</b>	P09871	Activación del complemento	SÍ
<b>Cadena <math>\beta</math> del componente C8 del complemento (CO8B)</b>	P07358	Activación del complemento	SÍ
<b><math>\alpha</math>-2 antiplasmina (A2AP)</b>	P08697	Regulación de la fibrinólisis	SÍ
<b>Proteína de unión a retinol 4 (RBP4 o RET4)</b>	P02753	Transporte del retinol	NO
<b>Proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP)</b>	P18428	Respuesta inmune a bacterias Gramnegativas	NO
<b>CD14</b>	P08571	Respuesta inmune	NO
<b><math>\alpha</math>-manosidasa 1A (MA1A1)</b>	P33908	Glicosilación de proteínas	NO
<b>Ribonucleasa 4 (RNAS4)</b>	P34096	Procesamiento del RNA	NO

<b>Vinculina (VINC)</b>	P18206	Adhesión intercelular y célula-matriz extracelular	SÍ
<b>Profilina 1 (PROF1)</b>	P07737	Organización del citoesqueleto	NO
<b>Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PE)</b>	O95479	Metabolismo glucídico	NO
<b>Proteína 4 del tipo angiopoyetina (ANGL6)</b>	Q8NI99	Diferenciación celular	NO
<b>Contactina 1 (CNTN1)</b>	Q12860	Adhesión e interacción celular	NO
<b>Desmogleína 4 (DSG4)</b>	Q86SJ6	Adhesión y señalización celular	NO
<b>Nidógeno 1 (NID1)</b>	P14543	Organización de la matriz extracelular	NO
<b>Lipocalina 2 (NGAL)</b>	P80188	Metabolismo del hierro y respuesta celular	NO
<b>Fosfolipasa A2 Grupo VII (PLA2G7 o PAF-AH)</b>	Q13093	Respuesta inflamatoria y regulación de factor activador de plaquetas (PAF)	SÍ

Identificamos un conjunto de 9 proteínas que participan en procesos relacionados con la coagulación, como la propia cascada de la coagulación, la activación plaquetaria, la activación del sistema del complemento o la fibrinólisis. En algunas de ellas es su función biológica principal y se recoge en la **tabla 7**.

Las 19 proteínas restantes no tienen una función conocida en la coagulación sanguínea participando en rutas biológicas muy variadas, como se muestra en la **tabla 8**, lo que nos llevó a pensar que estas 19 proteínas eran las candidatas ideales para ser validadas en la segunda fase del estudio.

**Tabla 8.** Número de proteínas de nuestro modelo relacionadas y no relacionadas con la coagulación y principales procesos biológicos en los que intervienen.

<p><b>9 proteínas relacionadas con la coagulación</b></p>	Cascada de la coagulación
	Degrانulación de plaquetas
	Sistema del complemento
	Fibrinolisis
<p><b>19 proteínas NO relacionadas con la coagulación</b></p>	Metabolismo glucídico
	Adhesión celular
	Degrانulación de neutrófilos
	Respuesta celular
	Glicosilación de proteínas
	Procesado de RNAs
	Diferenciación celular
	Proteólisis
	Organización de la matriz extracelular y el citoesqueleto

#### 4.1.2. Fase de validación

##### 4.1.2.1. Análisis LC-MS/MS para la cuantificación de proteínas

En esta segunda fase de validación nos propusimos confirmar la asociación con el TEV de las proteínas identificadas en la primera fase del estudio. Además de las 19 proteínas candidatas mencionadas anteriormente, también quisimos estudiar los niveles de PLA2G7 o PAF-AH, ya que, aunque la función del PAF es bien conocida en la agregación plaquetaria y en la coagulación, el papel de PAF-AH sigue siendo desconocido en el campo del TEV.

Como se ha comentado anteriormente, la técnica escogida para esta fase de validación fue la LC-MS/MS en modo de MRM, para la cual se adquirieron 2 péptidos específicos de cada una de las 20 proteínas, lo que nos proporcionaba la posibilidad de llevar a cabo un análisis cuantitativo de las proteínas.

En la puesta a punto de la técnica en la Unidad de Proteómica del SCSIE de la Universidad de Valencia, en la cual se analizaron las muestras plasmáticas de 10 pacientes con TEV y 10 controles sanos, únicamente las señales analíticas de los péptidos de 5 proteínas, mostrados en la **Tabla 9**, pudieron ser cuantificadas, ya que la mayor parte de ellos dieron señales por debajo del umbral de detección.

**Tabla 9.** Proteínas y número de muestras en las que se obtuvieron señales analíticas cuantificables de los péptidos utilizados.

<b>Proteína</b>	<b>Cuantificación</b>
<b>RBP4</b>	2 péptidos cuantificados en 19 de las 20 muestras
<b>CO8B</b>	1 péptido cuantificado en 4 de las 20 muestras
<b>LBP</b>	2 péptidos cuantificados en 12 de las 20 muestras
<b>PSB3</b>	1 péptido cuantificado en 1 de las 20 muestras
<b>CNTN1</b>	1 péptido cuantificado en 1 de las 20 muestras

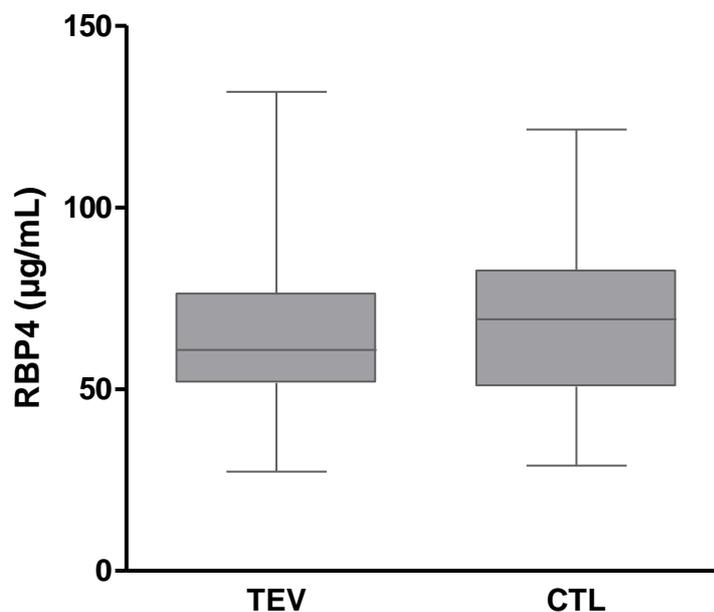
Debido a que no obtuvimos los resultados esperados mediante el análisis por espectrometría de masas, se decidió cambiar la estrategia de nuestro estudio, y analizar los niveles de 3 de las proteínas candidatas en la cohorte de validación mediante técnicas inmunoanalíticas.

#### **4.1.2.2. Cuantificación mediante técnicas inmunoanalíticas**

Estas 3 proteínas fueron LBP, RBP4 y PAF-AH, las cuales escogimos por diferentes motivos. En el caso de la LBP, por su relación con otras enfermedades cardiovasculares [398-400], por sus altas concentraciones en plasma [401-402] y por su posible relación con el cada vez más relevante concepto de inmutrombosis. [403-405]. La RBP4, también por su descrita relación con la enfermedad cardiovascular [406-409] y con la inflamación [410-412], y la PAF-AH, fue elegida por su también estudiada asociación con otras enfermedades cardiovasculares [413-416], y por lo comentado anteriormente, su desconocida relación con el riesgo de TEV, a pesar del conocido papel del PAF en la agregación plaquetaria y en la coagulación [417-419]. Otra de las razones por la que escogimos estas proteínas fue la existencia de bibliografía en la que se cuantificaban estos marcadores en plasma en otras patologías, así como la disponibilidad de ELISAs comerciales para LBP y RBP4.

**RBP4**

Los niveles plasmáticos de RBP4 en las muestras de los 60 pacientes con TEV y de los 60 controles fueron cuantificados mediante un ELISA tipo sándwich. Los pacientes mostraron niveles ligeramente inferiores (mediana 60,78  $\mu\text{g/mL}$ , RIC 51,67 – 76,30) respecto a los de controles (69,20  $\mu\text{g/mL}$ , RIC 50,72 – 82,61), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P=0,19$ ) (**Figura 14**), por lo que las diferencias encontradas en la fase de *screening* no pusieron ser validadas en esta fase.



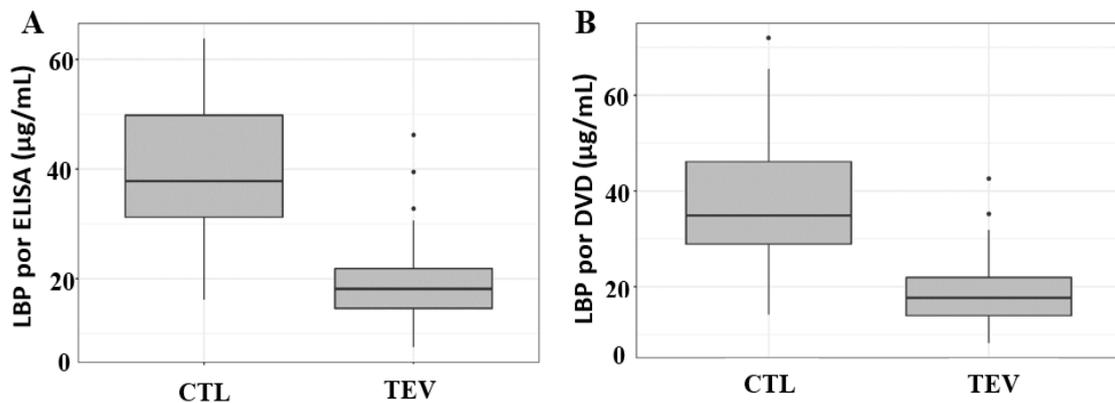
**Figura 14.** Niveles plasmáticos de RBP4 en las muestras de los 60 pacientes con TEV y 60 controles sanos.

**PAF-AH**

En el caso de PAF-AH, como se ha indicado en el apartado de Material y Métodos, la cuantificación de sus niveles plasmáticos la realizamos mediante un inmunoensayo tipo sándwich, en el que utilizamos un DVD como superficie de ensayo. Probamos diferentes concentraciones del anticuerpo de captura y del anticuerpo de detección, y realizamos diversas pruebas en las que utilizamos como antígeno tanto un patrón de PAF-AH humana recombinante como el propio plasma de los sujetos de estudio. A pesar de todos los intentos realizados, no obtuvimos señales analíticas cuantificables de la proteína, por lo que no pudimos validar los hallazgos encontrados en la primera fase del estudio.

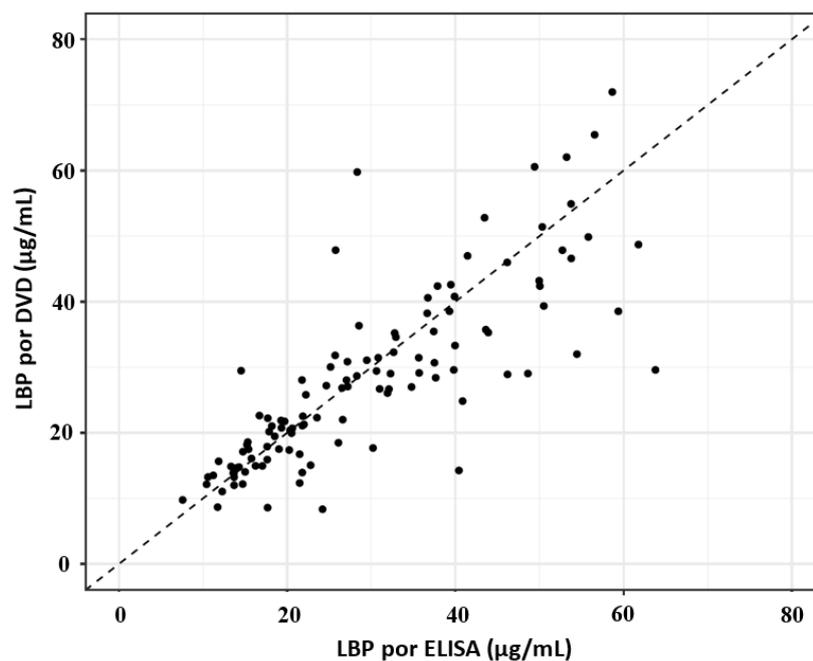
**LBP**

Los niveles de LBP fueron cuantificados tanto por ELISA comercial como por inmunoensayo en DVD. En ambos análisis, los niveles plasmáticos de LBP en controles sanos fueron significativamente superiores a los encontrados en pacientes con TEV ( $P < 0,001$ ) (**Figura 15**).



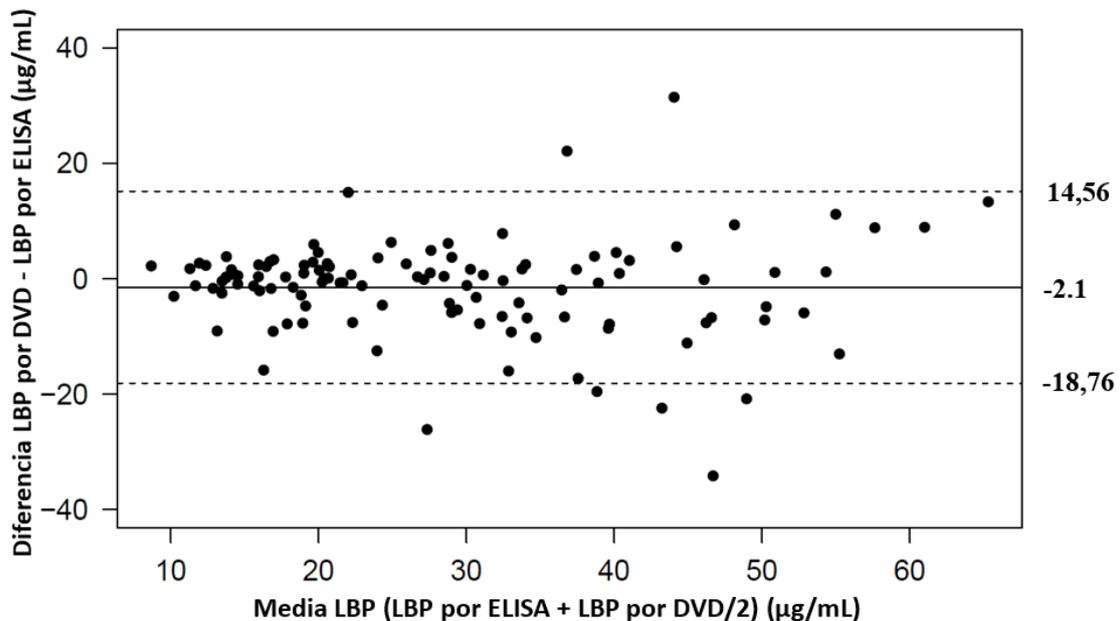
**Figura 15** Niveles plasmáticos de LBP en las muestras de controles sanos y pacientes con TEV cuantificados por **A)** ELISA e **B)** inmunoensayo en DVD.

Ambos métodos de cuantificación mostraron una alta correlación positiva, con una  $r$  de Pearson de 0.73 (IC 95% 0.63-0.81,  $P < 0,001$ ) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Diagrama de correlación entre los métodos de cuantificación de los niveles de LBP por ELISA y por el inmunoensayo en DVD.

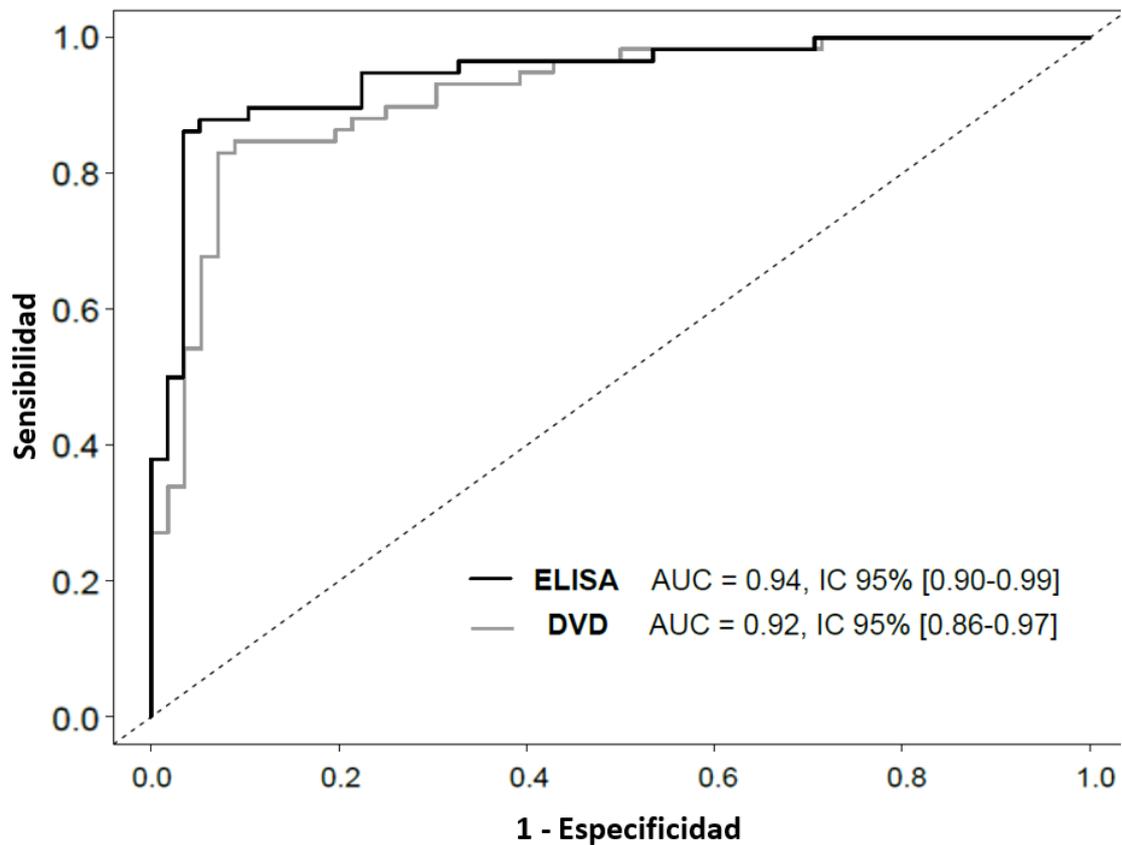
Además, también analizamos la concordancia de ambas técnicas mediante un gráfico del Bland-Altman (**Figura 17**), un método de representación gráfica de datos que permite comparar dos técnicas de medición sobre una misma variable cuantitativa.



**Figura 17.** Gráfico de Bland-Altman que mide la concordancia entre la cuantificación de los niveles de LBP por ELISA y por el inmunoensayo en DVD.

En el gráfico podemos ver como la diferencia media de cada muestra entre ambos métodos (bias) se sitúa muy cercana al 0, concretamente, en -2,1, lo que indica que ambos métodos han realizado cuantificaciones muy similares. En este caso, el valor de -2.1 muestra que, en promedio, el ELISA mide 2.1  $\mu\text{g/mL}$  más que el inmunoensayo en DVD. Los límites de concordancia (bias  $\pm$  1,96 SD), -18,76 y 14,56 en nuestro caso, establecen el rango en el que se encuentran aproximadamente el 95% de las diferencias entre ambos métodos. Ambos límites se sitúan a una distancia aceptablemente cercana al bias, lo que indica una alta concordancia entre ambas técnicas de cuantificación.

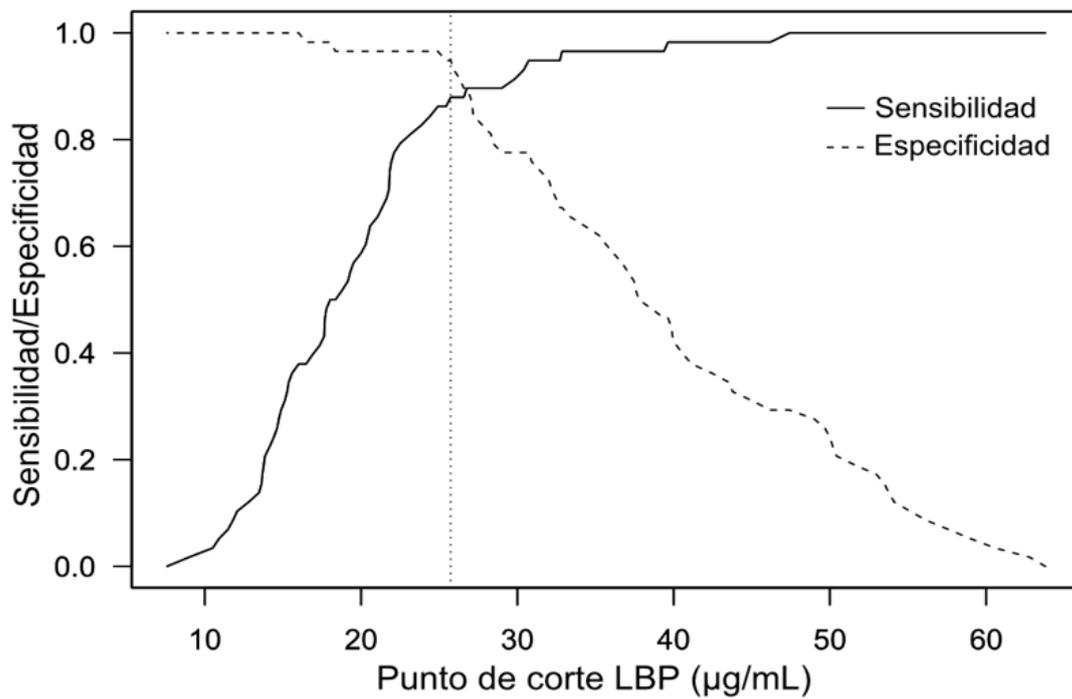
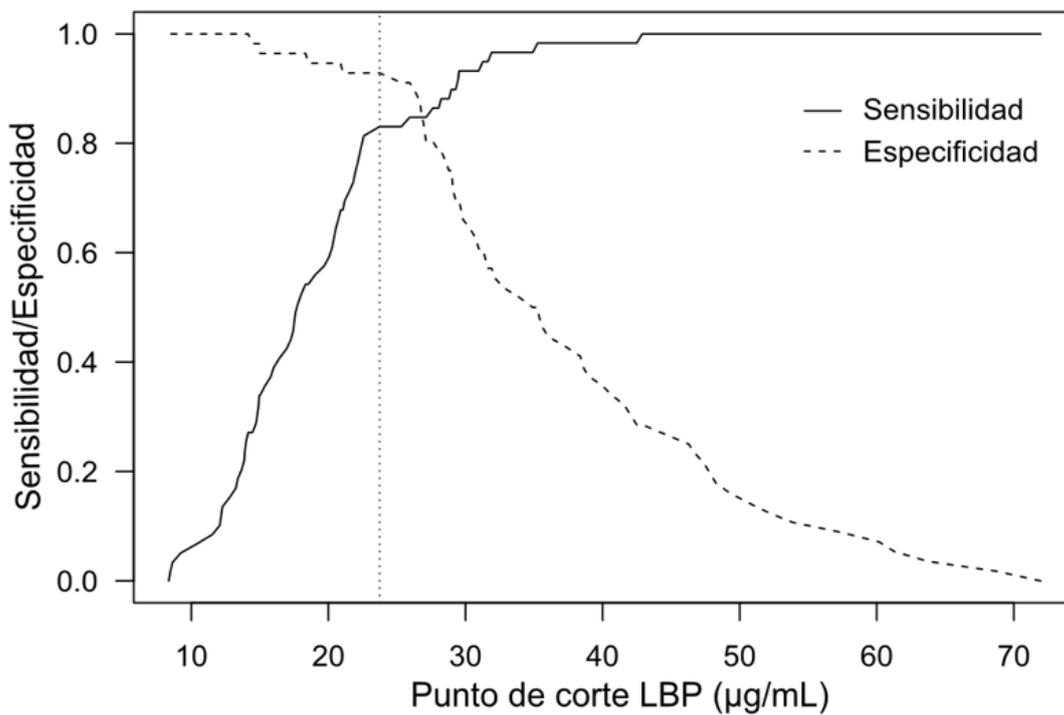
A continuación, realizamos un análisis ROC con los valores plasmáticos de LBP obtenidos tanto por ELISA como por el inmunoensayo en DVD (**Figura 18**).



**Figura 18.** Curvas ROC y valores de AUC obtenidas con los niveles de LBP de pacientes con TEV y controles sanos cuantificados mediante las dos técnicas utilizadas.

El ELISA mostró una potencia estadística ligeramente superior a la del inmunoensayo en DVD, con una AUC de 0,94 [IC 95% 0,90-0,99] y 0,92 [IC 95% 0,86-0,97], respectivamente.

Para cada uno de los dos métodos de cuantificación, generamos un gráfico en el que se puede visualizar como varían la sensibilidad y la especificidad en función del punto de corte de la LBP (**Figura 19**).

**A) ELISA****B) DVD**

**Figura 19.** Gráficos en los que se representa la evolución de la sensibilidad y la especificidad de ambas técnicas de cuantificación, **A)** ELISA y **B)** inmunoensayo en DVD, en función de cuál sea el punto de corte de LBP para diferenciar pacientes con TEV y controles sanos.

El punto de corte ``óptimo`` para cada ensayo lo obtuvimos mediante el cálculo del índice de Youden ( $J = \text{sensibilidad} + \text{especificidad} - 1$ ). Los valores de sensibilidad y especificidad de cada uno ellos se muestran en la **tabla 10**.

**Tabla 10.** Puntos de corte ``óptimos`` de LBP y valores de sensibilidad y especificidad de cada una de las dos técnicas de cuantificación utilizadas.

<b>Método de cuantificación</b>	<b>Punto de corte LBP (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>
<b>ELISA</b>	25.74	0.88	0.95
<b>Inmunoensayo en DVD</b>	23.78	0.83	0.93

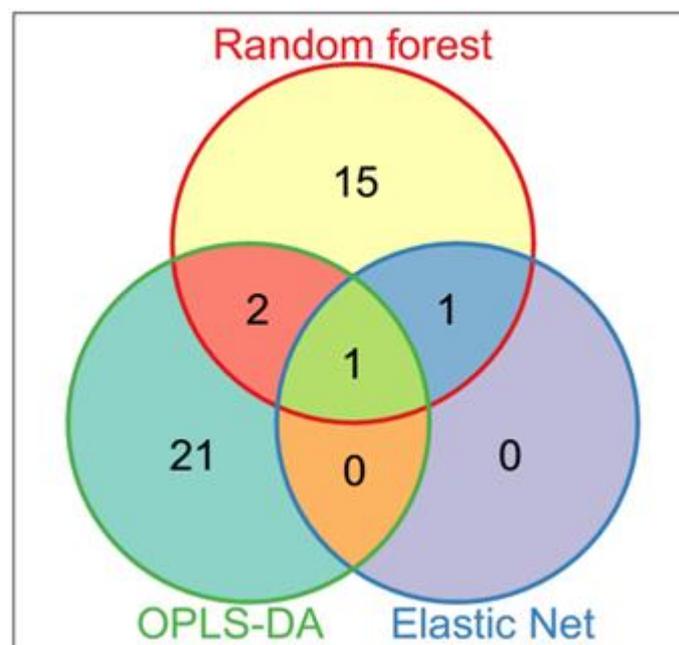
## 4.2. Metabolómica

### 4.2.1. Fase de screening

El objetivo de esta primera fase del estudio fue la determinación de aquellos metabolitos con niveles alterados entre ambas poblaciones de estudio, y su identificación experimental para su validación en la posterior fase del análisis.

El análisis de espectrometría de masas no dirigido, tras el procesamiento, la normalización y el filtrado de datos según los criterios anteriormente comentados realizados en la Unidad Analítica del IIS La Fe, permitió detectar y cuantificar un total de 1.113 variables en las muestras de los 39 pacientes con TEV y los 32 controles sanos.

Los niveles de abundancia de estas 1.113 variables fueron sometidos a 3 análisis estadísticos distintos (*Elastic Net*, *OPLS-DA* y *Random Forest*) con la finalidad de encontrar aquellas variables con más poder discriminante entre ambas poblaciones de estudio. En total, 40 de las variables identificadas mostraron estar relacionadas con el riesgo de TEV. En la **figura 20** podemos observar la distribución de las variables discriminantes obtenidas por cada método, así como el número de aquellas coincidentes entre dos o incluso los 3 análisis estadísticos.



**Figura 20.** Diagrama de Venn que representa el número de variables relacionadas con el TEV obtenidas con cada uno de los 3 métodos estadísticos.

A continuación, se analizó cuáles de estas 40 variables podían ser metabolitos reales mediante la comparación de su masa y su espectro de fragmentación con los de metabolitos ya descritos en el metaboloma humano en las bases de datos de HMDB y Metlin.

Tras este proceso de anotación metabolómica, 5 variables fueron identificadas como posibles metabolitos conocidos: L-Arginina, L-Acetilcarnitina, Xestoaminol C, Oleamida y Aldo-PC.

La identidad de estos 5 metabolitos se confirmó mediante la comparación del tR y de los espectros de fragmentación obtenidos a través del análisis de espectrometría de masas no dirigido, con los adquiridos a través del análisis de sus estándares químicos comerciales, empleando el mismo método y condiciones cromatográficas. La **tabla 11** muestra los metabolitos identificados y sus principales características.

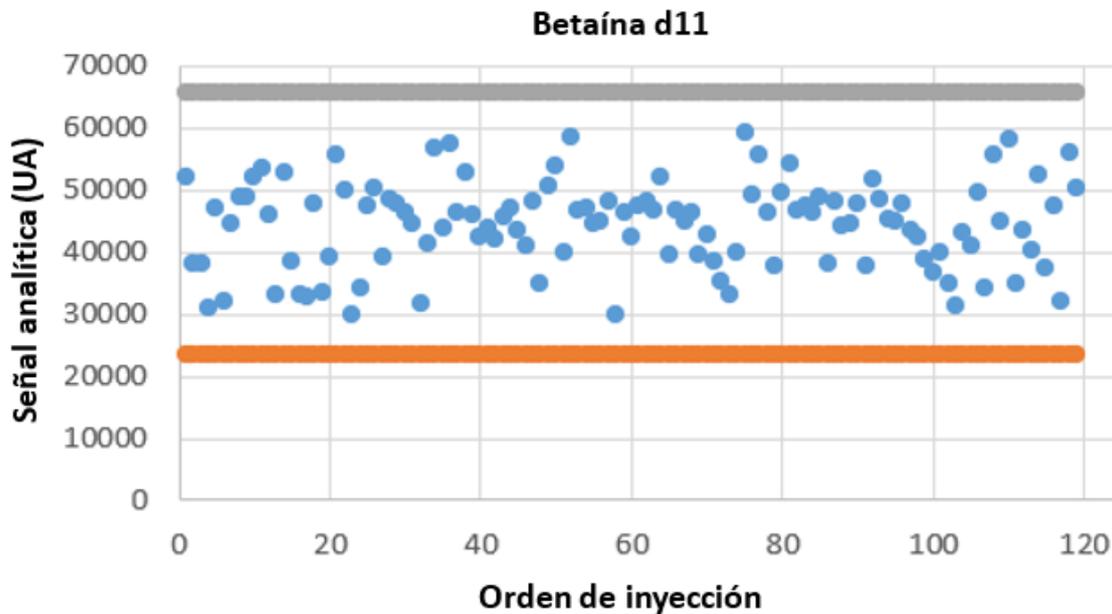
**Tabla 11.** Metabolitos identificados tras el proceso de anotación de variables en HMDB y Metlin, y sus principales características.

Metabolito	Nombre químico	Masa (m/z)	tR (min)	Aducto	Fórmula
L-Arginina	(S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid	175,1195	0,58	M+H	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
L-Acetilcarnitina	3-(Acetyloxy)-4-(trimethylammonio) butanoate	204,1239	0,79	M+H	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub>
Xestoaminol C	1-deoxytetra-decaphinganine	230,2485	6,75	M+H	C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> NO
Oleamida	9-Octadecenamide	282,2792	8,90	M+H	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO
Aldo-PC	1-palmitoyl-2-(9-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine	650,4398	8,71	M+H	C <sub>33</sub> H <sub>64</sub> NO <sub>9</sub> P

#### 4.2.2. Fase de validación

La validación experimental de los 5 metabolitos identificados como potenciales biomarcadores de TEV fue llevada a cabo mediante análisis de espectrometría de masas dirigido, empleando un sistema LC-MS/MS con las condiciones anteriormente descritas, en el cual se analizaron las muestras plasmáticas de 60 pacientes con TEV y de 60 controles sanos.

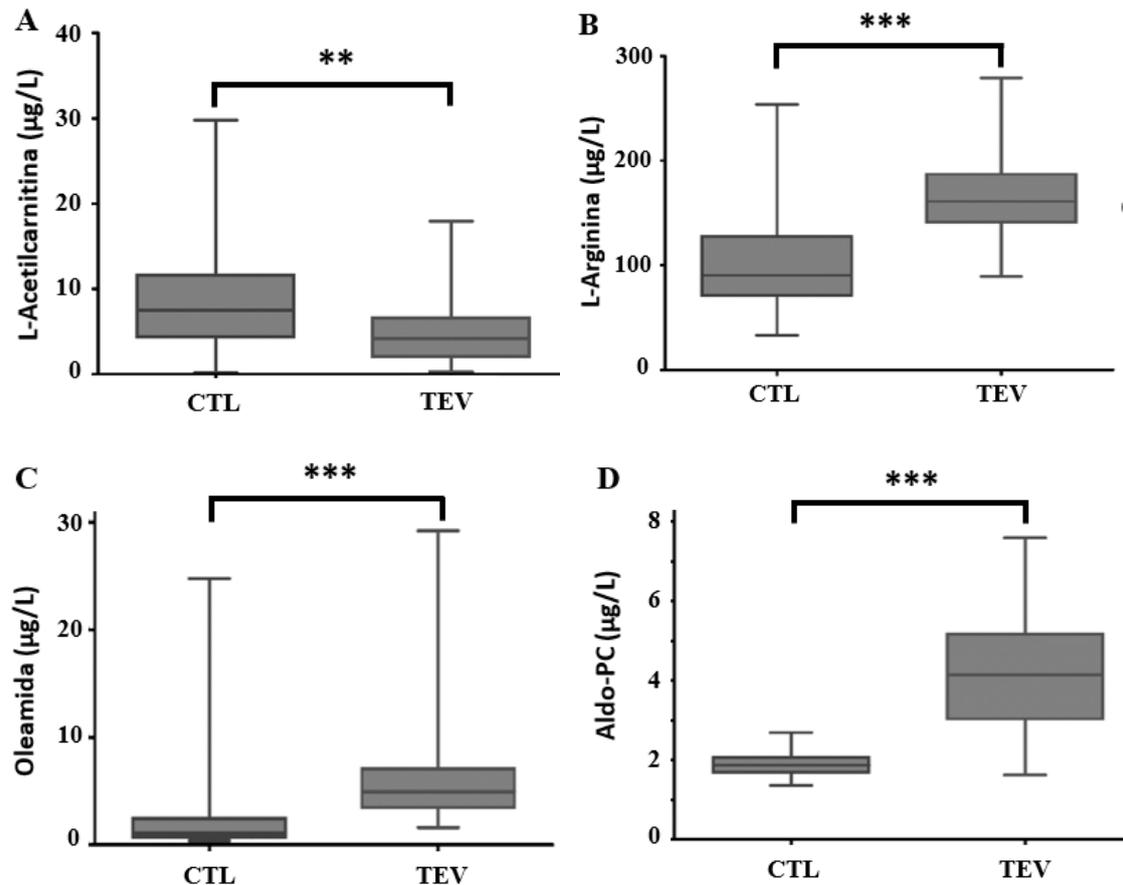
Para garantizar la fiabilidad, la correcta preparación de la muestra y la estabilidad del análisis, se inyectó un patrón interno (Betaína d11) en todas las muestras, el cuál mantuvo una variabilidad óptima durante toda la secuencia analítica (CV=15%) (**Figura 21**).



**Figura 21.** Señal analítica del patrón interno Betaína d11 obtenida en función del orden de inyección en cada una de las muestras analizadas. La línea superior gris y la inferior naranja hacen referencia a los valores críticos calculados máximo y mínimo, respectivamente (media  $\pm$  3 DE).

Además, los estándares químicos de los 5 metabolitos identificados fueron utilizados para la generación de rectas de calibrado, en las cuales interpolamos las señales analíticas de las muestras de pacientes y controles para la obtención de resultados cuantitativos (concentraciones absolutas.). Solamente en el caso del Xestoaminol C, las respuestas de área obtenidas no pudieron interpolarse en la recta de calibrado y no pudimos obtener concentraciones absolutas. Los valores de este metabolito en plasma son muy bajos y debería desarrollarse un método específico para este compuesto que logre optimizar tanto desde su extracción de la muestra como su determinación a concentraciones por debajo de 1 ng/mL.

En los 4 metabolitos estudiados obtuvimos niveles plasmáticos con diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles (**Figura 22**).

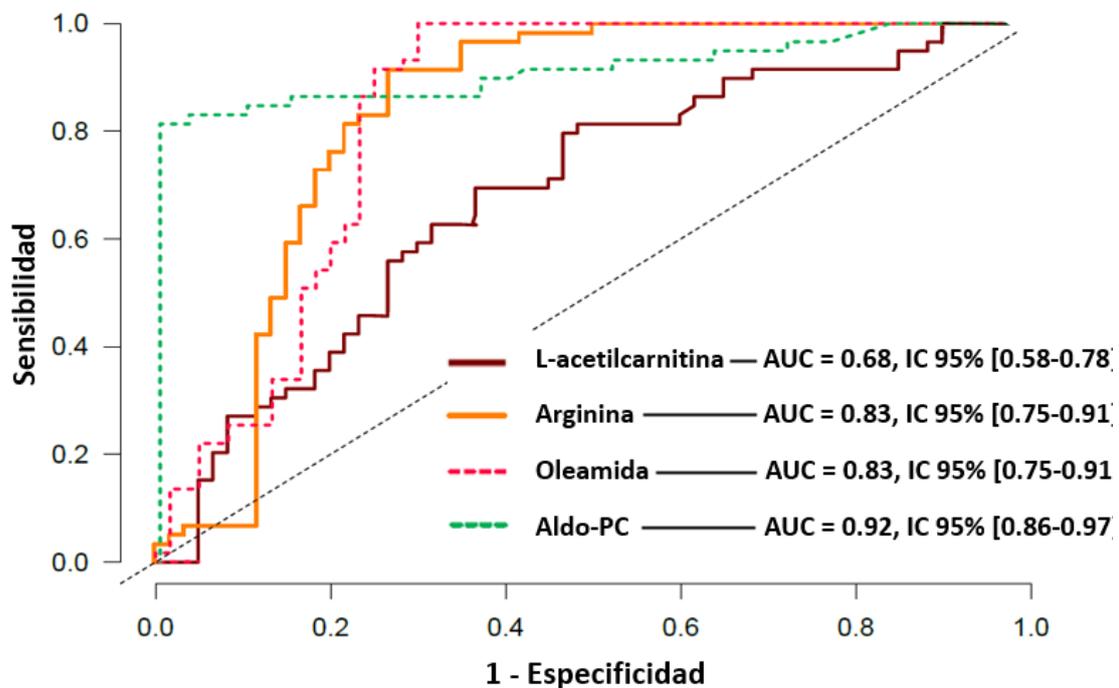


**Figura 22.** Niveles plasmáticos en las muestras de controles sanos y pacientes con TEV de los 4 metabolitos estudiados en la fase de validación: **A)** L-Acetilcarnitina, **B)** L-Arginina, **C)** Oleamida, **D)** Aldo-PC. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

La L-Acetilcarnitina mostró niveles más elevados en controles sanos que en pacientes, sugiriendo así un posible efecto protector frente al TEV. La L-Arginina, la Oleamida y el Aldo-PC, por su parte, mostraron niveles más elevados en pacientes con TEV que en controles, por lo que podrían estar asociados con un mayor riesgo trombótico.

A continuación, se calculó el AUC, como estimador de la capacidad de diferenciar pacientes y controles, asociada a cada metabolito. Obtuvimos unos valores de AUC = 0,68 [IC 95% = 0,58-0,78] para la L-Acetilcarnitina; AUC = 0,83 [IC 95% = 0,75-0,91] para la L-Arginina; AUC = 0,83 [IC 95% = 0,75-0,91] para la Oleamida; y AUC = 0,92 [IC 95% = 0,86-0,97] para el Aldo-PC.

En la **figura 23** se muestran las curvas ROC obtenidas para cada uno de los metabolitos, y los parámetros extraídos en el análisis.



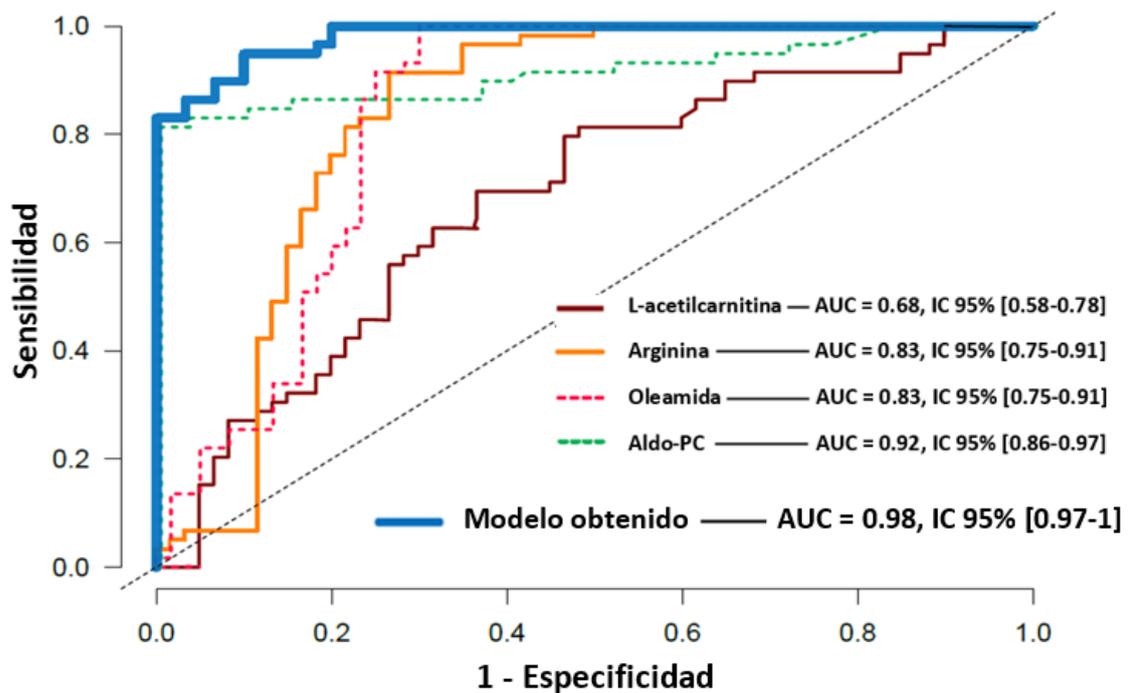
**Figura 23.** Curvas ROC y valores de AUC obtenidas con los niveles plasmáticos de pacientes con TEV y controles sanos de cada uno de los 4 metabolitos analizados.

Como podemos observar, los 4 metabolitos mostraron una elevada potencia estadística para clasificar ambas poblaciones de estudio; si bien es cierto, cabe destacar la excelente capacidad discriminante que manifestó el Aldo-PC, con un AUC de 0,92.

El siguiente paso fue realizar un análisis de regresión logística, ajustado por edad, género e IMC, con los niveles conjuntos de los 4 metabolitos, lo que nos permitió obtener un modelo capaz de separar pacientes con TEV y controles sanos que aprovechaba y combinaba el poder discriminante de cada una de las 4 moléculas estudiadas. Obtuvimos el siguiente modelo, donde  $\text{Pr}(\text{TEV})$  hace referencia a la probabilidad de pertenecer al grupo de pacientes con TEV:

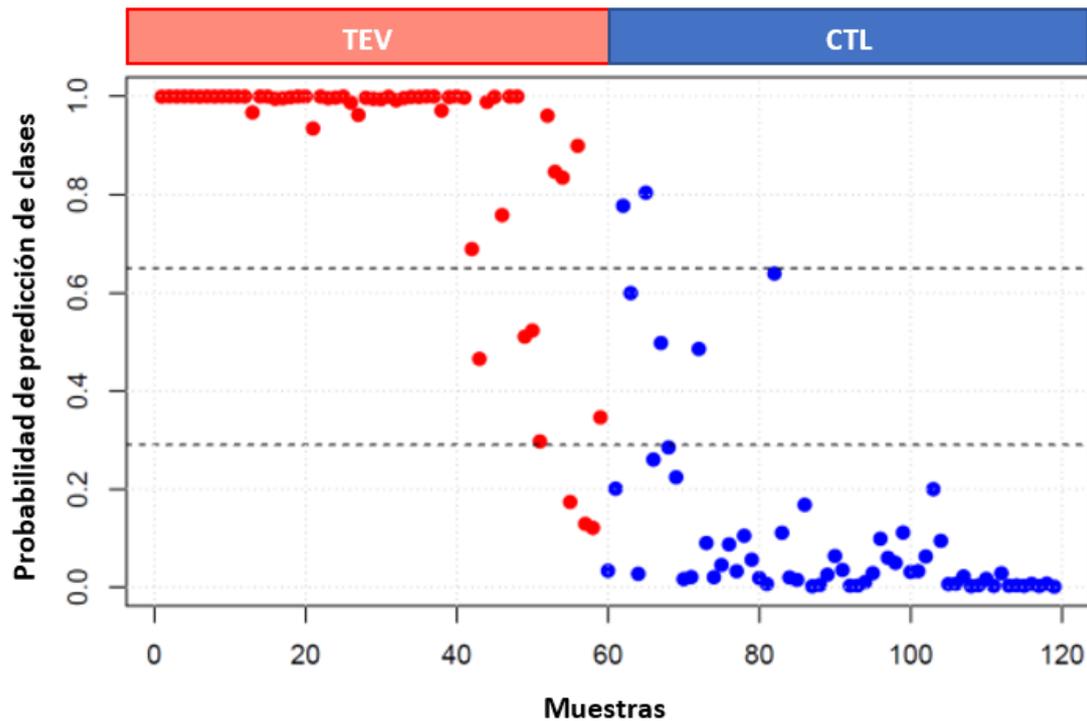
$$\text{Pr}(\text{TEV}) = \frac{e^{-12.06 - 0.085 * L\text{-acetylcarnitine} + 0.029 * \text{arginine} + 0.117 * \text{oleamide} + 3.177 * \text{aldoPC}}}{1 + e^{-12.06 - 0.085 * L\text{-acetylcarnitine} + 0.029 * \text{arginine} + 0.117 * \text{oleamide} + 3.177 * \text{aldoPC}}}$$

En la **figura 24** vemos la curva ROC obtenida con este modelo, comparada con las generadas para los 4 metabolitos por separado, apreciando como la potencia estadística del modelo es considerablemente superior, llegando a alcanzar un AUC de 0,98 [IC 95% = 0,97 – 1].



**Figura 24.** Curva ROC y valor de AUC del modelo obtenido al analizar conjuntamente los niveles de los 4 metabolitos estudiados en pacientes con TEV y controles sanos, comparada con las adquiridas con cada uno de los 4 metabolitos por separado.

También generamos un gráfico de predicción de probabilidad de clases en el que representamos la probabilidad de cada individuo estudiado de pertenecer a un grupo u otro según la capacidad predictiva de nuestro modelo (**Figura 25**).

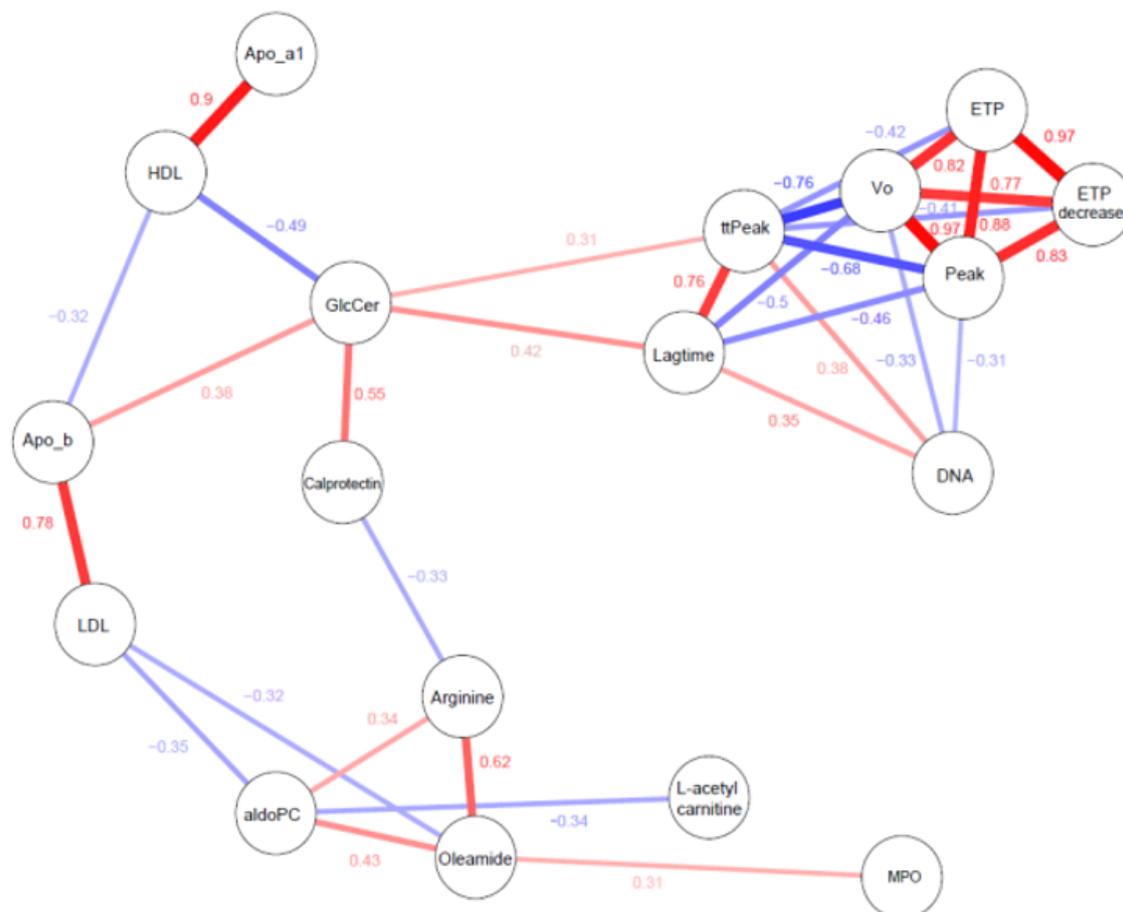


**Figura 25.** Gráfico de predicción de probabilidad de clases del modelo obtenido con los niveles de los 4 metabolitos cuantificados en las muestras plasmáticas de los 60 pacientes con TEV y 60 controles sanos.

Un valor de 1 representa una probabilidad del 100% de pertenecer al grupo de pacientes, mientras que el 0 representa una probabilidad del 100% de pertenecer al grupo de controles sanos. Según nuestro modelo, el 86.66% de los pacientes con TEV y el 90% de los controles fueron correctamente clasificados, mientras que el 5% de los pacientes (Falsos negativos ó FN) y el 3.33% de los controles (Falsos positivos ó FP) fueron asignados al grupo de estudio erróneo. El 8.33% restante de pacientes y 6.66% de controles fueron indistinguibles y no pudieron ser clasificados en ninguno de los dos grupos. Estos parámetros estadísticos son otra muestra de la gran fortaleza y robustez de la asociación de nuestro modelo con la presencia de TEV.

Analizamos además el grado de correlación entre los metabolitos estudiados, diferentes parámetros clínicos, variables de un ensayo global de la coagulación como es el TGT, y marcadores de inflamación, apoptosis y NETosis. Como podemos observar en la **figura 26**, existe una fuerte correlación positiva entre la L-Arginina y la Oleamida, así como, aunque más débil, entre el Aldo-PC y los dos metabolitos mencionados. Además, también advertimos que la L-Acetilcarnitina y el Aldo-PC estaban correlacionados negativamente.

En cuanto a los parámetros del TGT, ninguno de ellos presentó correlación con nuestros metabolitos. Sin embargo, dos moléculas relacionadas con la inflamación, apoptosis y NETosis, como son la calprotectina y la mieloperoxidasa, sí mostraron estar correlacionadas con dos de ellos. La calprotectina presentó una correlación negativa con la L-Arginina, mientras que la mieloperoxidasa estaba correlacionada positivamente con la Oleamida. El colesterol LDL también mostró una correlación negativa con la Oleamida y el Aldo-PC.



**Figura 26.** Red de correlaciones realizado entre los metabolitos analizados, variables clínicas, parámetros del TGT y, marcadores de inflamación, apoptosis y NETosis. Las líneas rojas representan correlación positiva y las líneas azules correlación negativa. El grosor de la línea, así como el valor indicado (coeficiente de correlación) hace referencia a la fortaleza de la correlación (valores comprendidos entre 0-1, siendo 1 la correlación total).

### 4.2.3. Análisis del efecto de los metabolitos en el test de generación de trombina

Por último, analizamos si alguno de los 4 metabolitos de nuestro modelo tenía algún efecto *in vitro* sobre la coagulación. Para ello añadimos cada uno de los metabolitos de forma individual y en concentraciones crecientes al plasma de un pool de controles sanos, y llevamos a cabo el TGT en estas muestras.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

#### L-Acetilcarnitina

Tras realizar el análisis estadístico, observamos que la L-Acetilcarnitina mostró tener efecto sobre 3 de los parámetros del TGT analizados: el Lagtime, el ttPeak y el ETP (**Tabla 12**).

**Tabla 12.** Resultados de las variables del TGT obtenidas tras el análisis del pool de plasmas de controles sanos sin y con concentraciones crecientes de L-Acetilcarnitina.

Metabolito	Variable	Coefficiente	Error estándar	IC 95%		P-valor
L-Acetyl-carnitina	Lagtime	0,095	0,016	0,064	0,127	<0,001***
	Peak	0,060	0,031	0,001	0,118	0,092
	ttPeak	0,043	0,011	0,022	0,064	0,007**
	VelIndex	0,064	0,045	- 0,022	0,149	0,192
	ETP	0,060	0,019	0,022	0,097	0,008**

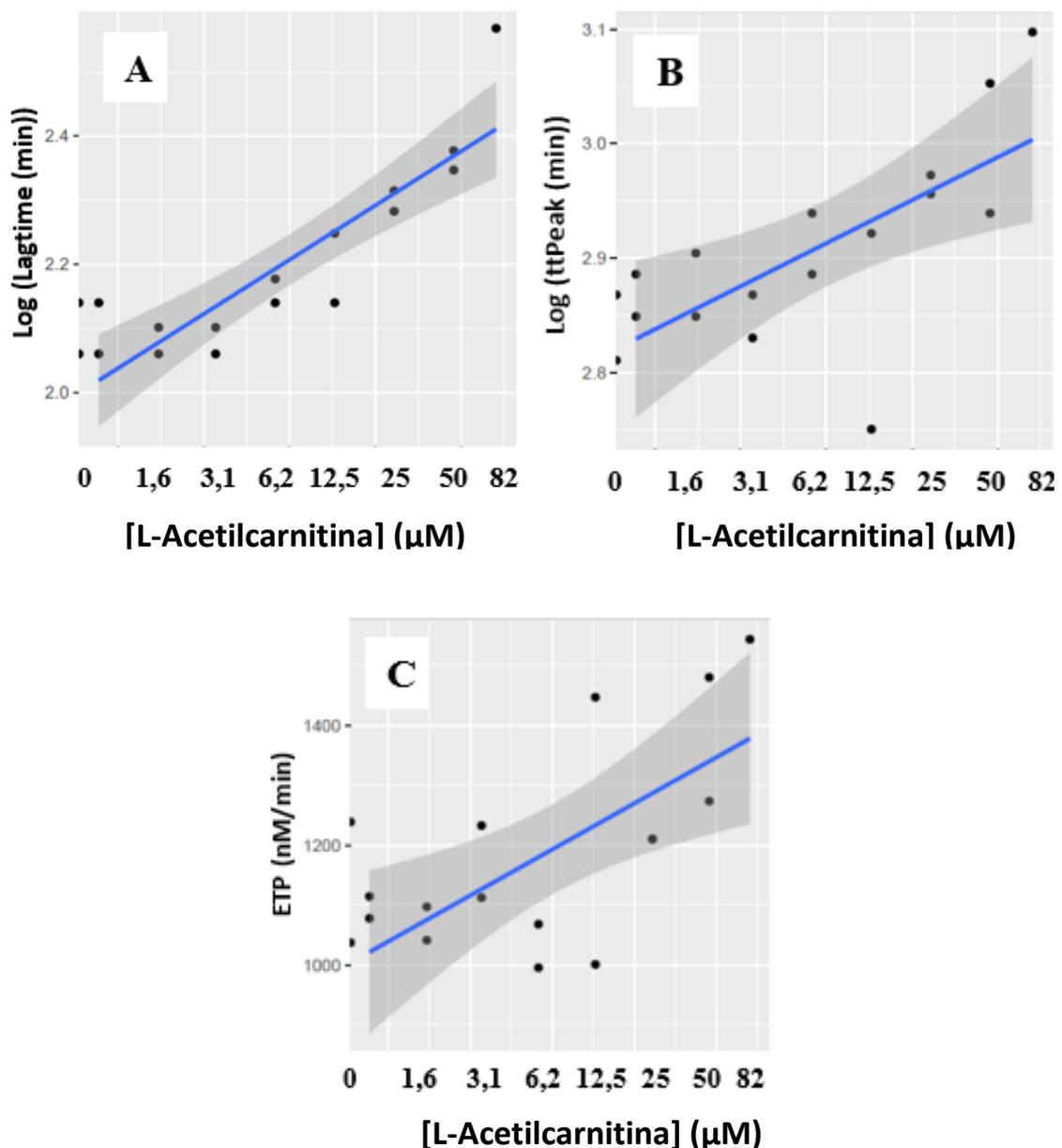
\*: P<0,05; \*\*: P<0,01; \*\*\*: P<0,001.

El Lagtime hace referencia al momento en el que comienza a generarse trombina en la muestra de plasma tras la adición del sustrato cromogénico. En la **figura 27** podemos ver como el Lagtime aumentó conforme aumentamos la concentración de L-Acetilcarnitina (P<0,001).

Un efecto similar ocurrió con el ttPeak, variable que mide el tiempo que transcurre hasta que se alcanza la concentración máxima de trombina generada (Peak), el cual también aumentó conforme incrementamos la concentración de L-Acetilcarnitina (P=0,007). En el caso del ETP, un parámetro que evalúa la cantidad total de trombina generada,

observamos como la L-Acetilcarnitina hacía aumentar su valor conforme utilizamos mayores concentraciones ( $P=0,008$ ).

Respecto al Peak (un indicador del pico máximo o concentración máxima de trombina generada) y al VelIndex (un indicador de la pendiente de la curva y de la velocidad máxima de producción de trombina), ambos mostraron una evolución similar con la adición de L-Acetilcarnitina. La adición creciente del metabolito hizo aumentar ligeramente los valores de ambos parámetros, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 27.** Variaciones en el A) Lagtime, B) ttPeak y C) ETP del pool de plasmas de controles sanos en función de la concentración de L-Acetilcarnitina utilizada.

**L-Arginina**

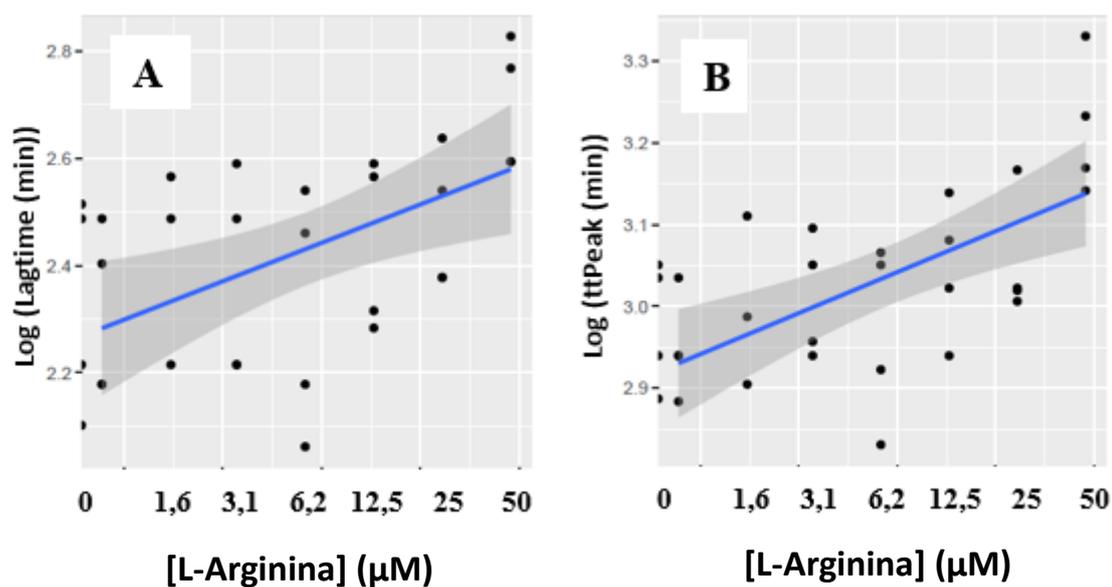
La L-Arginina afectó significativamente los valores del Lagtime ( $P=0,035$ ) y el ttPeak ( $P=0,006$ ) (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Resultados de las variables del TGT obtenidas tras el análisis del pool de plasmas de controles sanos sin y con concentraciones crecientes de L-Arginina.

Metabolito	Variable	Coefficiente	Error estándar	IC 95%		P-valor
L-Arginina	Lagtime	0,080	0,034	0,013	0,146	<b>0,035*</b>
	Peak	0,040	0,069	-0,095	0,175	0,563
	ttPeak	0,052	0,016	0,021	0,084	<b>0,006**</b>
	VelIndex	0,018	0,078	-0,135	0,171	0,819
	ETP	0,032	0,066	-0,096	0,161	0,628

\*:  $P<0,05$ ; \*\*:  $P<0,01$ ; \*\*\*:  $P<0,001$ .

En ambos casos, los dos parámetros aumentaron sus tiempos conforme incrementamos la concentración del metabolito (**Figura 28**). El VelIndex, Peak y el ETP no se vieron afectados por la adición del aminoácido.



**Figura 28.** Variaciones en el A) Lagtime y B) ttPeak del pool de plasmas de controles sanos en función de la concentración de L-Arginina utilizada.

## Oleamida

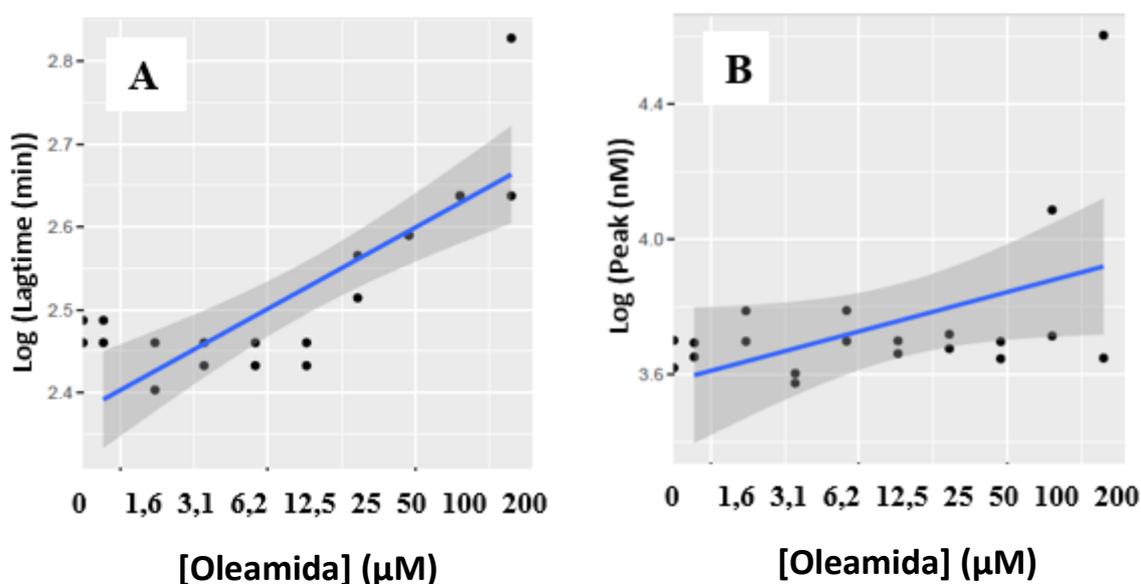
En cuanto a la oleamida, también mostró tener influencia sobre el estado coagulativo del plasma sanguíneo en el TGT. Concretamente, afectó significativamente a 4 de los 5 parámetros estudiados: el Lagtime, el Peak, el ttPeak y el ETP (**Tabla 14**).

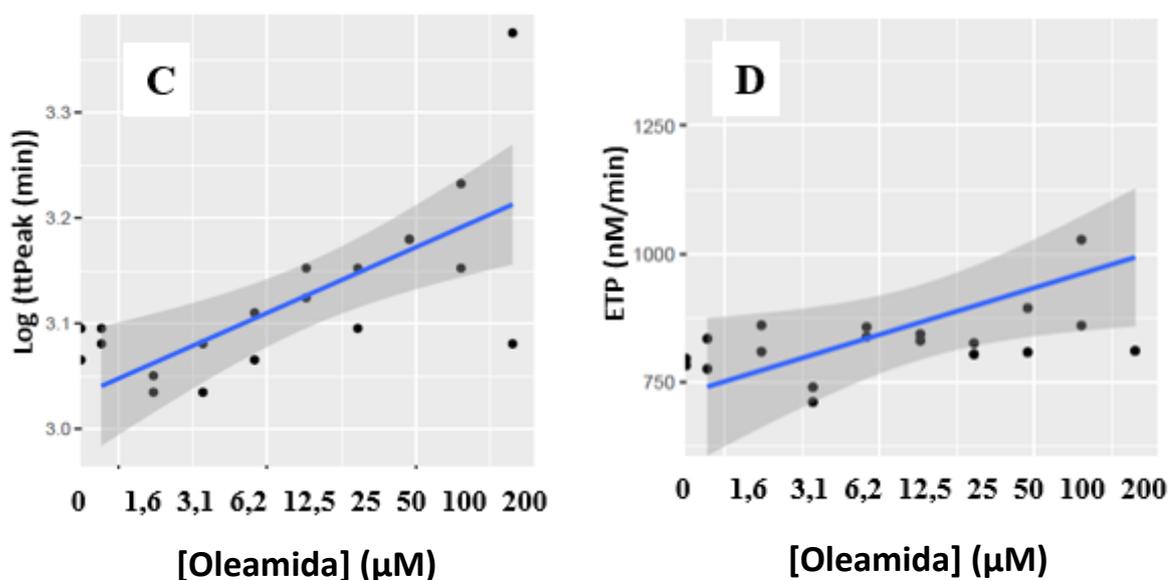
**Tabla 14.** Resultados de las variables del TGT obtenidas tras el análisis del pool de plasmas de controles sanos sin y con concentraciones crecientes de oleamida.

Metabolito	Variable	Coficiente	Error estándar	IC 95%		P-valor
<b>Oleamida</b>	<b>Lagtime</b>	0,049	0,010	0,030	0,069	<b>&lt;0,001***</b>
	<b>Peak</b>	0,062	0,027	0,009	0,114	<b>0,035*</b>
	<b>ttPeak</b>	0,032	0,008	0,017	0,047	<b>&lt;0,001***</b>
	<b>VelIndex</b>	0,054	0,039	- 0,022	0,129	0,185
	<b>ETP</b>	0,048	0,017	0,015	0,081	<b>0,009**</b>

\*: P<0,05; \*\*: P<0,01; \*\*\*: P<0,001.

Al igual que con los dos anteriores metabolitos, el Lagtime y el ttPeak también aumentaron progresivamente conforme utilizamos concentraciones crecientes de oleamida (P<0,001) (**Figura 29**). Un efecto similar se produjo con el Peak (P=0,035) y con el ETP (P=0,009). En el caso del VelIndex no observamos cambios significativos con la adición del metabolito.





**Figura 29.** Variaciones en el A) Lagtime, B) Peak, C) ttPeak y D) ETP del pool de plasmas de controles sanos en función de la concentración de oleamida utilizada.

### Aldo-PC

La adición de concentraciones crecientes de Aldo-PC no produjo ninguna modificación significativa sobre ninguno de los parámetros estudiados del TGT (**Tabla 15**). Aunque sí pudimos observar una cierta tendencia ascendente del ETP conforme aumentamos la concentración del metabolito, estas diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas.

**Tabla 15.** Resultados de las variables del TGT obtenidas tras el análisis del pool de plasmas de controles sanos sin y con concentraciones crecientes de Aldo-PC.

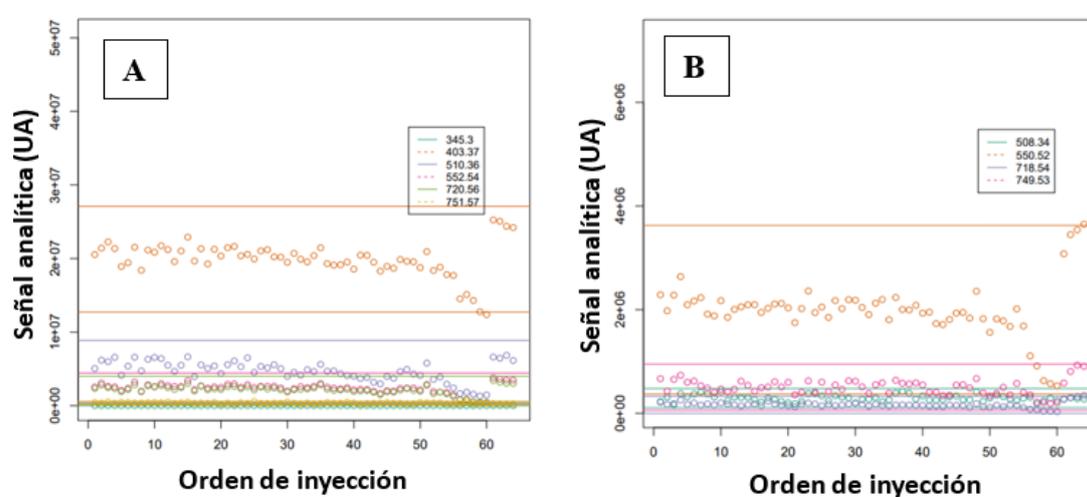
Metabolito	Variable	Coficiente	Error estándar	IC 95%		P-valor
Aldo-PC	Lagtime	-0,007	0,029	-0,062	0,048	0,818
	Peak	0,094	0,054	-0,009	0,196	0,14
	ttPeak	0,006	0,016	-0,026	0,037	0,74
	VelIndex	0,074	0,054	-0,03	0,178	0,233
	ETP	0,091	0,036	0,022	0,16	0,052
	StartTail	0,001	0,013	-0,024	0,026	0,948

\*: P<0,05; \*\*: P<0,01; \*\*\*: P<0,001.

### 4.3. Lipidómica

#### 4.3.1. Análisis lipidómico

La preparación de las muestras y la fiabilidad y estabilidad en la secuencia analítica fueron verificadas mediante la evaluación de las señales analíticas de los ISs, las cuales no presentaron desviaciones ni variaciones remarcables a lo largo de la secuencia (**Figura 30**). Los datos obtenidos al final de la secuencia no se tuvieron en cuenta ya que corresponden a los ISs adquiridos mediante DDA, con el modo de fragmentación auto MS/MS, y mediante DIA, utilizando el modo de fragmentación *all-ion*.

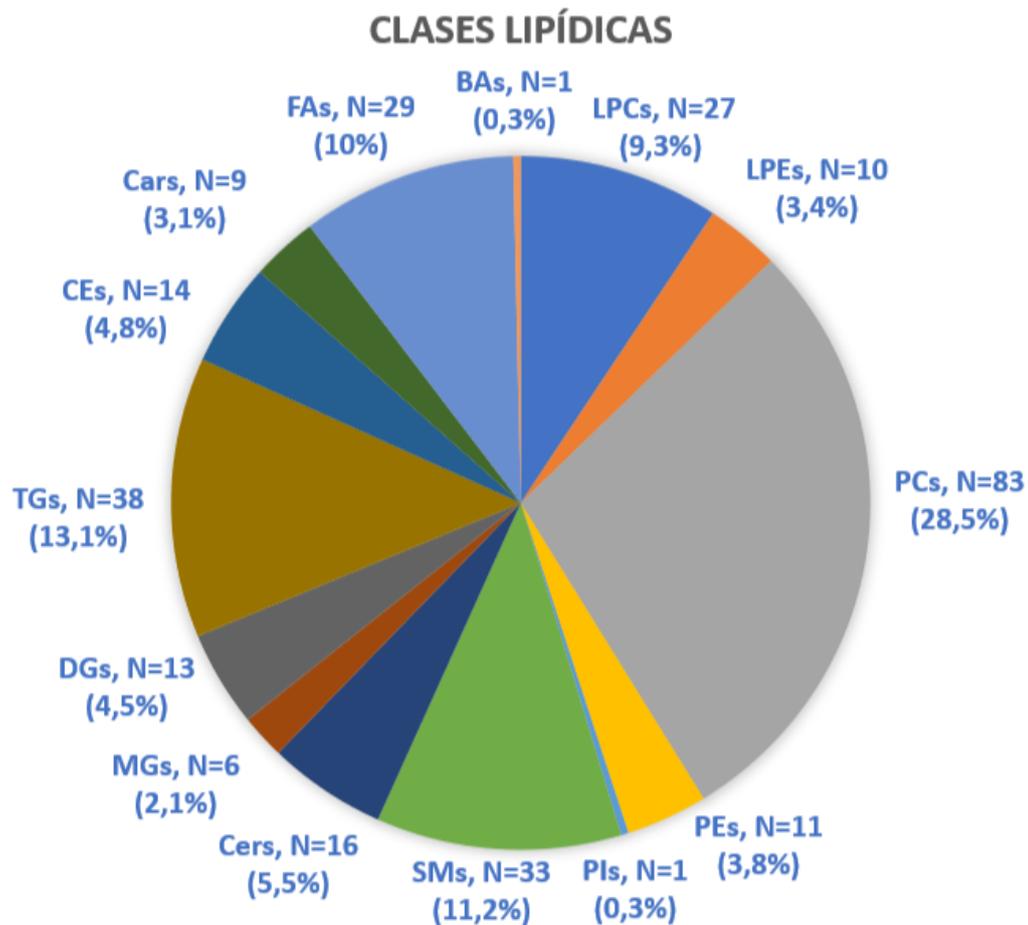


**Figura 30.** Señales analíticas de los ISs empleados para el modo **A)** ESI + y **B)** ESI – en cada una de las muestras analizadas en función del orden de inyección. La línea superior e inferior de cada uno de los ISs hacen referencia a los valores críticos calculados máximo y mínimo, respectivamente ( $\text{media} \pm 3 \text{ DE}$ ).

Como resultado del procesamiento de datos y la alineación de picos, y tras la normalización por regresión local y el filtrado según los diferentes criterios de garantía de calidad, obtuvimos un conjunto de datos (sumando los modos de ESI + y ESI -) con un total de 2884 variables. De estas 2884 variables, 291 fueron identificadas como especies lipídicas, pertenecientes a 14 clases lipídicas diferentes (**Tabla 16**) (**Figura 31**). El análisis estadístico se realizó sobre esta matriz de datos siguiendo la estrategia descrita anteriormente.

**Tabla 16.** Clases lipídicas y número de especies lipídicas identificadas en las muestras plasmáticas de pacientes con TEV y controles sanos.

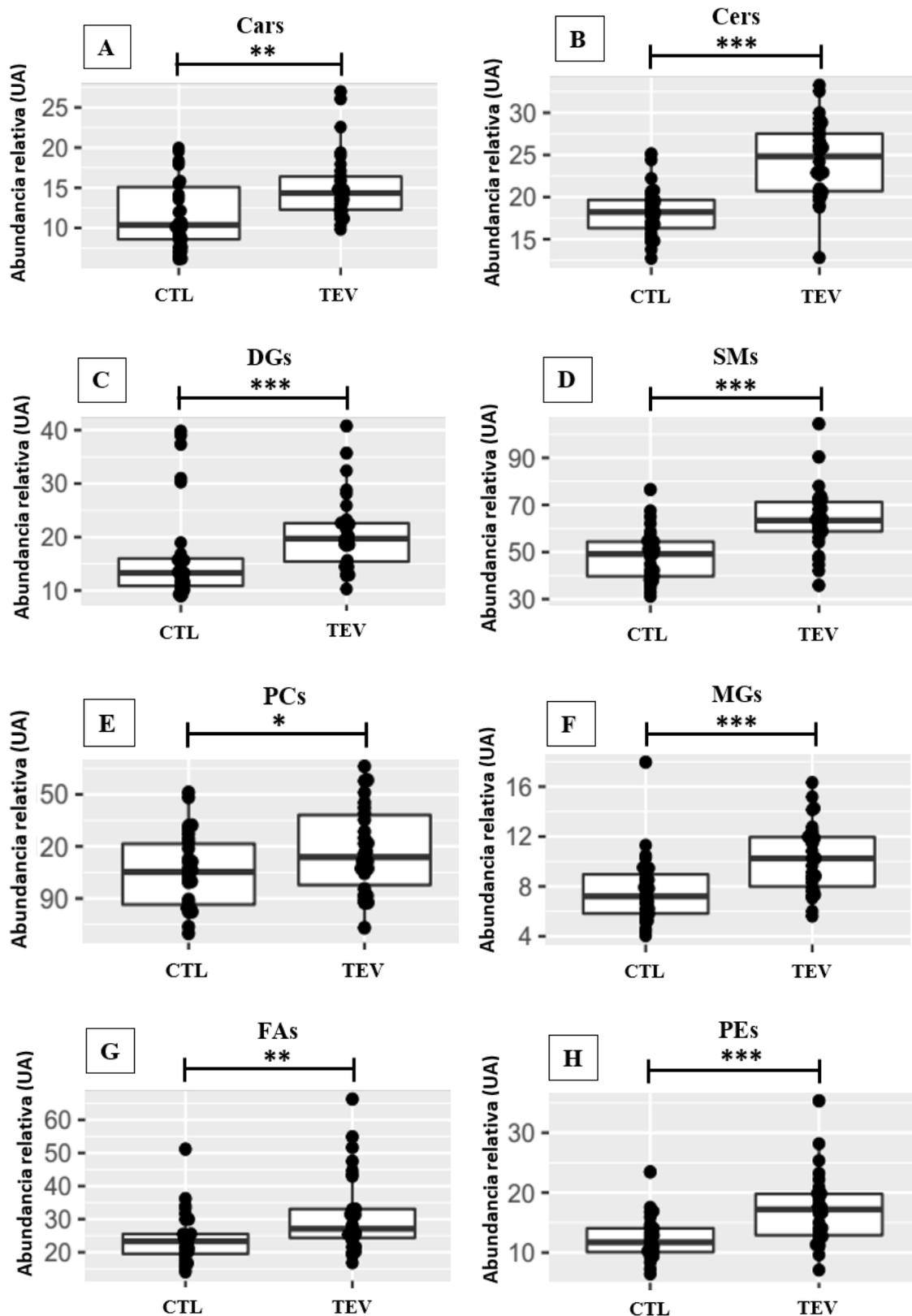
<b>Tipo lipídico</b>	<b>Clase lipídica</b>	<b>Número de especies</b>
Fosfolípidos	Lisofosfatidilcolinas (LPCs)	27
	Lisofosfatidiletanolaminas (LPEs)	10
	Fosfatidilcolinas (PCs)	83
	Fosfatidiletanolaminas (PEs)	11
	Fosfatidilinositoles (PIs)	1
Esfingolípido	Esfingomielinas (SMs)	33
	Ceramidas (Cers)	16
Lípidos neutros	Monoglicéridos (MGs)	6
	Diglicéridos (DGs)	13
	Triglicéridos (TGs)	38
	Ésteres de colesterol (CEs)	14
	Carnitinas (Cars)	9
	Ácidos grasos libres (FAs)	29
	Ácidos biliares (BAs)	1
	<b>Total</b>	<b>291</b>



**Figura 31.** Gráfico de la distribución de las especies lipídicas identificadas en las muestras plasmáticas de pacientes con TEV y controles sanos agrupadas por clases de lípidos. Además, se muestra la abundancia relativa (%) de cada una de las clases lipídicas identificadas en el análisis.

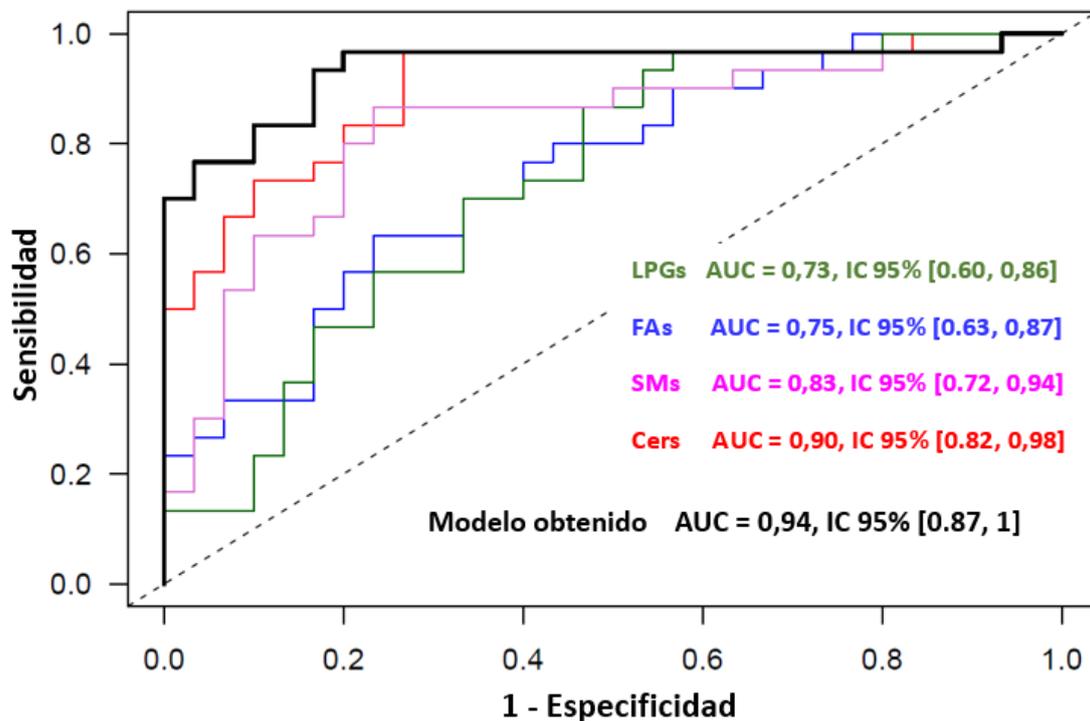
#### 4.3.2. Diferencias lipídicas entre pacientes con TEV y controles sanos

Las diferencias entre las cantidades relativas de los lípidos identificados en las muestras de pacientes con TEV y controles fueron analizadas utilizando el test de Wilcoxon para muestras pareadas. De las 14 clases lipídicas obtenidas, 8 presentaron niveles diferenciales entre ambas poblaciones. Obtuvimos niveles aumentados de Cars ( $P=0,003$ ), Cers ( $P<0,001$ ), DGs ( $P<0,001$ ), SMs ( $P <0,001$ ), PCs ( $P=0,040$ ), MGs ( $P<0,001$ ), FAs ( $P=0,004$ ) y PEs ( $P<0,001$ ), en pacientes con TEV en comparación con controles sanos (**Figura 32**). Las seis clases restantes (LPCs, LPEs, PIs, TGs, CEs y BAs) no mostraron diferencias significativas (Figura no mostrada).



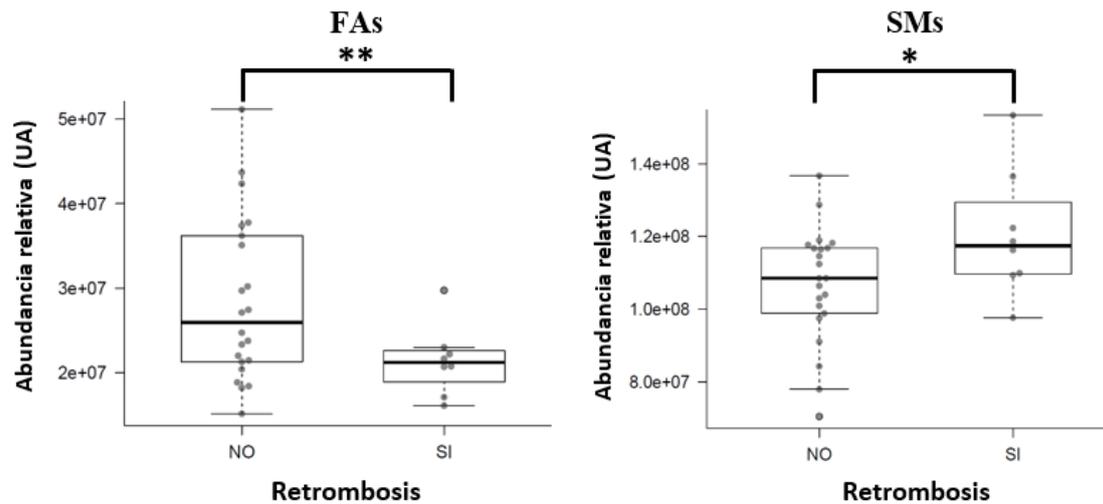
**Figura 32.** Niveles de abundancia relativa de las clases lipídicas que han mostrado diferencias significativas entre controles sanos y pacientes con TEV: **A)** Cars, **B)** Cers, **C)** DGs, **D)** SMs, **E)** PCs, **F)** MGs, **G)** FAs y **H)** PEs. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

A continuación, realizamos un análisis de regresión logística, con el objetivo de identificar un perfil lipídico asociado al TEV. Para ello calculamos el riesgo de TEV utilizando los niveles de abundancia relativa de las 14 clases lipídicas identificadas. Obtuvimos un modelo asociado al TEV que incluyó 4 de estas clases: Cers, FAs, LPGs y SMs, el cual mostró una potencia estadística muy elevada, con una AUC de 0,94, IC 95% [0,87-1];  $P < 0,05$ ), superior al área estimada para cada clase de lípidos por separado (**Figura 33**).



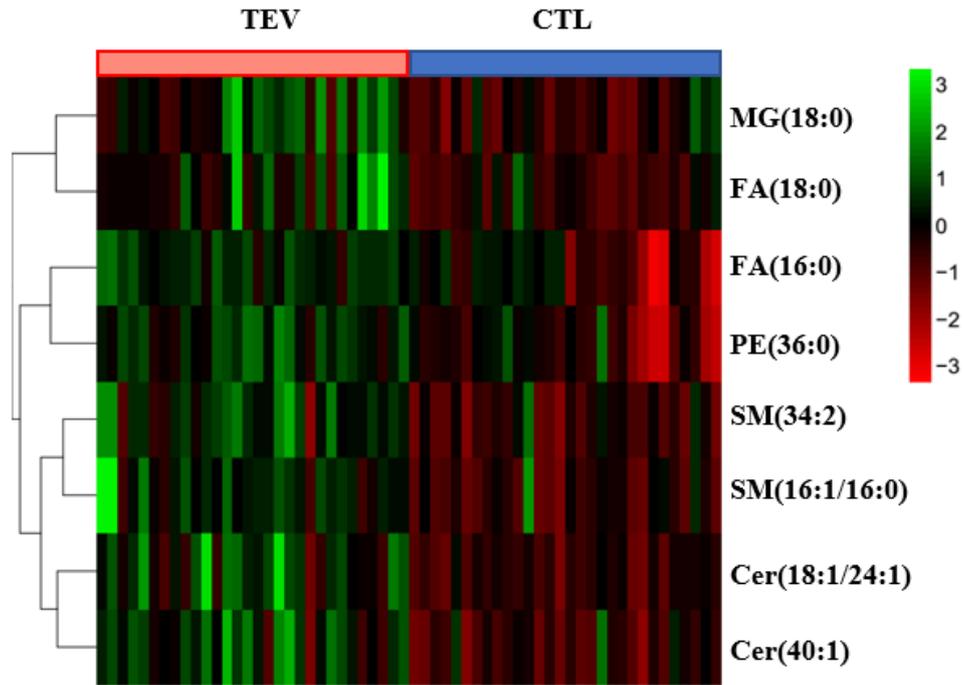
**Figura 33.** Curva ROC y valor de AUC del modelo obtenido con los niveles de abundancia relativa de las 4 clases lipídicas incluidas en el modelo. También se muestran las curvas ROC y los valores del análisis de cada una de las clases lipídicas por separado.

Además, también quisimos estudiar si las clases lipídicas identificadas eran capaces de diferenciar alguna de las características clínicas de los pacientes con TEV, como la trombosis de repetición o retrombosis. Observamos como dos de estas clases de lípidos, FAs ( $P < 0,01$ ) y SMs ( $P < 0,05$ ), se asociaron significativamente con recurrencia trombótica (**Figura 34**).



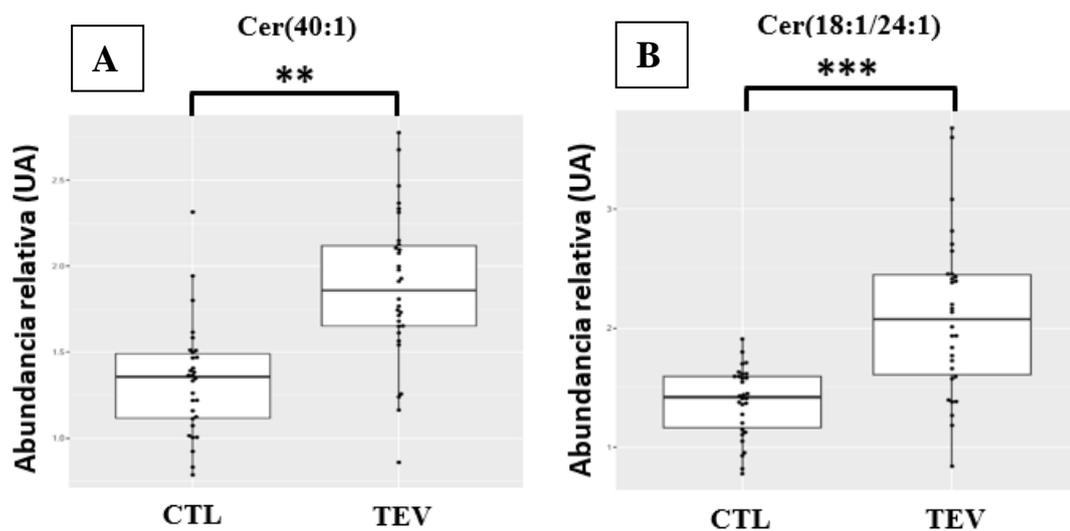
**Figura 34.** Niveles de abundancia relativa de FAs y SMs, dos clases lipídicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con TEV sin y con recurrencia trombótica. \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

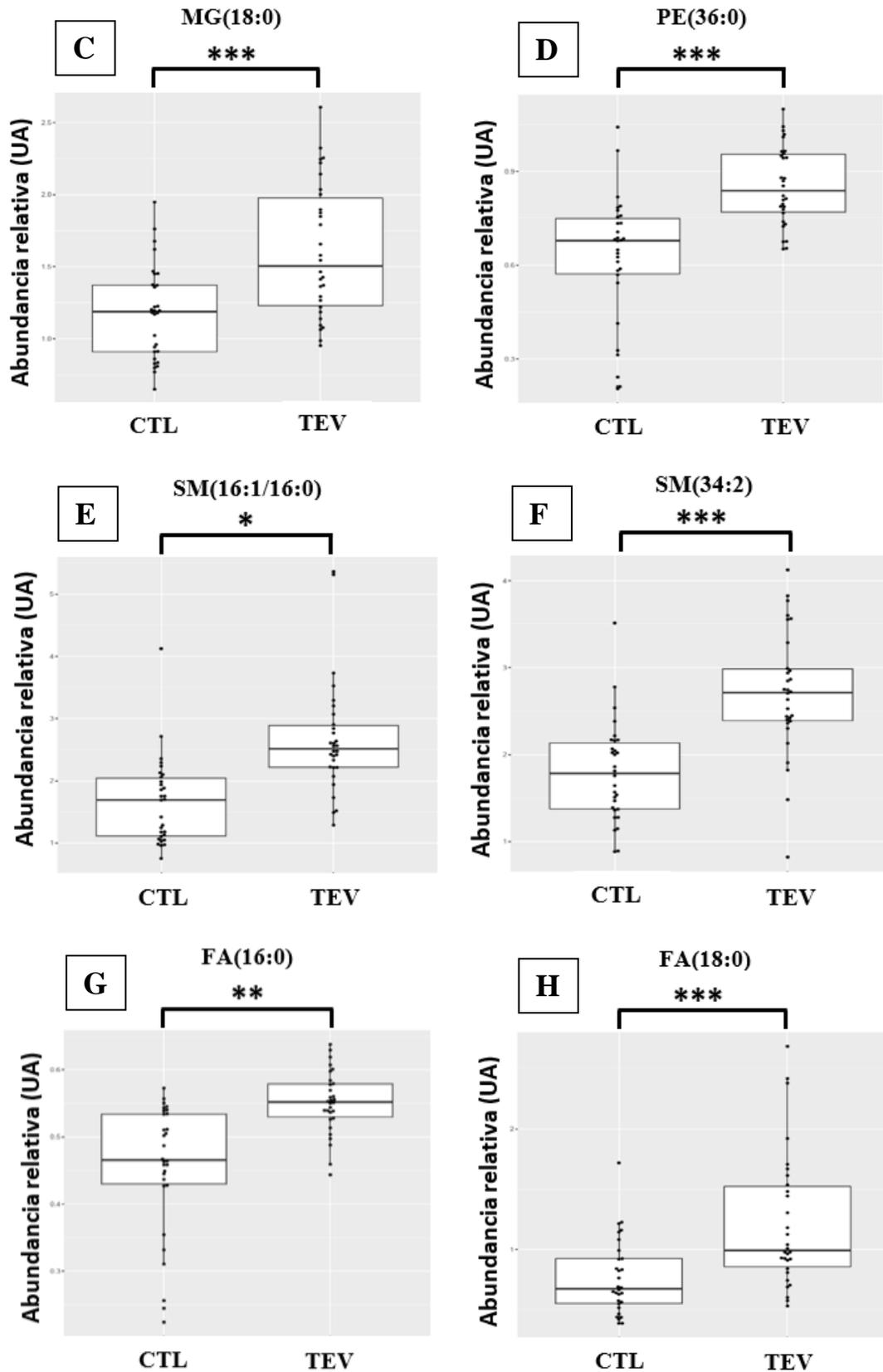
Además del análisis por clases lipídicas, y puesto que cada una de estas clases incluye un gran número de lípidos y, por tanto, los resultados son muy amplios, quisimos identificar las especies lipídicas específicas capaces de diferenciar pacientes con TEV y controles. Para ello, llevamos a cabo un análisis de regresión logística para el riesgo de TEV similar al anterior, pero en este caso, con los niveles de abundancia de las 291 especies lipídicas identificadas. Obtuvimos un perfil de 8 especies lipídicas: MG(18:0), FA(18:0), FA(16:0), PE(36 0), SM(34:2), SM(16:1/16:0), Cer(18:1/24:1) y Cer(40:1), todos ellos con niveles aumentados en pacientes con TEV. Los niveles relativos de los 8 lípidos los podemos visualizar en la **figura 35** en forma de *heatmap*.



**Figura 35.** Heatmap obtenido con los niveles de abundancia relativa en pacientes con TEV y controles de las 8 especies lipídicas incluidas en el modelo (verde, aumento relativo; rojo, disminución relativa).

Los 8 lípidos incluidos en el modelo mostraron niveles con diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con TEV y controles sanos (**Figura 36**).

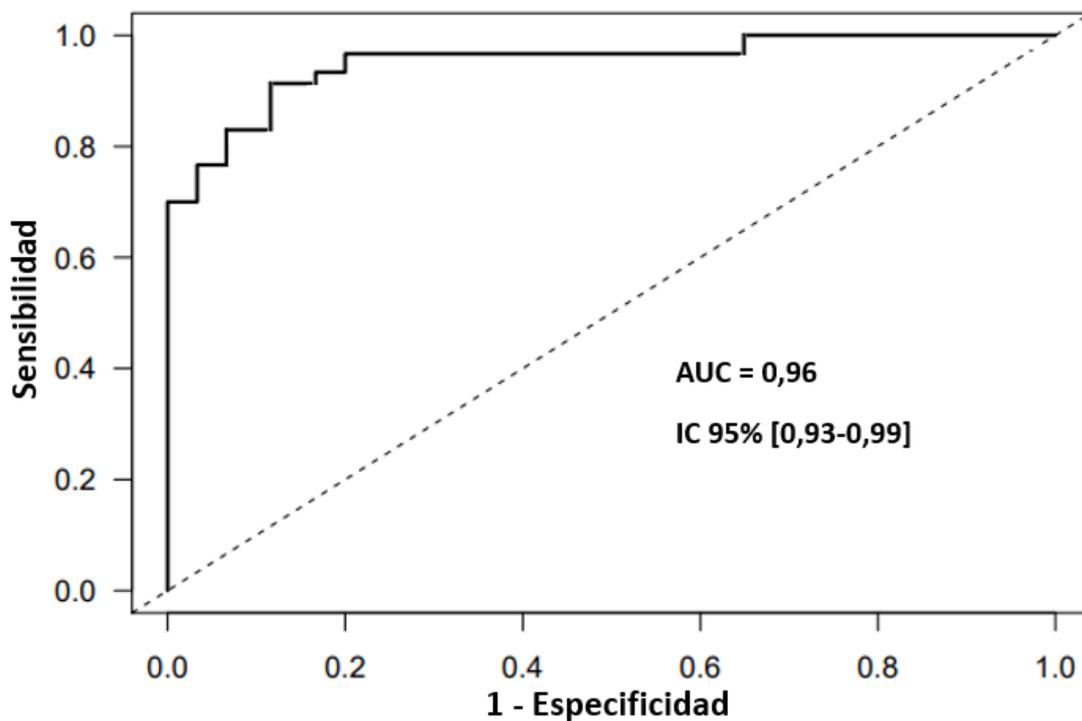




**Figura 36.** Niveles de abundancia relativa de las 8 especies lipídicas incluidas en nuestro modelo: **A)** Cer(40:1), **B)** Cer(18:1/24:1), **C)** MG(18:0), **D)** PE(36:0), **E)**

SM(16:1/16:0), **F**) SM(34:2), **G**) FA(16:0) y **H**) FA(18:0). \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

El modelo obtenido con estas 8 especies lipídicas presentó una potencia estadística incluso superior a la mostrada por el modelo anterior, con una curva ROC que presentó un AUC de 0,96, IC 95% [0,93-0,99],  $P < 0,05$ ) (**Figura 37**).



**Figura 37.** Curva ROC y valor de AUC del modelo obtenido con los niveles de abundancia de las 8 clases lipídicas incluidas en nuestro perfil.

Por último, analizamos el grado de correlación entre las clases lipídicas identificadas y algunas variables clínicas relacionadas con el metabolismo del colesterol. Como podemos ver en la **tabla 17**, encontramos gran cantidad de correlaciones estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre los parámetros estudiados.

**Tabla 17.** Análisis de correlación de Pearson entre las 14 clases lipídicas identificadas por UPLC-MS y algunas variables clínicas relacionadas con el metabolismo del colesterol. Las correlaciones estadísticamente significativas (p-valor <0.05) están marcadas en negrita.

		<b>Colesterol total</b>	<b>Colesterol HDL</b>	<b>Colesterol LDL</b>	<b>TGs</b>	<b>Ratio ApoB/ApoA1</b>
<b>BAs</b>	r de Pearson	0.16	-0.10	0.28	0.19	0.09
	p-valor	0.246	0.508	0.061	0.182	0.567
<b>Cars</b>	r de Pearson	0.08	-0.01	0.21	-0.02	0.26
	p-valor	0.565	0.952	0.165	0.899	0.111
<b>Cers</b>	r de Pearson	<b>0.35</b>	-0.06	<b>0.33</b>	<b>0.37</b>	0.24
	p-valor	<b>0.011</b>	0.679	<b>0.025</b>	<b>0.008</b>	0.134
<b>CEs</b>	r de Pearson	0.14	0.03	0.08	0.09	0.192
	p-valor	0.305	0.82	0.578	0.510	0.242
<b>DGs</b>	r de Pearson	0.18	<b>-0.42</b>	0.13	<b>0.83</b>	<b>0.32</b>
	p-valor	0.205	<b>0.004</b>	0.373	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.047</b>
<b>FAs</b>	r de Pearson	0.16	0.17	0.18	-0.14	0.16
	p-valor	0.272	0.248	0.217	0.327	0.322
<b>LPCs</b>	r de Pearson	0.11	0.11	0.09	0.10	-0.09
	p-valor	0.430	0.473	0.533	0.469	0.587
<b>LPEs</b>	r de Pearson	0.11	0.06	0.04	<b>0.28</b>	-0.11
	p-valor	0.450	0.683	0.804	<b>0.045</b>	0.514
<b>MGs</b>	r de Pearson	0.09	-0.03	0.24	0.12	0.23
	p-valor	0.528	0.815	0.107	0.403	0.162
<b>PCs</b>	r de Pearson	<b>0.46</b>	0.02	<b>0.35</b>	<b>0.37</b>	0.19
	p-valor	<b>&lt;0.001</b>	0.919	<b>0.016</b>	<b>0.007</b>	0.22
<b>PEs</b>	r de Pearson	<b>0.30</b>	0.07	0.06	<b>0.62</b>	0.01
	p-valor	<b>0.033</b>	0.624	0.666	<b>&lt;0.0001</b>	0.968
<b>PIs</b>	r de Pearson	0.24	<b>0.31</b>	0.17	0.04	-0.02
	p-valor	0.086	<b>0.036</b>	0.242	0.785	0.920
<b>SMs</b>	r de Pearson	<b>0.48</b>	0.13	<b>0.40</b>	0.12	0.15
	p-valor	<b>&lt;0.001</b>	0.389	<b>0.005</b>	0.415	0.365
<b>TGs</b>	r de Pearson	-0.05	-0.15	-0.18	<b>0.32</b>	0.04
	p-valor	0.750	0.321	0.242	<b>0.023</b>	0.783



# **DISCUSIÓN**



## 5. Discusión

### 5.1. Proteómica

En la presente tesis doctoral, hemos llevado a cabo un estudio caso-control en el que hemos comparado el proteoma plasmático de pacientes que han sufrido, al menos, un episodio de TEV con el de controles sanos. El principal hallazgo de nuestro análisis ha sido la identificación y la validación de una proteína plasmática, la LBP, como un biomarcador asociado a la enfermedad tromboembólica venosa.

En la fase de screening, en la que comparamos muestras plasmáticas de 18 pacientes y de 18 controles mediante espectrometría de masas, obtuvimos un panel de 28 proteínas capaz de clasificar ambos grupos con una potencia estadística muy elevada. Entre estas proteínas encontramos varias, como el FXII y la  $\alpha$ -2 antiplasmina, con una actividad conocida dentro de la coagulación sanguínea, y muchas otras cuya función sigue siendo desconocida en este campo.

La validación de este modelo fue el objetivo de la segunda fase de nuestro estudio. Para esta fase de validación, estudiamos las muestras plasmáticas de 60 pacientes con TEV y de 60 controles, y el método elegido para conseguir este propósito fue, de nuevo, la espectrometría de masas, ya que nos permitía analizar las 28 proteínas de nuestro perfil, en un elevado número de muestras y en un único análisis. En este caso, llevamos a cabo una estrategia dirigida, ya que utilizamos péptidos específicos de cada una de las proteínas del panel, lo que no sólo nos permitía identificar inequívocamente cada una de ellas en el análisis, sino que también nos daba la posibilidad de obtener concentraciones absolutas de las mismas. Lamentablemente, por motivos técnicos no pudimos obtener datos analizables de este experimento, lo que nos privó de poder disponer de una gran cantidad de información que hubiera sido de gran valor, tanto para nuestro proyecto en particular, como para el campo de la proteómica y el TEV en general.

Alternativamente, buscamos otra metodología más sencilla, y cuantificamos, mediante técnicas inmunoanalíticas, los niveles de 3 proteínas de nuestro modelo en la población de validación. Estas proteínas fueron RBP4, PAF-AH y LBP, las cuáles escogimos por los motivos anteriormente expuestos.

LA RBP4 no mostró diferencias significativas entre los niveles de pacientes con TEV y controles sanos y, en el caso de PAF-AH, no pudimos cuantificar sus niveles mediante el inmunoensayo optimizado en disco, posiblemente debido a que sus concentraciones en plasma son demasiado bajas como para ser detectadas por este método [420,421]. Por el contrario, la asociación de la LBP con el TEV sí fue validada, hallando concentraciones significativamente superiores en controles respecto a pacientes mediante ambas técnicas de cuantificación.

La LBP es una glicoproteína de fase aguda de 58 kDa implicada en la respuesta inmunológica a bacterias gramnegativas. Actúa reconociendo los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la pared celular de estas bacterias y catalizando su unión con los receptores CD14, TLR4 y MD2-. Esta unión favorece la activación celular y la respuesta inmune, produciendo la liberación de citoquinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 e interferón- $\beta$ , que además producen una activación sistémica de la respuesta inflamatoria [422-424].

Además de su ya comentada anteriormente asociación con diversas enfermedades cardiovasculares, cabe destacar que la LBP ha sido identificada como una de las proteínas desreguladas en pacientes con COVID-19. Varios estudios han sugerido niveles plasmáticos de LBP significativamente más elevados en pacientes con COVID-19 respecto a controles sanos. En uno de ellos, los niveles de LPS también eran superiores en pacientes con COVID-19 y además se relacionaban con la existencia de complicaciones trombóticas [425]. En otro trabajo, estos niveles se mantenían elevados durante la hospitalización y eran superiores en pacientes con afectación cardíaca [426]. En un estudio de aleatorización mendeliana en el que utilizaron 6.492 casos hospitalizados y alrededor de un millón de controles, se demostró una fuerte correlación entre los niveles de LBP sérica y la tasa de hospitalización de pacientes con COVID-19 [427]. Estos hallazgos podrían contribuir a dilucidar la tan relevante, y por ahora tan desconocida, relación entre la COVID-19 y la trombosis.

Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se relacionan los niveles plasmáticos de LBP con la aparición de TEV, una asociación desconocida hasta ahora. En este estudio proteómico, prospectivo y no dirigido, se identificó, en una primera fase de *screening*, y posteriormente se validó, en una población diferente, la LBP como un biomarcador predictivo de TVP en mujeres [428]. Las mujeres tenían un riesgo dos veces mayor de desarrollar un evento de TVP, en un periodo de tres años desde la toma de muestra, por

cada aumento de una desviación estándar en sus niveles plasmáticos de LBP. En un principio, este hallazgo contrastaría con los resultados de nuestro estudio, ya que en nuestro caso la LBP ejerce un efecto protector para el TEV, siendo sus niveles más elevados en controles que en pacientes. Sin embargo, en este mismo estudio también observaron un riesgo más elevado de TEV en hombres cuyos niveles de LBP se encontraban en el cuartil más bajo, así como que los niveles de LBP ejercían un efecto protector sobre el TEP para ambos sexos en el estudio de *screening*, resultado que se confirmó para los hombres en la fase de validación.

La mayor fortaleza de nuestro estudio es el diseño experimental, ya que se compone de una primera fase de *screening* seguida por una fase de validación en la que se han utilizado diferentes técnicas y una población distinta y más numerosa a la empleada en la primera fase. Además, las dos técnicas inmunoanalíticas utilizadas para la validación de la LBP mostraron una fuerte correlación, y más importante aún, una muy alta concordancia, lo que refuerza y da más veracidad e importancia a nuestros resultados. Otro de los puntos a favor de nuestro estudio es la profunda evaluación clínica de los pacientes, con un diagnóstico objetivo de TEV, la ausencia de factores de riesgo tanto en pacientes como en controles y la inclusión de pacientes al menos 6 meses después del evento trombótico, en fase estable y una vez la terapia anticoagulante ya ha finalizado.

Como limitación más importante de nuestro estudio destacaríamos el reducido tamaño poblacional en la fase de *screening*, lo que hace que tengamos que interpretar con prudencia el modelo de 28 proteínas obtenido en esta fase. Si bien es cierto, el número de individuos estudiado en la fase de validación fue considerablemente superior, por lo que, aunque no pudiera ser validado el modelo en esta población, los resultados obtenidos para la LBP presentan una robustez y una potencia estadística realmente elevada.

También analizamos nuestros resultados clasificando a los pacientes por la localización de la trombosis (TVP, TEP y TVP+TEP), pero debido al pequeño número de pacientes con TEP y con TVP+TEP, los resultados obtenidos carecían de la fuerza estadística necesaria como para poder extraer conclusiones sólidas. Los biomarcadores o los factores de riesgo pueden afectar de diferente manera a la TVP o al TEP, como vemos por ejemplo en la paradoja del FVL, por lo que estudiar a todos nuestros pacientes indistintamente podría afectar nuestros hallazgos.

Otra limitación remarcable es que, dada la naturaleza retrospectiva de nuestro estudio, aunque los pacientes fueron estudiados al menos 6 meses después del evento, no podemos

saber con certeza si el proteoma obtenido en nuestras muestras es una consecuencia de la enfermedad o es una realidad preexistente de los pacientes con TEV que probablemente contribuyó al evento trombótico.

En conclusión, en este estudio hemos obtenido, mediante un análisis de espectrometría de masas no dirigido, un perfil de 28 proteínas plasmáticas asociado a la enfermedad tromboembólica venosa, capaz de clasificar pacientes con TEV y controles sanos con una potencia estadística muy elevada. Además, hemos identificado en una segunda fase de validación, en una población diferente y más numerosa, una de estas proteínas, la LBP, como un biomarcador con efecto protector frente al TEV, siendo sus niveles significativamente superiores en controles respecto a pacientes. Futuros estudios son necesarios para dilucidar el papel de estas proteínas, y concretamente de la LBP, en la fisiopatología del TEV y en la inmunotrombosis.

## 5.2. Metabolómica

El TEV es una enfermedad multifactorial y numerosos mecanismos celulares y moleculares están involucrados en la aparición de un evento trombótico. A pesar de los grandes esfuerzos que se han llevado a cabo para dilucidar los factores que desencadenan un episodio, gran parte de su fisiopatología sigue siendo incierta, y la aparición de las técnicas ómicas y de las plataformas analíticas de alto rendimiento podrían aportar luz que nos ayude a comprender mejor la naturaleza de esta patología. Como hemos comentado en la introducción, son pocos los análisis metabolómicos realizados en el campo del TEV hasta la fecha [392-395], y el hallazgo de una firma metabólica asociada a esta patología podría ser de gran ayuda para la estratificación del riesgo trombótico, el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad, así como para la determinación de nuevos fármacos o dianas terapéuticas.

En la presente tesis doctoral hemos identificado y validado, mediante espectrometría de masas, un perfil plasmático de 4 metabolitos capaz de diferenciar pacientes con TEV y controles sanos con una potencia estadística realmente elevada (AUC = 0,98, IC 95% [0.97-1]). Además, hemos demostrado que 3 de estos metabolitos son capaces de modular *in vitro* el estado coagulativo del plasma, modificando diferentes variables de una prueba global de la coagulación como es el TGT.

La L-Acetilcarnitina mostró niveles significativamente inferiores en pacientes con TEV respecto a controles sanos ( $P < 0,01$ ). La L-Acetilcarnitina es sintetizada endógenamente en las mitocondrias de tejido muscular, cerebro, riñones, hígado y corazón, pero también puede ser administrada como suplemento alimenticio, principalmente para ayudar al tratamiento de neuropatías periféricas [429]. Juega un papel muy importante en el metabolismo energético, ya que su principal función es el transporte de FAs de cadena larga desde el citosol a la matriz mitocondrial para la  $\beta$ -oxidación, y sus propiedades neuroprotectoras han sido ampliamente demostradas [430-433]. En cuanto a su relación con la enfermedad cardiovascular, y más concretamente con el TEV, ésta sigue siendo incierta, y diferentes resultados se han obtenido en cuanto a los niveles de acilcarnitinas en los estudios metabolómicos llevados a cabo hasta el momento. Nuestros resultados están en la misma línea que los obtenidos por Deguchi et al [392], quienes identificaron niveles reducidos de varias acilcarnitinas de cadena larga ( $> 10$  átomos de carbono) en el plasma de un grupo de 40 hombres diagnosticados con TEV. Además, confirmaron,

mediante una prueba funcional de la coagulación, el efecto anticoagulante de estas acilcarnitinas, las cuales se unían al FXa impidiendo su unión a la membrana plasmática e inhibiendo su actividad. En el análisis realizado por Fraser et al [395], se hallaron niveles más elevados de butirilcarnitina en el plasma de pacientes con TEV que en el de controles sanos, y ésta fue uno de los 21 metabolitos incluidos en su perfil de biomarcadores asociado al riesgo trombótico.

Las pruebas que realizamos con el TGT también evidenciaron un efecto ambiguo de la L-Acetilcarnitina en el estado coagulante del plasma. La adición de concentraciones crecientes del metabolito modificó significativamente 3 de los parámetros del TGT, el lagtime, el ttPeak y el ETP. La L-Acetilcarnitina aumentó los tiempos de los dos primeros, lo que indica un efecto ralentizador del metabolito sobre la cascada de la coagulación, ya que tarda más en activarse y en llegar a su máxima actividad. Sin embargo, también incrementó el ETP, es decir, la cantidad total de trombina generada, lo que podría suponer un efecto procoagulante. Estos resultados son una muestra más de que futuros estudios son necesarios para dilucidar el verdadero papel de las acilcarnitinas en general, y de la acetilcarnitina en particular, en la fisiopatología del TEV, posiblemente mediado por el rol que puede ejercer en la membrana plasmática, la cual juega un papel esencial en la cascada de la coagulación.

Los niveles de oleamida fueron significativamente superiores en pacientes con TEV que en controles sanos ( $P < 0,001$ ). La oleamida es la amida derivada del ácido oleico, es producida endógenamente por el organismo y es considerada un endocannabinoide, ya que sus principales efectos biológicos parecen estar mediados por el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1). Está presente también en el líquido cefalorraquídeo y ha demostrado tener diversas funciones a nivel del sistema nervioso central, como antiepiléptico [434], regulador de la memoria [435,436], analgésico y ansiolítico [437]. También ha mostrado tener efectos como inductor del sueño [438], regulador de la hipotermia [439], vasodilatador [440] y, recientemente, se ha demostrado su influencia sobre la activación del inflammasoma [441]. Esta relación con el proceso inflamatorio podría abrir un nuevo camino para la investigación de su implicación sobre la enfermedad trombótica, cuyo papel aún no ha sido estudiado.

En las pruebas realizadas con el TGT, la oleamida también retrasó significativamente el inicio de la generación de trombina (Lagtime) y el tiempo hasta que se alcanzó la

concentración máxima (ttPeak). Si bien es cierto, que conforme aumentamos la concentración de oleamida utilizada también aumentó la concentración máxima de trombina generada (Peak). Como en el caso de la L-Acetilcarnitina, muestra un efecto presumiblemente opuesto en varios parámetros del TGT, por lo que nuevas investigaciones podrían clarificar la verdadera implicación de la oleamida sobre la coagulación.

La L-arginina también mostró niveles significativamente mayores en pacientes con TEV que en controles sanos ( $P < 0,001$ ). La L-arginina es uno de los 20 aminoácidos que se encuentran formando parte de las proteínas y está involucrada en gran cantidad de procesos fisiológicos en el organismo. Aunque no es un aminoácido esencial, puesto que el organismo también es capaz de producirlo en la edad adulta, sí que es considerado como básico, por su gran importancia, además de ser ampliamente utilizado como suplemento alimenticio. La L-arginina es el precursor, en las células inmunes y endoteliales, de la síntesis de óxido nítrico, la molécula encargada de llevar a cabo la mayoría de funciones biológicas asociadas a la arginina. Entre ellas podemos destacar su actividad vasodilatadora y antihipertensiva [442,443], su capacidad para controlar los niveles de azúcar en personas diabéticas [444], sus propiedades antioxidantes [445] y sus positivos efectos sobre la actividad muscular y la mejora de la capacidad aeróbica y anaeróbica [446]. Su papel en el metabolismo del cáncer también ha sido ampliamente estudiado [447] y su implicación en la función endotelial y en la enfermedad cardiovascular sigue siendo controvertida [448,449]. Hasta el momento, niveles alterados de este aminoácido no se han observado en el TEV, pero su acción sobre la función endotelial y su actividad vasodilatadora nos indican que podría tener un papel importante en la enfermedad trombótica.

En cuanto a su efecto sobre el TGT, la L-arginina aumentó significativamente el Lagtime y el ttPeak, mostrando así un efecto ralentizador del proceso de coagulación. Debido a la gran cantidad de procesos fisiológicos en los que está involucrada, la L-arginina es una molécula con una gran actividad biológica, y también podría estar involucrada en la fisiología de la coagulación, siendo necesarios futuros estudios para dilucidar esta asociación.

El Aldo-PC también mostró niveles estadísticamente superiores en pacientes con TEV respecto a los de controles sanos ( $P < 0,001$ ). El Aldo-PC es un fosfolípido oxidado que

forma parte de las membranas celulares. Estos fosfolípidos se oxidan debido a la presencia de moléculas causantes de estrés oxidativo, y se ha demostrado que un exceso de fosfolípidos oxidados afecta a las propiedades de la membrana lipídica, pudiendo causar alteraciones en los procesos inflamatorios e infecciosos [450-452]. Cabe destacar además, que el estrés oxidativo conduce tanto a modificaciones drásticas en las propiedades biofísicas de las biomembranas como en las propiedades químicas de otros lípidos o proteínas con los que interaccionan. Así, Code et al [453] describieron como el Aldo-PC es capaz de reaccionar con la enzima lipolítica fosfolipasa A2 (PLA2), favoreciendo su activación. Y, por otro lado, Tamayo et al [454] demostraron en un estudio *in vivo* en ratones, que la sustitución o modificación de la composición de la membrana celular alteraba la actividad anticoagulante de la vía de la proteína C, y por tanto el riesgo trombótico, con una modificación mediada por sPLA2-V. En el campo de la enfermedad trombótica, no hay estudios que lo relacionen con su fisiopatología, y nuevas investigaciones son necesarias para esclarecer esta asociación, posiblemente ligada con la importancia de la membrana celular en el proceso de la coagulación sanguínea.

Como principal fortaleza de nuestra investigación, al igual que en el análisis proteómico, destacaríamos el diseño experimental del estudio metabolómico, con una primera fase de *screening*, y una segunda fase de validación, utilizando una cohorte diferente y más numerosa a la estudiada en la primera fase, y en la que se han utilizado estándares químicos de los metabolitos, para la obtención de niveles absolutos de los mismos. Otra fortaleza de nuestro estudio es la evaluación clínica a la que han sido sometidos los pacientes, con un diagnóstico objetivo de TEV, ausencia de factores de riesgo en ambas poblaciones y la inclusión de pacientes al menos 6 meses después del evento de TEV, en fase estable y una vez la terapia anticoagulante ya había finalizado. La inclusión de los pacientes con estos criterios ha permitido eliminar ruido de fondo que pudieran enmascarar los resultados obtenidos.

Como limitaciones de nuestro estudio podemos remarcar el análisis de pacientes con TEV en único grupo, sin clasificar por la localización de la trombosis y el carácter retrospectivo de nuestro estudio, ya que, aunque la colección de muestras se llevó a cabo al menos 6 meses después del evento, no podemos confirmar si los hallazgos obtenidos son una causa o una consecuencia del evento trombótico.

En conclusión, hemos validado un modelo de 4 metabolitos asociado a la presencia de TEV con una fuerza estadística muy elevada. Dentro de los pocos análisis metabolómicos realizados en el campo del TEV hasta la fecha, el estudio llevado a cabo por Fraser et al [395] es el que obtuvo unos resultados más similares a los nuestros. Ellos identificaron un conjunto de 21 metabolitos plasmáticos (incluidos 12 lípidos) como biomarcadores de TEV y generaron un modelo con el que obtuvieron un AUC de la curva ROC de 0,906. Nuestra investigación presenta unos resultados más consistentes y prometedores por varias razones. La primera es debida al diseño experimental, ya que nuestro estudio consta de dos fases, lo que hace que nuestros resultados tengan mayor robustez y fortaleza. La segunda es el número de variables del modelo. El perfil de Fraser et al consta de 21 metabolitos, mientras que el nuestro incluye únicamente 4, lo que lo hace mucho más transferible a la clínica. La tercera razón es la mayor potencia estadística de nuestro modelo, con un AUC de 0,98, respecto a la suya de 0,906.

Futuros estudios son necesarios para reforzar nuestros resultados y evaluar la implicación de estos 4 metabolitos en la fisiopatología del TEV. Estos estudios también dilucidarían las posibilidades de nuestro modelo en el diagnóstico, estratificación y pronóstico del TEV, pudiendo reducir así el empleo de técnicas invasivas o profilaxis innecesarias.

### 5.3. Lipidómica

Debido a la gran cantidad de actividades biológicas en las que están involucrados los lípidos, la desregulación de la homeostasis lipídica ha surgido como una característica patogénica de muchas enfermedades. Un análisis completo del metabolismo lipídico puede proporcionar una mejor comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades y revelar nuevos biomarcadores para su diagnóstico, pronóstico o incluso para un posible tratamiento farmacológico [455,456].

En el campo del TEV, ningún estudio lipidómico ha sido realizado hasta la fecha y son pocos los análisis metabolómicos llevados a cabo, los cuales han hallado diversas especies lipídicas asociadas con el TEV [392-395]. En esta tesis, realizamos el primer análisis lipidómico caso-control cuyo objetivo fue descubrir nuevos perfiles de lípidos circulantes asociados con el riesgo de TEV incidente. Detectamos clases lipídicas y especies individuales relacionadas con la enfermedad y fuimos capaces de identificar perfiles lipídicos plasmáticos como biomarcadores de TEV.

Con respecto a las clases lipídicas, observamos que 8 de las 14 clases identificadas mostraron niveles alterados en pacientes con TEV en comparación con los controles sanos. Éstas fueron: Cars, Cers, MGs, DGs, PCs, PEs, SMs y FAs.

Las Cars son un grupo de lípidos que participan en múltiples actividades biológicas, destacando la oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del acetil-CoA. Recientemente se han publicado varios estudios en los que se asocia la alteración del metabolismo de las Cars con el riesgo de TEV. Zeleznik et al [393] observaron que los niveles séricos de nueve acilcarnitinas mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con TEP de riesgo bajo y pacientes con TEP de riesgo intermedio/alto. Asimismo, Jiang et al [394] hallaron, en un estudio caso-control de metabolómica en plasma, que una carnitina de cadena corta se asociaba significativamente con la incidencia de TEV. Como ya se ha comentado anteriormente, una de los 12 lípidos incluidos en el modelo de 21 metabolitos de Fraser et al [395] fue la butirilcarnitina, que presentó niveles aumentados en pacientes con TEV en comparación con controles sanos. También Deguchi et al [392] identificaron niveles plasmáticos reducidos de algunas acilcarnitinas de cadena larga (> 10 átomos de carbono) en hombres con TEV y demostraron su efecto anticoagulante, mediado por la inhibición del FXa. Estos resultados están en la misma línea a los descritos en la presente tesis doctoral, ya que, aunque no se conoce en

profundidad el mecanismo de acción de estas moléculas, sí indican que existe una fuerte relación entre el metabolismo de las carnitinas y la fisiopatología del TEV, la cual merece un estudio más profundo.

También observamos un aumento de los niveles de Cers y SMs en pacientes con TEV, dos clases de esfingolípidos estrechamente relacionadas. Desregulaciones en el metabolismo de los esfingolípidos ya han sido descritas con anterioridad en enfermedades cardiovasculares y el proceso inflamatorio [457,458]. El papel de las ceramidas en la inflamación vascular es bien conocido. Las ceramidas desencadenan la exocitosis de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales [459], liberando así factor von Willebrand (FvW) y P-selectina, lo que produce el reclutamiento de leucocitos y la adhesión y agregación plaquetaria. Se ha demostrado que las selectinas promueven la inflamación y la trombogénesis venosa [460,461], son posibles biomarcadores de TEV [462,463] e incluso la inhibición de la P-selectina podría tener un papel terapéutico en la trombosis venosa [464]. Niveles alterados de ceramidas también se han asociado con desórdenes en la coagulación. Deguchi et al encontraron una asociación entre niveles más bajos de glucosilceramida (GlcCer) en plasma, un producto de glicosilación de las ceramidas, y un mayor riesgo de TEV [465,466], y plantearon la hipótesis de que esta asociación se basaba en la capacidad de la GlcCer plasmática para contribuir y participar en la actividad antitrombótica de la vía de la proteína C activada, por lo que una disminución de GlcCer conduciría a un estado de hipercoagulabilidad y un aumento del riesgo trombótico. Otro producto del metabolismo de las ceramidas, la esfingosina-1-fosfato, también ha mostrado tener un papel importante en la coagulación y la inflamación [467]. Además, Wang et al [468,469] descubrieron que alteraciones en el metabolismo de las esfingomielinas influían en la actividad procoagulante del FT. En línea con los resultados de nuestro análisis, niveles aumentados de SMs y Cers fueron hallados en el suero y en la pared venosa de ratones con TVP en un análisis metabólico en modelo animal [470]. Algunas enzimas implicadas en el metabolismo lipídico son capaces de alterar los equilibrios entre SMs-Cers, esfingosinas-Cers, esfingosina-esfingosina-1-fosfato, GlcCer-Cer...[471,472], y tal vez un estudio más profundo de estas vías metabólicas aclararía el verdadero efecto de estos esfingolípidos en la fisiopatología del TEV.

Niveles plasmáticos más elevados de MGs y DGs también fueron observados en pacientes con TEV. Con respecto a los MGs, no hay datos que relacionen esta clase lipídica con el

riesgo trombótico. Sin embargo, en el caso de los DGs, nuestros resultados coinciden con los publicados por Jiang et al [394], quienes también encontraron niveles aumentados de DGs en pacientes con TEV en comparación con controles sanos. Debido a que los DGs constituyen un componente menor de la dieta humana, y la cantidad de ingesta es pequeña, Jiang et al [394] sugieren que el enriquecimiento en DGs identificado en pacientes con TEV podría reflejar el efecto intermedio de los TGs, cuyo vínculo con el riesgo de TEV ha sido ampliamente estudiado [473-476]. A pesar de esto, más estudios son necesarios para clarificar el efecto de los diglicéridos en la enfermedad de TEV.

Nuestro estudio también reveló un aumento de dos clases de fosfolípidos en el plasma de pacientes con TEV, PCs y PEs. Es bien sabido que los fosfolípidos de membrana ejercen una importante función procoagulante, aunque esta función se atribuye principalmente a la PS. La generación de trombina se ve reforzada por las membranas de fosfolípidos que contienen PSs, y la actividad de la protrombinasa puede mejorar con la presencia de PEs cuando las membranas tienen bajos niveles de PS o cardiolipina [477,478]. En cuanto a los fosfolípidos circulantes, hay menos información sobre su papel en el equilibrio hemostático. Nuestros resultados están en línea con el estudio de Fraser et al [395], en el que entre los 21 metabolitos incluidos en su perfil asociado al TEV estaban la PC(38:8) y la PE(16:0/20:5) ambas con niveles aumentados en pacientes con TEV. Nuestros datos también coinciden con los obtenidos por Jiang et al [394], quienes también observaron que las PEs estaban relacionadas con el riesgo de TEV. Además, anticuerpos contra PEs han sido hallados en pacientes con eventos tromboembólicos [479,480], y en un estudio retrospectivo caso-control, Sanmarco et al [481] observaron que la presencia de anticuerpos anti-PEs aumentaba 6 veces el riesgo de TEV. El papel que juegan los fosfolípidos de membrana en el equilibrio hemostático ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar la importancia real de los fosfolípidos circulantes en la coagulación y más concretamente en la patogénesis del TEV.

Los niveles de FAs también fueron más elevados en pacientes con TEV en comparación con los de controles sanos. En este estudio hemos analizado los niveles de ácidos grasos totales, si bien es cierto que se ha visto que su efecto sobre las enfermedades cardiovasculares varía en función de su grado de saturación (pudiendo ser saturados (SFA), monoinsaturados (MUFAs) o poliinsaturados (PUFAs)), y de su longitud [482]. En nuestro análisis, los dos ácidos grasos que más han contribuido a estas diferencias han

sido el ácido palmítico (C16) y el ácido esteárico (C18), dos ácidos grasos saturados de cadena larga. Nuestros resultados están en línea con los obtenidos por Didisheim y Mibashan [483], quienes observaron que los ácidos grasos saturados de cadena larga aceleraban la coagulación sanguínea a través de la activación del factor de Hageman (FXII) y su efecto era proporcional a la longitud de su cadena. Estos resultados también concuerdan con los de Mitropoulos y Esnouf [484], quienes describieron una mayor autoactivación del FXII en presencia de SFAs de cadena larga, como el ácido esteárico (C18) o el ácido behénico (C22). Además, los SFAs de cadena larga han mostrado tener efecto sobre la actividad coagulante del FVII *in vitro* [485], actividad que mostraba una fuerte asociación con la concentración plasmática de ácido esteárico [486]. Wilson et al [487], en un antiguo estudio con modelo animal, descubrieron que las inyecciones de SFAs de cadena larga en la circulación sistémica de perros producían trombosis masivas y muertes súbitas. Más tarde, en un estudio poblacional para analizar los efectos trombogénicos de los SFAs, Renaud et al [488] demostraron que los niveles de ácido esteárico se correlacionaban con la actividad coagulante y la agregación plaquetaria en humanos. En otro estudio en modelo murino, el reemplazo prolongado de una dieta con grasas hidrogenadas (ricas en FAs trans) por una dieta con aceite de palma (rica en grasas saturadas y ácido palmítico) afectaba la agregación plaquetaria y aumentaba el riesgo de TEV en ratas [489]. Además, el ácido palmítico también producía un aumento significativo de la generación de trombina en el plasma y en las células del músculo liso vascular de ratas [490], lo que confirma su efecto protrombótico. Más recientemente, en un estudio de aleatorización mendeliana para explorar asociaciones entre los niveles plasmáticos de ácidos grasos y 15 enfermedades cardiovasculares, la predisposición genética a presentar niveles más altos de ácido esteárico en plasma se asociaba con mayores probabilidades de padecer TEV [491]. A pesar de esas evidencias, sigue sin estar claro si los FAs libres circulantes juegan un papel causal en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, y más concretamente, en la patología trombótica, por lo que son necesarios más estudios para aclarar la verdadera implicación de los FAs libres en la fisiopatología del TEV.

En resumen, hemos obtenido dos modelos lipídicos que discriminan de manera robusta pacientes con TEV y controles sanos. El primero de ellos se generó con los niveles de 4 clases lipídicas (Cers, FAs, LPGs y SMs) y obtuvimos una curva ROC con un AUC de 0,90. Realizamos este modelo como una primera estimación para descubrir qué clases de

lípidos contribuían con más fuerza a clasificar pacientes y controles. Si bien es cierto, cada una de las clases de lípidos incluye muchas especies lipídicas específicas y este modelo puede resultar confuso y, sobre todo, difícil de trasladar a la práctica clínica. Por este motivo generamos un modelo con las especies lipídicas obtenidas e identificamos un perfil de 8 lípidos plasmáticos: MG(18:0), FA(18:0), FA(16:0), PE(36:0), SM(34:2), SM(16:1/16:0), Cer(18:1/24:1) y Cer(40:1), capaces de discriminar pacientes con TEV y controles sanos con una fuerza estadística muy elevada, alcanzando un AUC de 0,96. Nuestro modelo tiene dos fortalezas importantes con respecto al de Fraser et al [395]. La primera de ellas es una potencia estadística más elevada (0,96 vs 0,906), lo que hace que nuestro modelo sea capaz de discriminar y separar correctamente a un porcentaje mayor de individuos de las dos poblaciones de estudio. La segunda es el menor número de variables incluidas en el modelo (8 vs 21) y el hecho de que todas tienen la misma naturaleza molecular. Esta es una ventaja muy notable, ya que hace que nuestro perfil lipídico sea más sencillo y fácilmente transferible a la práctica clínica.

Como fortalezas de nuestro estudio podríamos destacar la evaluación clínica exhaustiva de los pacientes, con un diagnóstico objetivo de TEV, la ausencia de factores de riesgo tanto en pacientes como en controles y la inclusión de pacientes al menos 6 meses después del evento trombótico, en fase estable y una vez la terapia anticoagulante ya ha finalizado.

Nuestro estudio también presenta varias limitaciones. Una de ellas es el reducido tamaño poblacional, si bien es cierto que este análisis se trata de una primera fase de *screening*. Otra limitación es que, aunque los pacientes fueron estudiados al menos 6 meses después del evento, debido al carácter retrospectivo del estudio, no podemos saber si el aumento de los niveles lipídicos es una característica endógena persistente de los pacientes con TEV que contribuyó al evento trombótico o si son consecuencia de la enfermedad.

Nuevos estudios prospectivos validarían la asociación de los niveles plasmáticos de estos lípidos con el riesgo de TEV y confirmarían si su desregulación explica una parte de los eventos actuales de TEV de origen incierto. Sin embargo, estos estudios son muy difíciles de llevar a cabo, dado el gran tamaño poblacional que se requiere y el prolongado seguimiento que se ha de realizar hasta obtener un número suficiente de pacientes para que los resultados tengan consistencia estadística.





# **CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

Con los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir que:

1. Hemos identificado, en un estudio caso-control mediante espectrometría de masas no dirigida, un perfil de 28 proteínas plasmáticas asociado con la enfermedad tromboembólica venosa, capaz de clasificar pacientes con TEV y controles sanos con una potencia estadística muy elevada.
2. El estudio de validación de este perfil de proteínas identificó una proteína, la LBP, como un biomarcador con efecto protector frente al TEV, siendo sus niveles significativamente superiores en controles respecto a pacientes. Si bien, futuros estudios son necesarios para dilucidar el papel de esta proteína, posiblemente mediado por la inflamación y la inmunidad en la fisiopatología del TEV.
3. Hemos puesto a punto y validado un inmunoensayo en DVD, sencillo y económico, para la cuantificación plasmática de LBP, pudiendo ser susceptible de desarrollar un estudio de mercado y trasladarse a la práctica clínica.
4. En un estudio caso-control, mediante espectrometría de masas no dirigida en plasma, se han detectado 40 variables metabólicas asociadas con el TEV, identificando 5 de ellas como metabolitos descritos en el metaboloma humano, confirmando su identidad mediante la utilización de estándares comerciales.
5. Tras la fase validación de estos metabolitos mediante un análisis de espectrometría de masas dirigido, hallamos niveles más elevados de L-Acetilcarnitina en controles sanos, sugiriendo así un posible efecto protector frente al TEV, mientras que L-Arginina, Oleamida y Aldo-PC, mostraron niveles más elevados en pacientes con TEV, por lo que podrían estar asociados con un mayor riesgo trombótico.

6. Hemos obtenido un modelo asociado al TEV con los niveles plasmáticos de los 4 metabolitos, con una potencia estadística para diferenciar pacientes y controles superior a la mostrada por cada metabolito por separado. Este perfil podría ser utilizado como una firma metabólica asociada al TEV, cuya capacidad diagnóstica y pronóstica requieren futuros estudios que diluciden sus posibilidades clínicas.
7. Mediante un test global de la coagulación como es el Test de Generación de Trombina, se ha comprobado que la adición *in vitro* de L-Acetilcarnitina, L-Arginina y Oleamida son capaces de alterar el estado coagulativo de un *pool* de plasmas de controles sanos, produciendo un retraso en los tiempos de la coagulación junto al aumento de la generación de trombina total.
8. Se ha identificado, por primera vez, en un estudio caso-control mediante espectrometría de masas no dirigida en plasma, la asociación de 8 clases lipídicas con la enfermedad trombótica, mostrando niveles alterados en pacientes con TEV en comparación con controles sanos.
9. Hemos obtenido un modelo asociado al TEV que incluye 4 de las clases lipídicas identificadas, LPGs, FAs, SMs y Cers, capaz de separar robustamente ambas poblaciones de estudio con una potencia estadística muy elevada, superior a la estimada para cada clase de lípidos por separado.
10. Los niveles de 2 de estas clases lipídicas, los FAs y las SMs, han mostrado una fuerte asociación con la presencia de recurrencia trombótica. Estos resultados requieren futuros estudios que evalúen la capacidad clínica de estos biomarcadores para un posible tratamiento personalizado para cada paciente.
11. Tras analizar la asociación de los lípidos identificados en el análisis de forma individualizada, identificamos un nuevo modelo asociado al TEV, compuesto por 8 especies lipídicas: Cer(40:1), Cer(18:1/24:1), MG(18:0), PE(36:0), SM(16:1/16:0), SM(34:2), FA(16:0) y FA(18:0), el cual mostró una potencia estadística incluso superior al generado con las 4 clases lipídicas.

12. Futuros estudios son necesarios para determinar el papel de estos lípidos en la fisiopatología del TEV, posiblemente relacionado con la importante función que desarrolla la membrana celular en el proceso de la coagulación.



## **REFERENCIAS**



## 7. Referencias

- [1] G. E. Raskob et al., "Thrombosis: A Major Contributor to Global Disease Burden," *Semin Thromb Hemost*, vol. 40, no. 7, pp. 724–735, Aug. 2014, doi: 10.1055/s-0034-1390325.
- [2] M. G. Beckman, W. C. Hooper, S. E. Critchley, and T. L. Ortel, "Venous thromboembolism: a public health concern," *Am J Prev Med*, vol. 38, no. 4 Suppl, Apr. 2010, doi: 10.1016/J.AMEPRE.2009.12.017.
- [3] I. A. Næss, S. C. Christiansen, P. Romundstad, S. C. Cannegieter, F. R. Rosendaal, and J. Hammerstrøm, "Incidence and mortality of venous thrombosis: A population-based study," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, no. 4, pp. 692–699, Apr. 2007, doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02450.x.
- [4] F. A. Anderson et al., "A Population-Based Perspective of the Hospital Incidence and Case-Fatality Rates of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: The Worcester DVT Study," *Arch Intern Med*, vol. 151, no. 5, pp. 933–938, May 1991, doi: 10.1001/ARCHINTE.1991.00400050081016.
- [5] E. Oger and D. Mottier, "Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale.," *Thromb Haemost*, vol. 83, no. 5, pp. 657–60, 2000, doi: 10.1055/s-0037-1613887.
- [6] F. A. Spencer et al., "The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism," *J Gen Intern Med*, vol. 21, no. 7, pp. 722–727, 2006, doi: 10.1111/J.1525-1497.2006.00458.X.
- [7] A. Ruppert, T. Steinle, and M. Lees, "Economic burden of venous thromboembolism: a systematic review," *J Med Econ*, vol. 14, no. 1, pp. 65–74, 2011, doi: 10.3111/13696998.2010.546465.
- [8] S. D. Grosse, R. E. Nelson, K. A. Nyarko, L. C. Richardson, and G. E. Raskob, "The economic burden of incident venous thromboembolism in the United States: A review of estimated attributable healthcare costs," *Thromb Res*, vol. 137, pp. 3–10, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.THROMRES.2015.11.033.
- [9] M. Cushman, "Epidemiology and Risk Factors for Venous Thrombosis," *Semin Hematol*, vol. 44, no. 2, Apr. 2007, doi: 10.1053/j.seminhematol.2007.02.004.
- [10] W. Huang, R. J. Goldberg, F. A. Anderson, C. I. Kiefe, and F. A. Spencer, "Secular trends in occurrence of acute venous thromboembolism: The worcester VTE study (1985-2009)," *American Journal of Medicine*, vol. 127, no. 9, pp. 829-839.e5, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.amjmed.2014.03.041.
- [11] N. Arshad, T. Isaksen, J.-B. Hansen, and S. K. Brækkan, "Time trends in incidence rates of venous thromboembolism in a large cohort recruited from the general population," *Eur J Epidemiol*, vol. 32, no. 4, Apr. 2017, doi: 10.1007/s10654-017-0238-y.
- [12] M. D. Silverstein, J. A. Heit, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year

- population-based study," *Arch Intern Med*, vol. 158, no. 6, pp. 585–593, Mar. 1998, doi: 10.1001/ARCHINTE.158.6.585.
- [13] R. S. Wiener, L. M. Schwartz, and S. Woloshin, "Time trends in pulmonary embolism in the United States: evidence of overdiagnosis," *Arch Intern Med*, vol. 171, no. 9, pp. 831–836, May 2011, doi: 10.1001/ARCHINTERNMED.2011.178.
- [14] P. Prandoni et al., "The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis," *Ann Intern Med*, vol. 125, no. 1, pp. 1–7, 1996, doi: 10.7326/0003-4819-125-1-199607010-00001.
- [15] S. R. Kahn and J. S. Ginsberg, "The post-thrombotic syndrome: current knowledge, controversies, and directions for future research.," *Blood Rev*, vol. 16, no. 3, pp. 155–165, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0268-960X(02)00008-5.
- [16] A. A. Ashrani and J. A. Heit, "Incidence and cost burden of post-thrombotic syndrome," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 28, no. 4, pp. 465–476, 2009, doi: 10.1007/S11239-009-0309-3.
- [17] S. K. Brækkan et al., "Venous thromboembolism and subsequent permanent work-related disability," *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 10, pp. 1978–1987, Oct. 2016, doi: 10.1111/JTH.13411.
- [18] S. R. Kahn, A. Hirsch, and I. Shrier, "Effect of postthrombotic syndrome on health-related quality of life after deep venous thrombosis," *Arch Intern Med*, vol. 162, no. 10, pp. 1144–1148, May 2002, doi: 10.1001/ARCHINTE.162.10.1144.
- [19] I. M. van Korlaar et al., "The impact of venous thrombosis on quality of life," *Thromb Res*, vol. 114, no. 1, Jan. 2004, doi: 10.1016/j.thromres.2004.04.007.
- [20] M. Stain et al., "The post-thrombotic syndrome: risk factors and impact on the course of thrombotic disease," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 12, pp. 2671–2676, Dec. 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01648.X.
- [21] V. Pengo et al., "Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism," *N Engl J Med*, vol. 350, no. 22, pp. 2257–2264, May 2004, doi: 10.1056/NEJM0A032274.
- [22] A. Palla, B. Fonnichi, A. Santolicandro, G. di Ricco, and C. Giuntini, "From not detected pulmonary embolism to diagnosis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: A retrospective study," *Respiration*, vol. 60, no. 1, pp. 9–14, 1993, doi: 10.1159/000196166.
- [23] M. Delcroix et al., "Long-Term Outcome of Patients With Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Results From an International Prospective Registry," *Circulation*, vol. 133, no. 9, pp. 859–871, Mar. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016522.
- [24] P. Prandoni et al., "The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients," *Haematologica*, vol. 92, no. 2, 2007, doi: 10.3324/HAEMATOL.10516.
- [25] J. A. Heit, D. N. Mohr, M. D. Silverstein, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Predictors of recurrence after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a

population-based cohort study," *Arch Intern Med*, vol. 160, no. 6, pp. 761–768, Mar. 2000, doi: 10.1001/ARCHINTE.160.6.761.

[26] P. O. Hansson, J. Sörbo, and H. Eriksson, "Recurrent venous thromboembolism after deep vein thrombosis: incidence and risk factors," *Arch Intern Med*, vol. 160, no. 6, pp. 769–774, Mar. 2000, doi: 10.1001/ARCHINTE.160.6.769.

[27] S. Schulman et al., "Post-thrombotic syndrome, recurrence, and death 10 years after the first episode of venous thromboembolism treated with warfarin for 6 weeks or 6 months," *J Thromb Haemost*, vol. 4, no. 4, pp. 734–742, Apr. 2006, doi: 10.1111/J.1538-7836.2006.01795.X.

[28] S. Murin, P. S. Romano, and R. H. White, "Comparison of outcomes after hospitalization for deep venous thrombosis or pulmonary embolism.," *Thromb Haemost*, vol. 88, no. 3, Sep. 2002.

[29] C. Laczkovics et al., "Risk of recurrence after a first venous thromboembolic event in young women," *Haematologica*, vol. 92, no. 9, pp. 1201–1207, Sep. 2007, doi: 10.3324/HAEMATOL.10967.

[30] S. Eichinger et al., "Overweight, obesity, and the risk of recurrent venous thromboembolism," *Arch Intern Med*, vol. 168, no. 15, pp. 1678–1683, Aug. 2008, doi: 10.1001/ARCHINTE.168.15.1678.

[31] E. Romualdi, A. Squizzato, and W. Ageno, "Abdominal obesity and the risk of recurrent deep vein thrombosis," *Thromb Res*, vol. 119, no. 6, pp. 687–690, 2007, doi: 10.1016/J.THROMRES.2006.05.013.

[32] P. A. Kyrle, E. Minar, C. Bialonczyk, M. Hirschl, A. Weltermann, and S. Eichinger, "The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women," *N Engl J Med*, vol. 350, no. 25, pp. 2558–2563, Jun. 2004, doi: 10.1056/NEJMOA032959.

[33] S. C. Christiansen, W. M. Lijfering, F. M. Helmerhorst, F. R. Rosendaal, and S. C. Cannegieter, "Sex difference in risk of recurrent venous thrombosis and the risk profile for a second event," *J Thromb Haemost*, vol. 8, no. 10, pp. 2159–2168, Oct. 2010, doi: 10.1111/J.1538-7836.2010.03994.X.

[34] S. McRae, H. Tran, S. Schulman, J. Ginsberg, and C. Kearon, "Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis," *The Lancet*, vol. 368, no. 9533, Jul. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)9110-1.

[35] W. M. Lijfering et al., "A lower risk of recurrent venous thrombosis in women compared with men is explained by sex-specific risk factors at time of first venous thrombosis in thrombophilic families," *Blood*, vol. 114, no. 10, pp. 2031–2036, 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2009-04-215418.

[36] J. Douketis et al., "Risk of recurrence after venous thromboembolism in men and women: patient level meta-analysis," *BMJ*, vol. 342, no. 7796, p. 535, Feb. 2011, doi: 10.1136/BMJ.D813.

[37] B. A. Hutten, M. H. Prins, M. Gent, J. Ginsberg, J. G. P. Tijssen, and H. R. Büller, "Incidence of recurrent thromboembolic and bleeding complications among patients with venous thromboembolism in relation to both malignancy and achieved international

normalized ratio: a retrospective analysis," *J Clin Oncol*, vol. 18, no. 17, pp. 3078–3083, 2000, doi: 10.1200/JCO.2000.18.17.3078.

[38] P. Prandoni et al., "Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis," *Blood*, vol. 100, no. 10, pp. 3484–3488, Nov. 2002, doi: 10.1182/BLOOD-2002-01-0108.

[39] M. L. Louzada, H. Majeed, V. Dao, and P. S. Wells, "Risk of recurrent venous thromboembolism according to malignancy characteristics in patients with cancer-associated thrombosis: a systematic review of observational and intervention studies," *Blood Coagul Fibrinolysis*, vol. 22, no. 2, pp. 86–91, Mar. 2011, doi: 10.1097/MBC.0B013E328341F030.

[40] M. L. Louzada et al., "Development of a clinical prediction rule for risk stratification of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer-associated venous thromboembolism," *Circulation*, vol. 126, no. 4, pp. 448–454, Jul. 2012, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.051920.

[41] C. E. Chee et al., "Predictors of venous thromboembolism recurrence and bleeding among active cancer patients: a population-based cohort study," *Blood*, vol. 123, no. 25, pp. 3972–3978, Jun. 2014, doi: 10.1182/BLOOD-2014-01-549733.

[42] T. Baglin, R. Luddington, K. Brown, and C. Baglin, "Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study," *Lancet*, vol. 362, no. 9383, pp. 523–526, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0140-6736(03)14111-6.

[43] A. Iorio et al., "Risk of recurrence after a first episode of symptomatic venous thromboembolism provoked by a transient risk factor: a systematic review," *Arch Intern Med*, vol. 170, no. 19, pp. 1710–1716, Oct. 2010, doi: 10.1001/ARCHINTERNMED.2010.367.

[44] T. Baglin et al., "Does the clinical presentation and extent of venous thrombosis predict likelihood and type of recurrence? A patient-level meta-analysis," *J Thromb Haemost*, vol. 8, no. 11, pp. 2436–2442, Nov. 2010, doi: 10.1111/J.1538-7836.2010.04022.X.

[45] M. J. Kovacs et al., "Patients with a first symptomatic unprovoked deep vein thrombosis are at higher risk of recurrent venous thromboembolism than patients with a first unprovoked pulmonary embolism," *J Thromb Haemost*, vol. 8, no. 9, pp. 1926–1932, Sep. 2010, doi: 10.1111/J.1538-7836.2010.03958.X.

[46] S. S, S. E, and G. S, "Anticardiolipin antibodies predict early recurrence of thromboembolism and death among patients with venous thromboembolism following anticoagulant therapy. Duration of Anticoagulation Study Group," *Am J Med*, vol. 104, no. 4, pp. 332–338, 1998, doi: 10.1016/S0002-9343(98)00060-6.

[47] D. Garcia, E. A. Akl, R. Carr, and C. Kearon, "Antiphospholipid antibodies and the risk of recurrence after a first episode of venous thromboembolism: a systematic review," *Blood*, vol. 122, no. 5, pp. 817–824, Aug. 2013, doi: 10.1182/BLOOD-2013-04-496257.

[48] A. G. M. van den Belt et al., "Recurrence of Venous Thromboembolism in Patients With Familial Thrombophilia," *Arch Intern Med*, vol. 157, no. 19, pp. 2227–2232, Oct. 1997, doi: 10.1001/ARCHINTE.1997.00440400077009.

- [49] C. Y. Vossen et al., “Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT),” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no. 3, pp. 459–464, Mar. 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01197.X.
- [50] J.-L. P. Brouwer, W. M. Lijfering, M. K. ten Kate, H. C. Kluin-Nelemans, N. J. G. M. Veeger, and J. van der Meer, “High long-term absolute risk of recurrent venous thromboembolism in patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin.,” *Thromb Haemost*, vol. 101, no. 1, Jan. 2009.
- [51] J. Douketis et al., “Patient-level meta-analysis: effect of measurement timing, threshold, and patient age on ability of D-dimer testing to assess recurrence risk after unprovoked venous thromboembolism,” *Ann Intern Med*, vol. 153, no. 8, pp. 523–531, Oct. 2010, doi: 10.7326/0003-4819-153-8-201010190-00009.
- [52] B. Cosmi et al., “Usefulness of repeated D-dimer testing after stopping anticoagulation for a first episode of unprovoked venous thromboembolism: the PROLONG II prospective study,” *Blood*, vol. 115, no. 3, pp. 481–488, Jan. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2009-08-237354.
- [53] G. Palareti et al., “D-dimer to guide the duration of anticoagulation in patients with venous thromboembolism: a management study,” *Blood*, vol. 124, no. 2, pp. 196–203, Jul. 2014, doi: 10.1182/BLOOD-2014-01-548065.
- [54] M. Tan, I. C. M. Mos, F. A. Klok, and M. v. Huisman, “Residual venous thrombosis as predictive factor for recurrent venous thromboembolism in patients with proximal deep vein thrombosis: a systematic review,” *Br J Haematol*, vol. 153, no. 2, pp. 168–178, Apr. 2011, doi: 10.1111/J.1365-2141.2011.08578.X.
- [55] G. le Gal et al., “Residual vein obstruction as a predictor for recurrent thromboembolic events after a first unprovoked episode: data from the REVERSE cohort study,” *J Thromb Haemost*, vol. 9, no. 6, pp. 1126–1132, Jun. 2011, doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04240.X.
- [56] S. Eichinger, G. Heinze, L. M. Jandek, and P. A. Kyrle, “Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model,” *Circulation*, vol. 121, no. 14, pp. 1630–1636, Apr. 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.925214.
- [57] A. Tostetto et al., “Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH),” *J Thromb Haemost*, vol. 10, no. 6, pp. 1019–1025, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1538-7836.2012.04735.X.
- [58] P. A. Kyrle and S. Eichinger, “Clinical scores to predict recurrence risk of venous thromboembolism,” *Thromb Haemost*, vol. 108, no. 6, pp. 1061–1064, 2012, doi: 10.1160/TH12-05-0353.
- [59] D. Poli and G. Palareti, “Assessing recurrence risk following acute venous thromboembolism: use of algorithms,” *Curr Opin Pulm Med*, vol. 19, no. 5, pp. 407–412, Sep. 2013, doi: 10.1097/MCP.0B013E328363ED7C.
- [60] P. L. den Exter, J. Kooiman, and M. v. Huisman, “Validation of the Ottawa prognostic score for the prediction of recurrent venous thromboembolism in patients with cancer-

- associated thrombosis," *J Thromb Haemost*, vol. 11, no. 5, pp. 998–1000, May 2013, doi: 10.1111/JTH.12192.
- [61] G. D. Barnes, Y. Kanthi, and J. B. Froehlich, "Venous thromboembolism: Predicting recurrence and the need for extended anticoagulation," *Vasc Med*, vol. 20, no. 2, p. 143, Apr. 2015, doi: 10.1177/1358863X14566429.
- [62] J. A. Heit, M. D. Silverstein, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Predictors of survival after deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based, cohort study," *Arch Intern Med*, vol. 159, no. 5, pp. 445–453, Mar. 1999, doi: 10.1001/ARCHINTE.159.5.445.
- [63] M. S. Andresen et al., "Mortality and recurrence after treatment of VTE: long term follow-up of patients with good life-expectancy," *Thromb Res*, vol. 127, no. 6, pp. 540–546, 2011, doi: 10.1016/J.THROMRES.2011.02.017.
- [64] K. K. Sogaard, M. Schmidt, L. Pedersen, E. Horváth-Puhó, and H. T. Sørensen, "30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study," *Circulation*, vol. 130, no. 10, pp. 829–836, Sep. 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009107.
- [65] L. E. Flinterman, A. van Hylckama Vlieg, S. C. Cannegieter, and F. R. Rosendaal, "Long-term survival in a large cohort of patients with venous thrombosis: incidence and predictors," *PLoS Med*, vol. 9, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.1001155.
- [66] A. C. Chwan Ng, T. Chung, A. S. C. Yong, H. S. P. Wong, D. S. Celermajer, and L. Kritharides, "Long-term cardiovascular and noncardiovascular mortality of 1023 patients with confirmed acute pulmonary embolism," *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, vol. 4, no. 1, pp. 122–128, Jan. 2011, doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.110.958397.
- [67] S. E. Reitter et al., "Long-term survival of patients with a history of venous thromboembolism," *Ann Hematol*, vol. 90, no. 5, pp. 585–594, May 2011, doi: 10.1007/S00277-011-1160-0.
- [68] F. A. Klok et al., "Patient outcomes after acute pulmonary embolism. A pooled survival analysis of different adverse events," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 181, no. 5, pp. 501–506, Mar. 2010, doi: 10.1164/RCCM.200907-1141OC.
- [69] P. Prandoni et al., "The clinical course of deep-vein thrombosis. Prospective long-term follow-up of 528 symptomatic patients.," *Haematologica*, vol. 82, no. 4.
- [70] W. D. Kniffin, J. A. Baron, J. Barrett, J. D. Birkmeyer, and F. A. Anderson, "The epidemiology of diagnosed pulmonary embolism and deep venous thrombosis in the elderly.," *Arch Intern Med*, vol. 154, no. 8, Apr. 1994.
- [71] Rudolf Virchow *Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin*. In: R V (ed). Frankfurt A M Von Meidinger Sohn 1856.
- [72] J. A. López and J. Chen, "Pathophysiology of venous thrombosis," *Thromb Res*, vol. 123, Jan. 2009, doi: 10.1016/S0049-3848(09)70140-9.
- [73] C. Kroegel and A. Reissig, "Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: Epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis," *Respiration*, vol. 70, no. 1, pp. 7–30, 2003, doi: 10.1159/000068427.

- [74] D. D. Myers, "Pathophysiology of venous thrombosis," *Phlebology*, vol. 30, no. 1 Suppl, pp. 7–13, Mar. 2015, doi: 10.1177/0268355515569424.
- [75] G. Davì and C. Patrono, "Platelet activation and atherothrombosis," *N Engl J Med*, vol. 357, no. 24, pp. 2482–2494, Dec. 2007, doi: 10.1056/NEJMRA071014.
- [76] B. Furie and B. C. Furie, "Mechanisms of Thrombus Formation," *New England Journal of Medicine*, vol. 359, no. 9, Aug. 2008, doi: 10.1056/NEJMra0801082.
- [77] A. D. Tselepis, G. Gerotziapas, G. Andrikopoulos, H. Anninos, and P. Vardas, "Mechanisms of platelet activation and modification of response to antiplatelet agents.," *Hellenic J Cardiol*, vol. 52, no. 2.
- [78] L. Jennings, "Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis," *Thromb Haemost*, vol. 102, no. 08, Nov. 2009, doi: 10.1160/TH09-03-0192.
- [79] T. Osaki and A. Ichinose, "Current views of activating and regulatory mechanisms of blood coagulation.," *Nihon Rinsho*, vol. 72, no. 7, Jul. 2014.
- [80] R. G. MACFARLANE, "An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier," *Nature*, vol. 202, no. 4931, May 1964, doi: 10.1038/202498a0.
- [81] E. W. Davie and O. D. Ratnoff, "WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING," *Science*, vol. 145, no. 3638, pp. 1310–1312, 1964, doi: 10.1126/SCIENCE.145.3638.1310.
- [82] T. Renné, A. H. Schmaier, K. F. Nickel, M. Blombäck, and C. Maas, "In vivo roles of factor XII," *Blood*, vol. 120, no. 22, p. 4296, Nov. 2012, doi: 10.1182/BLOOD-2012-07-292094.
- [83] H. D. Fernandes, S. Newton, and J. M. Rodrigues, "Factor XII Deficiency Mimicking Bleeding Diathesis: A Unique Presentation and Diagnostic Pitfall," *Cureus*, vol. 10, no. 6, Jun. 2018, doi: 10.7759/CUREUS.2817.
- [84] B. Furie and B. C. Furie, "Thrombus formation in vivo," *J Clin Invest*, vol. 115, no. 12, pp. 3355–3362, Dec. 2005, doi: 10.1172/JCI26987.
- [85] L. AT, K. E, J. R, F. TA, and R. T, "Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity," *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 3, 2016, doi: 10.1111/JTH.13235.
- [86] M. Hoffman and D. M. Monroe, "A cell-based model of hemostasis," *Thromb Haemost*, vol. 85, no. 6, pp. 958–965, Dec. 2001, doi: 10.1055/S-0037-1615947/ID/JR2773-12.
- [87] J. H. Griffin, B. v. Zlokovic, and L. O. Mosnier, "Activated protein C, protease activated receptor 1, and neuroprotection," *Blood*, vol. 132, no. 2, pp. 159–169, Jul. 2018, doi: 10.1182/BLOOD-2018-02-769026.
- [88] K. Shahzad, S. Kohli, M. M. Al-Dabet, and B. Isermann, "Cell biology of activated protein C," *Curr Opin Hematol*, vol. 26, no. 1, pp. 41–50, Jan. 2019, doi: 10.1097/MOH.0000000000000473.

- [89] D. Borgel and A. Vieillard-Baron, "Activated protein C, a protein at the crossroads between coagulation and inflammation," *Med Sci (Paris)*, vol. 27, no. 5, pp. 501–507, May 2011, doi: 10.1051/MEDSCI/2011275015.
- [90] W. P. Fay, N. Garg, and M. Sunkar, "Vascular functions of the plasminogen activation system," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 27, no. 6, pp. 1231–1237, Jun. 2007, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.140046.
- [91] D. C. Rijken and H. R. Lijnen, "New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system," *J Thromb Haemost*, vol. 7, no. 1, pp. 4–13, 2009, doi: 10.1111/J.1538-7836.2008.03220.X.
- [92] M. Crous-Bou, L. Harrington, and C. Kabrhel, "Environmental and Genetic Risk Factors Associated with Venous Thromboembolism," *Semin Thromb Hemost*, vol. 42, no. 08, pp. 808–820, Oct. 2016, doi: 10.1055/s-0036-1592333.
- [93] F. R. Rosendaal, "Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior," *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pp. 1–12, 2005, doi: 10.1182/ASHEDUCATION-2005.1.1.
- [94] J. C. Souto et al., "Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia," *Am J Hum Genet*, vol. 67, no. 6, pp. 1452–1459, 2000, doi: 10.1086/316903.
- [95] J. A. Heit, "The epidemiology of venous thromboembolism in the community: implications for prevention and management," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 21, no. 1, pp. 23–29, Feb. 2006, doi: 10.1007/S11239-006-5572-Y.
- [96] N. Arshad, E. Bjøri, K. Hindberg, T. Isaksen, J. B. Hansen, and S. K. Brækkan, "Recurrence and mortality after first venous thromboembolism in a large population-based cohort," *J Thromb Haemost*, vol. 15, no. 2, pp. 295–303, Feb. 2017, doi: 10.1111/JTH.13587.
- [97] F. A. Spencer et al., "Incidence rates, clinical profile, and outcomes of patients with venous thromboembolism. The Worcester VTE study," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 28, no. 4, Nov. 2009, doi: 10.1007/s11239-009-0378-3.
- [98] D. D. Ribeiro, W. M. Lijfering, F. R. Rosendaal, and S. C. Cannegieter, "Risk of venous thrombosis in persons with increased body mass index and interactions with other genetic and acquired risk factors," *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 8, pp. 1572–1578, Aug. 2016, doi: 10.1111/JTH.13371.
- [99] I. D. Bezemer, F. J. M. van der Meer, J. C. J. Eikenboom, F. R. Rosendaal, and C. J. M. Doggen, "The Value of Family History as a Risk Indicator for Venous Thrombosis," *Arch Intern Med*, vol. 169, no. 6, pp. 610–615, Mar. 2009, doi: 10.1001/ARCHINTERNMED.2008.589.
- [100] S. Noboa et al., "Family history as a risk factor for venous thromboembolism," *Thromb Res*, vol. 122, no. 5, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.thromres.2007.12.026.
- [101] B. Zöller, X. Li, J. Sundquist, and K. Sundquist, "Familial transmission of venous thromboembolism: a cohort study of 80 214 Swedish adoptees linked to their biological and adoptive parents," *Circ Cardiovasc Genet*, vol. 7, no. 3, pp. 296–303, 2014, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000341.

- [102] B. Zöller, H. Ohlsson, J. Sundquist, and K. Sundquist, "Familial risk of venous thromboembolism in first-, second- and third-degree relatives: a nationwide family study in Sweden," *Thromb Haemost*, vol. 109, no. 03, Nov. 2013, doi: 10.1160/TH12-10-0743.
- [103] R. H. White, H. Zhou, and P. S. Romano, "Incidence of idiopathic deep venous thrombosis and secondary thromboembolism among ethnic groups in California," *Ann Intern Med*, vol. 128, no. 9, pp. 737–740, May 1998, doi: 10.7326/0003-4819-128-9-19980510-00006.
- [104] P. D. Stein, F. Kayali, R. E. Olson, and C. E. Milford, "Pulmonary thromboembolism in Asians/Pacific Islanders in the United States: analysis of data from the National Hospital Discharge Survey and the United States Bureau of the Census," *Am J Med*, vol. 116, no. 7, pp. 435–442, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.AMJMED.2003.11.020.
- [105] F. Piovella et al., "Deep-vein thrombosis rates after major orthopedic surgery in Asia. An epidemiological study based on postoperative screening with centrally adjudicated bilateral venography," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 12, pp. 2664–2670, Dec. 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01621.X.
- [106] V. Leung, V. Leung, W. Lui, T. Chan, R. S. M. Wong, and G. Cheng, "Incidence of deep vein thrombosis in hospitalized Chinese medical patients is similar to that in western populations," *Thromb Res*, vol. 118, no. 6, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.thromres.2005.12.014.
- [107] B. L. Y. Cheuk, G. C. Y. Cheung, and S. W. K. Cheng, "Epidemiology of venous thromboembolism in a Chinese population," *British Journal of Surgery*, vol. 91, no. 4, Mar. 2004, doi: 10.1002/bjs.4454.
- [108] P. M. Ridker, J. P. Miletich, C. H. Hennekens, and J. E. Buring, "Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening," *JAMA*, vol. 277, no. 16.
- [109] J. P. Gregg, A. J. Yamane, and W. W. Grody, "Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations," *Am J Med Genet*, vol. 73, no. 3, Dec. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19971219)73:3<334::AID-AJMG20>3.0.CO;2-J.
- [110] P. Angchaisuksiri et al., "Prevalence of the G1691A mutation in the factor V gene (factor V Leiden) and the G20210A prothrombin gene mutation in the Thai population," *Am J Hematol*, vol. 65, no. 2, Oct. 2000, doi: 10.1002/1096-8652(200010)65:2<119::AID-AJH5>3.0.CO;2-8.
- [111] F. H. Herrmann et al., "Prevalence of factor V Leiden mutation in various populations," *Genet Epidemiol*, vol. 14, no. 4, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1098-2272(1997)14:4<403::AID-GEPI5>3.0.CO;2-3.
- [112] N. F. Dowling, H. Austin, A. Dilley, C. Whitsett, B. L. Evatt, and W. C. Hooper, "The epidemiology of venous thromboembolism in Caucasians and African-Americans: the GATE Study," *J Thromb Haemost*, vol. 1, no. 1, pp. 80–87, Jan. 2003, doi: 10.1046/J.1538-7836.2003.00031.X.
- [113] F. Dentali et al., "Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature," *Semin Thromb Hemost*, vol. 38, no. 5, pp. 535–547, 2012, doi: 10.1055/S-0032-1315758.

- [114] S. K. Vasan et al., “ABO Blood Group and Risk of Thromboembolic and Arterial Disease: A Study of 1.5 Million Blood Donors,” *Circulation*, vol. 133, no. 15, pp. 1449–1457, Apr. 2016, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017563.
- [115] H. Pang, Z. Zong, L. Hao, and Q. Cao, “ABO blood group influences risk of venous thromboembolism and myocardial infarction,” *J Thromb Thrombolysis*, vol. 50, no. 2, Aug. 2020, doi: 10.1007/s11239-019-02012-7.
- [116] J. C. Gill, J. Endres-Brooks, P. J. Bauer, W. J. Marks, and R. R. Montgomery, “The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease,” *Blood*, vol. 69, no. 6, Jun. 1987.
- [117] M. Franchini, F. Capra, G. Targher, M. Montagnana, and G. Lippi, “Relationship between ABO blood group and von Willebrand factor levels: From biology to clinical implications,” *Thromb J*, vol. 5, no. 1, pp. 1–5, Sep. 2007, doi: 10.1186/1477-9560-5-14/METRICS.
- [118] S. Khan and J. D. Dickerman, “Hereditary thrombophilia,” *Thromb J*, vol. 4, p. 15, Sep. 2006, doi: 10.1186/1477-9560-4-15.
- [119] F. Croles, J. Borjas-Howard, K. Nasserinejad, F. Leebeek, and K. Meijer, “Risk of Venous Thrombosis in Antithrombin Deficiency: A Systematic Review and Bayesian Meta-analysis,” *Semin Thromb Hemost*, vol. 44, no. 04, Jun. 2018, doi: 10.1055/s-0038-1625983.
- [120] L. Martos et al., “Identification of 58 Mutations (26 Novel) in 94 of 109 Symptomatic Spanish Proband with Protein C Deficiency,” *Thromb Haemost*, vol. 119, no. 9, pp. 1409–1418, 2019, doi: 10.1055/S-0039-1692440.
- [121] B. K. Mahmoodi et al., “A prospective cohort study on the absolute risks of venous thromboembolism and predictive value of screening asymptomatic relatives of patients with hereditary deficiencies of protein S, protein C or antithrombin,” *J Thromb Haemost*, vol. 8, no. 6, pp. 1193–1200, Jun. 2010, doi: 10.1111/J.1538-7836.2010.03840.X.
- [122] I. Martinelli et al., “Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families,” *Blood*, vol. 92, no. 7, Oct. 1998.
- [123] R. M. Bertina et al., “Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C,” *Nature*, vol. 369, no. 6475, pp. 64–67, 1994, doi: 10.1038/369064A0.
- [124] P. E. Morange, P. Suchon, and D. A. Trégouët, “Genetics of Venous Thrombosis: update in 2015,” *Thromb Haemost*, vol. 114, no. 5, pp. 910–919, 2015, doi: 10.1160/TH15-05-0410.
- [125] D. C. Rees, M. Cox, and J. B. Clegg, “World distribution of factor V Leiden,” *Lancet*, vol. 346, no. 8983, pp. 1133–1134, Oct. 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)91803-5.
- [126] F. R. Rosendaal, T. Koster, J. P. Vandenbroucke, and P. H. Reitsma, “High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance),” *Blood*, vol. 85, no. 6, Mar. 1995.
- [127] S. R. Poort, F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma, and R. M. Bertina, “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*, vol. 88, no. 10, Nov. 1996.

- [128] C. Leroyer et al., "Prevalence of 20210 A allele of the prothrombin gene in venous thromboembolism patients.," *Thromb Haemost*, vol. 80, no. 1, Jul. 1998.
- [129] A. Zivelin et al., "A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene.," *Blood*, vol. 92, no. 4, Aug. 1998.
- [130] T. Koster, J. P. Vandenbroucke, F. R. Rosendaal, E. Briët, and A. D. Blann, "Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis," *Lancet*, vol. 345, no. 8943, pp. 152–155, Jan. 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)90166-3.
- [131] T. Koster, F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma, P. A. van der Velden, E. Briët, and J. P. Vandenbroucke, "Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms--the Leiden Thrombophilia Study (LETS).," *Thromb Haemost*, vol. 71, no. 6, Jun. 1994.
- [132] A. van Hylckama Vlieg, I. K. van der Linden, R. M. Bertina, and F. R. Rosendaal, "High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis.," *Blood*, vol. 95, no. 12, Jun. 2000.
- [133] M. C. de Visser, S. R. Poort, H. L. Vos, F. R. Rosendaal, and R. M. Bertina, "Factor X levels, polymorphisms in the promoter region of factor X, and the risk of venous thrombosis.," *Thromb Haemost*, vol. 85, no. 6, Jun. 2001.
- [134] J. C. M. Meijers, W. L. H. Tekelenburg, B. N. Bouma, R. M. Bertina, and F. R. Rosendaal, "High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis," *N Engl J Med*, vol. 342, no. 10, pp. 696–701, Mar. 2000, doi: 10.1056/NEJM200003093421004.
- [135] A. W. Tsai et al., "Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE)," *Am J Med*, vol. 113, no. 8, Dec. 2002, doi: 10.1016/S0002-9343(02)01345-1.
- [136] P. V. Jenkins, O. Rawley, O. P. Smith, and J. S. O'Donnell, "Elevated factor VIII levels and risk of venous thrombosis," *Br J Haematol*, vol. 157, no. 6, pp. 653–663, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1365-2141.2012.09134.X.
- [137] M. Cushman, E. S. O'Meara, A. R. Folsom, and S. R. Heckbert, "Coagulation factors IX through XIII and the risk of future venous thrombosis: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology," *Blood*, vol. 114, no. 14, pp. 2878–2883, 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2009-05-219915.
- [138] P. W. Kamphuisen, F. R. Rosendaal, J. C. J. Eikenboom, R. Bos, and R. M. Bertina, "Factor V antigen levels and venous thrombosis: risk profile, interaction with factor V leiden, and relation with factor VIII antigen levels," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 20, no. 5, pp. 1382–1386, 2000, doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1382.
- [139] I. M. Rietveld et al., "High levels of coagulation factors and venous thrombosis risk: strongest association for factor VIII and von Willebrand factor," *J Thromb Haemost*, vol. 17, no. 1, pp. 99–109, Jan. 2019, doi: 10.1111/JTH.14343.
- [140] P. Simioni et al., "X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)," *New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 17, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0904377.

- [141] B. J. Samelson-Jones, J. D. Finn, L. A. George, R. M. Camire, and V. R. Arruda, "Hyperactivity of factor IX Padua (R338L) depends on factor VIIIa cofactor activity," *JCI Insight*, vol. 5, no. 14, Jul. 2019, doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.128683.
- [142] S. U. de Willige, M. C. H. de Visser, J. J. Houwing-Duistermaat, F. R. Rosendaal, H. L. Vos, and R. M. Bertina, "Genetic variation in the fibrinogen gamma gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen gamma' levels," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4176–4183, Dec. 2005, doi: 10.1182/BLOOD-2005-05-2180.
- [143] M. M. Eldibany and J. A. Caprini, "Hyperhomocysteinemia and Thrombosis: An Overview," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 131, no. 6, pp. 872–884, Jun. 2007, doi: 10.5858/2007-131-872-HATAO.
- [144] O. IT, S. A, and P. RD, "Risk of Venous Thrombosis in Carriers of a Common Mutation in the Homocysteine Regulatory Enzyme Methylenetetrahydrofolate Reductase," *Mol Diagn*, vol. 2, no. 1, pp. 61–68, Mar. 1997, doi: 10.1054/MODI00200061.
- [145] D. Gemmati, M. L. Serino, C. Trivellato, S. Fiorini, and G. L. Scapoli, "C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients.," *Haematologica*, vol. 84, no. 9, Sep. 1999.
- [146] H. Fujimura et al., "Common C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene increases the risk for deep vein thrombosis in patients with predisposition of thrombophilia," *Thromb Res*, vol. 98, no. 1, pp. 1–8, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0049-3848(99)00231-5.
- [147] J. G. Ray, D. Shmorgun, and W. S. Chan, "Common C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thromboembolism: meta-analysis of 31 studies," *Pathophysiol Haemost Thromb*, vol. 32, no. 2, pp. 51–58, 2002, doi: 10.1159/000065076.
- [148] M. den Heijer, S. Lewington, and R. Clarke, "Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 2, pp. 292–299, Feb. 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01141.X.
- [149] I. D. Bezemer, C. J. M. Doggen, H. L. Vos, and F. R. Rosendaal, "No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study," *Arch Intern Med*, vol. 167, no. 5, pp. 497–501, Mar. 2007, doi: 10.1001/ARCHINTE.167.5.497.
- [150] P. E. Morange and D. A. Tregouet, "Lessons from genome-wide association studies in venous thrombosis," *J Thromb Haemost*, vol. 9 Suppl 1, no. 1 S, pp. 258–264, Jul. 2011, doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04311.X.
- [151] P. O. Hansson, L. Welin, G. Tibblin, and H. Eriksson, "Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism in the General Population: 'The Study of Men Born in 1913,'" *Arch Intern Med*, vol. 157, no. 15, pp. 1665–1670, Aug. 1997, doi: 10.1001/ARCHINTE.1997.00440360079008.
- [152] K. van Langevelde, A. Šrámek, and F. R. Rosendaal, "The effect of aging on venous valves," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 30, no. 10, pp. 2075–2080, Oct. 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.110.209049.

- [153] L. Larsson, G. Grimby, and J. Karlsson, "Muscle strength and speed of movement in relation to age and muscle morphology," *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, vol. 46, no. 3, pp. 451–456, 1979, doi: 10.1152/JAPPL.1979.46.3.451.
- [154] H. Olsen and T. Länne, "Reduced venous compliance in lower limbs of aging humans and its importance for capacitance function," *Am J Physiol*, vol. 275, no. 3, 1998, doi: 10.1152/AJPHEART.1998.275.3.H878.
- [155] C. N. Young, M. E. Stillabower, A. DiSabatino, and W. B. Farquhar, "Venous smooth muscle tone and responsiveness in older adults," *J Appl Physiol*, vol. 101, no. 5, Nov. 2006, doi: 10.1152/jappphysiol.00448.2006.
- [156] M. G. Conlan et al., "Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.," *Thromb Haemost*, vol. 70, no. 3, pp. 380–5, Sep. 1993.
- [157] P.-Y. Scarabin et al., "Population Correlates of Coagulation Factor VII," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 16, no. 9, Sep. 1996, doi: 10.1161/01.ATV.16.9.1170.
- [158] S. McRae, H. Tran, S. Schulman, J. Ginsberg, and C. Kearon, "Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis," *Lancet*, vol. 368, no. 9533, pp. 371–378, Jul. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)69110-1.
- [159] D. Tormene, V. Ferri, S. Carraro, and P. Simioni, "Gender and the Risk of Venous Thromboembolism," *Semin Thromb Hemost*, vol. 37, no. 03, Apr. 2011, doi: 10.1055/s-0031-1273083.
- [160] M. Cushman et al., "Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology," *Am J Med*, vol. 117, no. 1, pp. 19–25, Jul. 2004, doi: 10.1016/J.AMJMED.2004.01.018.
- [161] M. NORDSTRÖM, B. LINDBLAD, D. BERGQVIST, and T. KJELLSTRÖM, "A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population," *J Intern Med*, vol. 232, no. 2, pp. 155–160, 1992, doi: 10.1111/J.1365-2796.1992.TB00565.X.
- [162] A. L. Marshall et al., "Sex-based disparities in venous thromboembolism outcomes: A National Inpatient Sample (NIS)-based analysis," *Vasc Med*, vol. 22, no. 2, pp. 121–127, Apr. 2017, doi: 10.1177/1358863X17693103.
- [163] P. Poirier et al., "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism," *Circulation*, vol. 113, no. 6, pp. 898–918, Feb. 2006, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016.
- [164] T. M. Powell-Wiley et al., "Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association," *Circulation*, vol. 143, pp. E984–E1010, May 2021, doi: 10.1161/CIR.0000000000000973.
- [165] A. W. Tsai, M. Cushman, W. D. Rosamond, S. R. Heckbert, J. F. Polak, and A. R. Folsom, "Cardiovascular Risk Factors and Venous Thromboembolism Incidence: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology," *Arch Intern Med*, vol. 162, no. 10, pp. 1182–1189, May 2002, doi: 10.1001/ARCHINTE.162.10.1182.

- [166] M. Abdollahi, M. Cushman, and F. R. Rosendaal, "Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use.," *Thromb Haemost*, vol. 89, no. 3, Mar. 2003.
- [167] P. D. Stein, A. Beemath, and R. E. Olson, "Obesity as a risk factor in venous thromboembolism," *Am J Med*, vol. 118, no. 9, pp. 978–980, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.AMJMED.2005.03.012.
- [168] H. Sugerman, A. Windsor, M. Bessos, and L. Wolfe, "Intra-abdominal pressure, sagittal abdominal diameter and obesity comorbidity," *J Intern Med*, vol. 241, no. 1, pp. 71–79, 1997, doi: 10.1046/J.1365-2796.1997.89104000.X.
- [169] T. Willenberg et al., "Impact of obesity on venous hemodynamics of the lower limbs," *J Vasc Surg*, vol. 52, no. 3, pp. 664–668, Sep. 2010, doi: 10.1016/J.JVS.2010.04.023.
- [170] T. Skurk and H. Hauner, "Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1," *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 28, no. 11, pp. 1357–1364, Nov. 2004, doi: 10.1038/SJ.IJO.0802778.
- [171] K. A. L. Darvall, R. C. Sam, S. H. Silverman, A. W. Bradbury, and D. J. Adam, "Obesity and thrombosis," *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 33, no. 2, pp. 223–233, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.EJVS.2006.10.006.
- [172] M. A. Allman-Farinelli, "Obesity and venous thrombosis: a review," *Semin Thromb Hemost*, vol. 37, no. 8, pp. 903–907, 2011, doi: 10.1055/S-0031-1297369.
- [173] K. Schäfer and S. Konstantinides, "Adipokines and thrombosis," *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 38, no. 12, pp. 864–871, Dec. 2011, doi: 10.1111/J.1440-1681.2011.05589.X.
- [174] A. El-Menyar, M. Asim, and H. Al-Thani, "Obesity Paradox in Patients With Deep Venous Thrombosis," *Clin Appl Thromb Hemost*, vol. 24, no. 6, pp. 986–992, Sep. 2018, doi: 10.1177/1076029617727858.
- [175] S. Carbone, J. M. Canada, H. E. Billingsley, M. S. Siddiqui, A. Elagizi, and C. J. Lavie, "Obesity paradox in cardiovascular disease: where do we stand?," *Vasc Health Risk Manag*, vol. 15, pp. 89–100, 2019, doi: 10.2147/VHRM.S168946.
- [176] A. Elagizi et al., "An Overview and Update on Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Diseases," *Prog Cardiovasc Dis*, vol. 61, no. 2, pp. 142–150, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.PCAD.2018.07.003.
- [177] M. K. Farmer-Boatwright and R. A. S. Roubey, "Venous thrombosis in the antiphospholipid syndrome," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, no. 3, pp. 321–325, Mar. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.182204.
- [178] M. Petri, "Thrombosis and systemic lupus erythematosus: the Hopkins Lupus Cohort perspective," *Scand J Rheumatol*, vol. 25, no. 4, pp. 191–193, 1996, doi: 10.3109/03009749609069986.
- [179] V. Pengo et al., "Incidence of a first thromboembolic event in asymptomatic carriers of high-risk antiphospholipid antibody profile: a multicenter prospective study," *Blood*, vol. 118, no. 17, pp. 4714–4718, Oct. 2011, doi: 10.1182/BLOOD-2011-03-340232.

- [180] M. Petri, "Epidemiology of the antiphospholipid antibody syndrome," *J Autoimmun*, vol. 15, no. 2, pp. 145–151, 2000, doi: 10.1006/JAUT.2000.0409.
- [181] L. Opatrny, M. David, S. R. Kahn, I. Shrier, and E. Rey, "Association between antiphospholipid antibodies and recurrent fetal loss in women without autoimmune disease: a metaanalysis.," *J Rheumatol*, vol. 33, no. 11, Nov. 2006.
- [182] M. Galli, D. Luciani, G. Bertolini, and T. Barbui, "Lupus anticoagulants are stronger risk factors for thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature," *Blood*, vol. 101, no. 5, pp. 1827–1832, Mar. 2003, doi: 10.1182/BLOOD-2002-02-0441.
- [183] C. Zoghalmi-Rintelen et al., "The presence of IgG antibodies against beta2-glycoprotein I predicts the risk of thrombosis in patients with the lupus anticoagulant," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 6, pp. 1160–1165, 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01394.X.
- [184] I. A. Naess, S. C. Christiansen, S. C. Cannegieter, F. R. Rosendaal, and J. Hammerstroem, "A prospective study of anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thrombosis in a general population (the HUNT study)," *J Thromb Haemost*, vol. 4, no. 1, pp. 44–49, Jan. 2006, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01691.X.
- [185] S. S. Runchey, A. R. Folsom, M. Y. Tsai, M. Cushman, and P. D. McGovern, "Anticardiolipin antibodies as a risk factor for venous thromboembolism in a population-based prospective study," *Br J Haematol*, vol. 119, no. 4, pp. 1005–1010, 2002, doi: 10.1046/J.1365-2141.2002.03949.X.
- [186] E. M. Bevers, M. Galli, T. Barbui, P. Comfurius, and R. F. Zwaal, "Lupus anticoagulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but to a complex of lipid-bound human prothrombin.," *Thromb Haemost*, vol. 66, no. 6, Dec. 1991.
- [187] J. Arvieux, L. Darnige, C. Caron, G. Reber, J. C. Bensa, and M. G. Colomb, "Development of an ELISA for autoantibodies to prothrombin showing their prevalence in patients with lupus anticoagulants.," *Thromb Haemost*, vol. 74, no. 4, Oct. 1995.
- [188] H. P. McNeil, R. J. Simpson, C. N. Chesterman, and S. A. Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 11, pp. 4120–4124, 1990, doi: 10.1073/PNAS.87.11.4120.
- [189] M. Galli et al., "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor," *Lancet*, vol. 335, no. 8705, pp. 1544–1547, Jun. 1990, doi: 10.1016/0140-6736(90)91374-J.
- [190] J. D. Oosting, R. H. Derksen, I. W. Bobbink, T. M. Hackeng, B. N. Bouma, and P. G. de Groot, "Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism?," *Blood*, vol. 81, no. 10, May 1993.
- [191] T. Sugi and J. A. McIntyre, "Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex.," *Blood*, vol. 86, no. 8, Oct. 1995.

- [192] M. Cugno et al., "Antibodies to tissue-type plasminogen activator in plasma from patients with primary antiphospholipid syndrome," *Br J Haematol*, vol. 108, no. 4, pp. 871–875, 2000, doi: 10.1046/J.1365-2141.2000.01948.X.
- [193] D. W. Jones, M. J. Gallimore, S. L. Harris, and M. Winter, "Antibodies to factor XII associated with lupus anticoagulant.," *Thromb Haemost*, vol. 81, no. 3, Mar. 1999.
- [194] C. J. Bidot et al., "Factor VII/VIIIa: a new antigen in the anti-phospholipid antibody syndrome," *Br J Haematol*, vol. 120, no. 4, pp. 618–626, Feb. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2141.2003.04161.X.
- [195] Y.-H. Yang et al., "Antibodies Against the Activated Coagulation Factor X (FXa) in the Antiphospholipid Syndrome that Interfere With the FXa Inactivation by Antithrombin," *J Immunol*, vol. 177, no. 11, p. 8219, Dec. 2006, doi: 10.4049/JIMMUNOL.177.11.8219.
- [196] W. Jy et al., "Platelet activation rather than endothelial injury identifies risk of thrombosis in subjects positive for antiphospholipid antibodies," *Thromb Res*, vol. 121, no. 3, pp. 319–325, 2007, doi: 10.1016/J.THROMRES.2007.04.014.
- [197] S. S. Pierangeli, M. Colden-Stanfield, X. Liu, J. H. Barker, G. L. Anderson, and E. N. Harris, "Antiphospholipid antibodies from antiphospholipid syndrome patients activate endothelial cells in vitro and in vivo," *Circulation*, vol. 99, no. 15, pp. 1997–2002, Apr. 1999, doi: 10.1161/01.CIR.99.15.1997.
- [198] J. Gregson et al., "Cardiovascular Risk Factors Associated With Venous Thromboembolism," *JAMA Cardiol*, vol. 4, no. 2, pp. 163–173, Feb. 2019, doi: 10.1001/JAMACARDIO.2018.4537.
- [199] K. Wattanakit et al., "Association between cardiovascular disease risk factors and occurrence of venous thromboembolism. A time-dependent analysis," *Thromb Haemost*, vol. 108, no. 3, pp. 508–515, Sep. 2012, doi: 10.1160/TH11-10-0726.
- [200] G. Zhang, X. Xu, W. Su, and Q. Xu, "Smoking and risk of venous thromboembolism: a systematic review.," *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, vol. 45, no. 3, May 2014.
- [201] Y. J. Cheng et al., "Current and former smoking and risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis," *PLoS Med*, vol. 10, no. 9, Sep. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.1001515.
- [202] M. T. Severinsen, S. R. Kristensen, S. P. Johnsen, C. Dethlefsen, A. Tjønneland, and K. Overvad, "Smoking and venous thromboembolism: a Danish follow-up study," *J Thromb Haemost*, vol. 7, no. 8, pp. 1297–1303, 2009, doi: 10.1111/J.1538-7836.2009.03490.X.
- [203] V. F. Tapson, "The role of smoking in coagulation and thromboembolism in chronic obstructive pulmonary disease," *Proc Am Thorac Soc*, vol. 2, no. 1, pp. 71–77, 2005, doi: 10.1513/PATS.200407-038MS.
- [204] B. Al-Nasser, "Influence of Tobacco Smoking on Perioperative Risk of Venous Thromboembolism," *Turk J Anaesthesiol Reanim*, vol. 48, no. 1, pp. 11–16, Feb. 2020, doi: 10.5152/TJAR.2019.08683.

- [205] G. Delgado, R. Siekmeier, T. B. Grammer, B. O. Boehm, W. März, and M. E. Kleber, "Alterations in the Coagulation System of Active Smokers from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) Study," 2014. doi: 10.1007/5584\_2014\_5.
- [206] B. K. Mahmoodi et al., "Association of Traditional Cardiovascular Risk Factors With Venous Thromboembolism: An Individual Participant Data Meta-Analysis of Prospective Studies," *Circulation*, vol. 135, no. 1, pp. 7–16, Jan. 2017, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024507.
- [207] K. F. Enga, S. K. Brækkan, I. J. Hansen-Krone, S. le Cessie, F. R. Rosendaal, and J. B. Hansen, "Cigarette smoking and the risk of venous thromboembolism: the Tromsø Study," *J Thromb Haemost*, vol. 10, no. 10, pp. 2068–2074, Oct. 2012, doi: 10.1111/J.1538-7836.2012.04880.X.
- [208] Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. In: *Clinique Medical de l'Hotel Dieu de Paris*. London: The New Sydenham Society; 1865:94–96
- [209] J. A. Heit et al., "Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study," *Arch Intern Med*, vol. 162, no. 11, pp. 1245–1248, Jun. 2002, doi: 10.1001/ARCHINTE.162.11.1245.
- [210] S. Noboa et al., "Estimation of a potentially preventable fraction of venous thromboembolism: a community-based prospective study," *J Thromb Haemost*, vol. 4, no. 12, pp. 2720–2722, Dec. 2006, doi: 10.1111/J.1538-7836.2006.02196.X.
- [211] H. K. Chew, T. Wun, D. Harvey, H. Zhou, and R. H. White, "Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers," *Arch Intern Med*, vol. 166, no. 4, pp. 458–464, Feb. 2006, doi: 10.1001/ARCHINTE.166.4.458.
- [212] J. W. Blom, J. P. M. Vanderschoot, M. J. Oostindiër, S. Osanto, F. J. M. van der Meer, and F. R. Rosendaal, "Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study," *J Thromb Haemost*, vol. 4, no. 3, pp. 529–535, Mar. 2006, doi: 10.1111/J.1538-7836.2006.01804.X.
- [213] M. N. Levine, "Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy.," *Thromb Haemost*, vol. 78, no. 1, Jul. 1997.
- [214] L. T. Goodnough, H. Saito, A. Manni, P. K. Jones, and O. H. Pearson, "Increased incidence of thromboembolism in stage IV breast cancer patients treated with a five-drug chemotherapy regimen," *Cancer*, vol. 54, no. 7, Oct. 1984, doi: 10.1002/1097-0142(19841001)54:7<1264::AID-CNCR2820540706>3.0.CO;2-R.
- [215] H. M. M. B. Otten et al., "Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon," *Arch Intern Med*, vol. 164, no. 2, pp. 190–194, Jan. 2004, doi: 10.1001/ARCHINTE.164.2.190.
- [216] K. I. Pritchard, A. H. Paterson, N. A. Paul, B. Zee, S. Fine, and J. Pater, "Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group," *J Clin Oncol*, vol. 14, no. 10, pp. 2731–2737, 1996, doi: 10.1200/JCO.1996.14.10.2731.

- [217] S. R. Deitcher and M. P. V. Gomes, “The risk of venous thromboembolic disease associated with adjuvant hormone therapy for breast carcinoma: a systematic review,” *Cancer*, vol. 101, no. 3, pp. 439–449, Aug. 2004, doi: 10.1002/CNCR.20347.
- [218] S. Z. Goldhaber, “Tamoxifen: preventing breast cancer and placing the risk of deep vein thrombosis in perspective,” *Circulation*, vol. 111, no. 5, pp. 539–541, Feb. 2005, doi: 10.1161/01.CIR.0000156099.83394.A7.
- [219] H. T. Sørensen et al., “Superficial and deep venous thrombosis, pulmonary embolism and subsequent risk of cancer,” *Eur J Cancer*, vol. 48, no. 4, pp. 586–593, Mar. 2012, doi: 10.1016/J.EJCA.2011.10.032.
- [220] P. Prandoni, A. Falanga, and A. Piccioli, “Cancer and venous thromboembolism,” *Lancet Oncol*, vol. 6, no. 6, pp. 401–410, Jun. 2005, doi: 10.1016/S1470-2045(05)70207-2.
- [221] H. M. M. B. Otten and M. H. Prins, “Venous thromboembolism and occult malignancy,” *Thromb Res*, vol. 102, no. 6, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0049-3848(01)00235-3.
- [222] N. B. A. Razak, G. Jones, M. Bhandari, M. C. Berndt, and P. Metharom, “Cancer-Associated Thrombosis: An Overview of Mechanisms, Risk Factors, and Treatment,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.3390/CANCERS10100380.
- [223] F. Langer and C. Bokemeyer, “Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor,” *Hamostaseologie*, vol. 32, no. 2, pp. 95–104, 2012, doi: 10.5482/HA-1160.
- [224] J. E. Geddings et al., “Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice,” *J Thromb Haemost*, vol. 14, no. 1, pp. 153–166, Jan. 2016, doi: 10.1111/JTH.13181.
- [225] C. J. Cui, G. J. Wang, S. Yang, S. K. Huang, R. Qiao, and W. Cui, “Tissue Factor-bearing MPs and the risk of venous thrombosis in cancer patients: A meta-analysis,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-19889-8.
- [226] C. Gardiner et al., “Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis – discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day,” *J Extracell Vesicles*, vol. 4, no. 2015, pp. 1–14, 2015, doi: 10.3402/JEV.V4.26901.
- [227] K. Suzuki-Inoue et al., “Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells,” *J Biol Chem*, vol. 282, no. 36, pp. 25993–26001, Sep. 2007, doi: 10.1074/JBC.M702327200.
- [228] J. Riedl et al., “Podoplanin expression in primary brain tumors induces platelet aggregation and increases risk of venous thromboembolism,” *Blood*, vol. 129, no. 13, pp. 1831–1839, Mar. 2017, doi: 10.1182/BLOOD-2016-06-720714.
- [229] M. Lupu-Meiri et al., “Knock-down of plasminogen-activator inhibitor-1 enhances expression of E-cadherin and promotes epithelial differentiation of human pancreatic adenocarcinoma cells,” *J Cell Physiol*, vol. 227, no. 11, pp. 3621–3628, Nov. 2012, doi: 10.1002/JCP.24068.

- [230] N. Chen et al., "Bevacizumab promotes venous thromboembolism through the induction of PAI-1 in a mouse xenograft model of human lung carcinoma," *Mol Cancer*, vol. 14, no. 1, Jul. 2015, doi: 10.1186/S12943-015-0418-X.
- [231] M. Z. Wojtukiewicz et al., "Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation," *Thromb Res*, vol. 97, no. 5, pp. 335–342, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0049-3848(99)00169-3.
- [232] G. Grignani and G. A. Jamieson, "Platelets in tumor metastasis: generation of adenosine diphosphate by tumor cells is specific but unrelated to metastatic potential.," *Blood*, vol. 71, no. 4, Apr. 1988.
- [233] A. Falanga, M. Panova-Noeva, and L. Russo, "Procoagulant mechanisms in tumour cells," *Best Pract Res Clin Haematol*, vol. 22, no. 1, pp. 49–60, Mar. 2009, doi: 10.1016/J.BEHA.2008.12.009.
- [234] R. Giavazzi, M. Foppolo, R. Dossi, and A. Remuzzi, "Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions," *J Clin Invest*, vol. 92, no. 6, pp. 3038–3044, 1993, doi: 10.1172/JCI116928.
- [235] N. A. Razak, O. Elaskalani, and P. Metharom, "Pancreatic Cancer-Induced Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Contributor to Cancer-Associated Thrombosis," *Int J Mol Sci*, vol. 18, no. 3, Mar. 2017, doi: 10.3390/IJMS18030487.
- [236] A. Brill et al., "Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice," *J Thromb Haemost*, vol. 10, no. 1, pp. 136–144, Jan. 2012, doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04544.X.
- [237] A. S. Kimball, A. T. Obi, J. A. Diaz, and P. K. Henke, "The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis," *Front Immunol*, vol. 7, no. JUN, Jun. 2016, doi: 10.3389/FIMMU.2016.00236.
- [238] J. Oto et al., "MicroRNAs and Neutrophil Activation Markers Predict Venous Thrombosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Distal Extrahepatic Cholangiocarcinoma," *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 3, 2020, doi: 10.3390/IJMS21030840.
- [239] B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, and A. K. Azab, "The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy," *Hypoxia (Auckl)*, vol. 3, p. 83, Dec. 2015, doi: 10.2147/HP.S93413.
- [240] S. Molnar, H. Guglielmone, M. Lavarda, M. L. Rizzi, and G. Jarchum, "Procoagulant factors in patients with cancer," *Hematology*, vol. 12, no. 6, pp. 555–559, Dec. 2007, doi: 10.1080/10245330701521416.
- [241] A. Falanga and S. G. Gordon, "Isolation and characterization of cancer procoagulant: a cysteine proteinase from malignant tissue," *Biochemistry*, vol. 24, no. 20, Sep. 1985, doi: 10.1021/bi00341a041.
- [242] A. Piccioli, A. Falanga, U. Baccaglini, M. Marchetti, and P. Prandoni, "Cancer and Venous Thromboembolism," *Semin Thromb Hemost*, vol. 32, no. 7, Oct. 2006, doi: 10.1055/s-2006-951297.

- [243] E. Bjøri, H. S. Johnsen, J. B. Hansen, and S. K. Brækkan, "Hospitalization as a trigger for venous thromboembolism - Results from a population-based case-crossover study," *Thromb Res*, vol. 176, pp. 115–119, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.THROMRES.2019.02.024.
- [244] J. A. Heit et al., "Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients vs community residents," *Mayo Clin Proc*, vol. 76, no. 11, pp. 1102–1110, 2001, doi: 10.4065/76.11.1102.
- [245] C. M. Anderson, T. J. Overend, J. Godwin, and A. Sunderji, "Ambulation after deep vein thrombosis: a systematic review," *Physiother Can*, vol. 61, no. 3, pp. 133–140, 2009, doi: 10.3138/PHYSIO.61.3.133.
- [246] S. v. Konstantinides et al., "2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism," *Eur Heart J*, vol. 35, no. 43, pp. 3033–3080, Jul. 2014, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHU283.
- [247] D. Jiménez et al., "Simplification of the pulmonary embolism severity index for prognostication in patients with acute symptomatic pulmonary embolism," *Arch Intern Med*, vol. 170, no. 15, pp. 1383–1389, Aug. 2010, doi: 10.1001/ARCHINTERNMED.2010.199.
- [248] F. Uresandi et al., "National Consensus on the Diagnosis, Risk Stratification and Treatment of Patients with Pulmonary Embolism," *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, vol. 49, no. 12, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.arbr.2013.10.008.
- [249] J. A. Heit, M. D. Silverstein, D. N. Mohr, T. M. Petterson, W. M. O'Fallon, and L. J. Melton, "Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study," *Arch Intern Med*, vol. 160, no. 6, pp. 809–815, Mar. 2000, doi: 10.1001/ARCHINTE.160.6.809.
- [250] S. Sweetland et al., "Duration and magnitude of the postoperative risk of venous thromboembolism in middle aged women: prospective cohort study," *BMJ*, vol. 339, no. 7736, p. 32, Dec. 2009, doi: 10.1136/BMJ.B4583.
- [251] J. Y. S. Kim et al., "Surgical duration and risk of venous thromboembolism," *JAMA Surg*, vol. 150, no. 2, pp. 110–117, Feb. 2015, doi: 10.1001/JAMASURG.2014.1841.
- [252] R. H. White, H. Zhou, and P. S. Romano, "Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures," *Thromb Haemost*, vol. 90, no. 3, pp. 446–455, Sep. 2003, doi: 10.1160/TH03-03-0152.
- [253] M. K. Barsoum, J. A. Heit, A. A. Ashrani, C. L. Leibson, T. M. Petterson, and K. R. Bailey, "Is progestin an independent risk factor for incident venous thromboembolism? A population-based case-control study," *Thromb Res*, vol. 126, no. 5, pp. 373–378, Nov. 2010, doi: 10.1016/J.THROMRES.2010.08.010.
- [254] T. Paffrath et al., "Venous thromboembolism after severe trauma: incidence, risk factors and outcome," *Injury*, vol. 41, no. 1, pp. 97–101, Jan. 2010, doi: 10.1016/J.INJURY.2009.06.010.
- [255] K. J. van Stralen, F. R. Rosendaal, and C. J. M. Doggen, "Minor injuries as a risk factor for venous thrombosis," *Arch Intern Med*, vol. 168, no. 1, pp. 21–26, Jan. 2008, doi: 10.1001/ARCHINTERNMED.2007.5.

- [256] W. H. Geerts, K. I. Code, R. M. Jay, E. Chen, and J. P. Szalai, "A prospective study of venous thromboembolism after major trauma," *N Engl J Med*, vol. 331, no. 24, pp. 1601–1606, Dec. 1994, doi: 10.1056/NEJM199412153312401.
- [257] N. M. GIBBS, "Venous thrombosis of the lower limbs with particular reference to bed-rest," *Br J Surg*, vol. 45, no. 191, pp. 209–236, 1957, doi: 10.1002/BJS.18004519102.
- [258] C. Warlow, D. Ogston, and A. S. Douglas, "Venous thrombosis following strokes," *Lancet*, vol. 1, no. 7764, pp. 1305–1306, Jun. 1972, doi: 10.1016/S0140-6736(72)91034-3.
- [259] J. H. Scurr, S. J. Machin, S. Bailey-King, I. J. Mackie, S. McDonald, and P. D. C. Smith, "Frequency and prevention of symptomless deep-vein thrombosis in long-haul flights: a randomised trial," *Lancet*, vol. 357, no. 9267, pp. 1485–1489, May 2001, doi: 10.1016/S0140-6736(00)04645-6.
- [260] S. C. Cannegieter, C. J. M. Doggen, H. C. van Houwelingen, and F. R. Rosendaal, "Travel-related venous thrombosis: results from a large population-based case control study (MEGA study)," *PLoS Med*, vol. 3, no. 8, pp. 1258–1265, 2006, doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.0030307.
- [261] Y. Kubota, M. Cushman, N. Zakai, W. D. Rosamond, and A. R. Folsom, "TV viewing and incident venous thromboembolism: the Atherosclerotic Risk in Communities Study," *J Thromb Thrombolysis*, vol. 45, no. 3, pp. 353–359, Apr. 2018, doi: 10.1007/S11239-018-1620-7.
- [262] C. J. van Rooden, M. E. T. Tesselaar, S. Osanto, F. R. Rosendaal, and M. v. Huisman, "Deep vein thrombosis associated with central venous catheters - a review," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 11, pp. 2409–2419, Nov. 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01398.X.
- [263] J. Merrer et al., "Complications of femoral and subclavian venous catheterization in critically ill patients: a randomized controlled trial," *JAMA*, vol. 286, no. 6, pp. 700–707, Aug. 2001, doi: 10.1001/JAMA.286.6.700.
- [264] M. Refaiei, B. Fernandes, J. Brandwein, M. D. Goodyear, A. Pokhrel, and C. Wu, "Incidence of catheter-related thrombosis in acute leukemia patients: a comparative, retrospective study of the safety of peripherally inserted vs. centrally inserted central venous catheters," *Ann Hematol*, vol. 95, no. 12, pp. 2057–2064, Dec. 2016, doi: 10.1007/S00277-016-2798-4.
- [265] J. A. Heit, C. E. Kobbervig, A. H. James, T. M. Petterson, K. R. Bailey, and L. J. Melton, "Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy or postpartum: a 30-year population-based study," *Ann Intern Med*, vol. 143, no. 10, Nov. 2005, doi: 10.7326/0003-4819-143-10-200511150-00006.
- [266] A. H. James, "Venous thromboembolism in pregnancy," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 29, no. 3, pp. 326–331, Mar. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.184127.
- [267] U. Högberg, "Maternal deaths in Sweden, 1971-1980," *Acta Obstet Gynecol Scand*, vol. 65, no. 2, pp. 161–167, 1986, doi: 10.3109/00016348609158373.
- [268] F. Cerneca, G. Ricci, R. Simeone, M. Malisano, S. Alberico, and S. Guaschino, "Coagulation and fibrinolysis changes in normal pregnancy. Increased levels of procoagulants and reduced levels of inhibitors during pregnancy induce a hypercoagulable state, combined with a reactive fibrinolysis," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 73, no. 1, pp. 31–36, 1997, doi: 10.1016/S0301-2115(97)02734-6.

- [269] Y. Stirling, L. Woolf, W. R. North, M. J. Seghatchian, and T. W. Meade, "Haemostasis in normal pregnancy.," *Thromb Haemost*, vol. 52, no. 2, Oct. 1984.
- [270] M. Hellgren, "Hemostasis during normal pregnancy and puerperium," *Semin Thromb Hemost*, vol. 29, no. 2, pp. 125–130, Apr. 2003, doi: 10.1055/S-2003-38897.
- [271] Ø. Lidegaard, B. Edström, and S. Kreiner, "Oral contraceptives and venous thromboembolism: a five-year national case-control study," *Contraception*, vol. 65, no. 3, pp. 187–196, 2002, doi: 10.1016/S0010-7824(01)00307-9.
- [272] Y. Vinogradova, C. Coupland, and J. Hippisley-Cox, "Use of combined oral contraceptives and risk of venous thromboembolism: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases," *BMJ*, vol. 350, p. h2135, 2015, doi: 10.1136/BMJ.H2135.
- [273] B. H. Stegeman et al., "Different combined oral contraceptives and the risk of venous thrombosis: systematic review and network meta-analysis," *BMJ*, vol. 347, no. 7925, Sep. 2013, doi: 10.1136/BMJ.F5298.
- [274] J. P. Vandenbroucke, T. Koster, F. R. Rosendaal, E. Briët, P. H. Reitsma, and R. M. Bertina, "Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation," *Lancet*, vol. 344, no. 8935, pp. 1453–1457, Nov. 1994, doi: 10.1016/S0140-6736(94)90286-0.
- [275] J. Rosing et al., "Low-dose oral contraceptives and acquired resistance to activated protein C: a randomised cross-over study," *Lancet*, vol. 354, no. 9195, pp. 2036–2040, Dec. 1999, doi: 10.1016/S0140-6736(99)06092-4.
- [276] F. Grodstein et al., "Prospective study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women," *Lancet*, vol. 348, no. 9033, pp. 983–987, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0140-6736(96)07308-4.
- [277] E. Daly, M. P. Vessey, M. M. Hawkins, J. L. Carson, P. Gough, and S. Marsh, "Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy," *Lancet*, vol. 348, no. 9033, pp. 977–980, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0140-6736(96)07113-9.
- [278] C. Varas-Lorenzo, L. A. Garcia-Rodriguez, C. Cattaruzzi, M. G. Troncon, L. Agostinis, and S. Perez-Gutthann, "Hormone Replacement Therapy and the Risk of Hospitalization for Venous Thromboembolism: A Population-based Study in Southern Europe," *Am J Epidemiol*, vol. 147, no. 4, Feb. 1998, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009461.
- [279] G. Lowe, M. Woodward, M. Vessey, A. Rumley, P. Gough, and E. Daly, "Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45-64 years. Relationships to hormone replacement therapy.," *Thromb Haemost*, vol. 83, no. 4, Apr. 2000.
- [280] D. Grady, W. Applegate, T. Bush, C. Furberg, B. Riggs, and S. B. Hulley, "Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS)," *Control Clin Trials*, vol. 19, no. 4, Aug. 1998, doi: 10.1016/S0197-2456(98)00010-5.
- [281] M. Canonico, G. Plu-Bureau, G. D. O. Lowe, and P. Y. Scarabin, "Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis," *BMJ*, vol. 336, no. 7655, pp. 1227–1231, May 2008, doi: 10.1136/BMJ.39555.441944.BE.

- [282] R. Lundgren et al., "Cardiovascular complications of estrogen therapy for nondisseminated prostatic carcinoma: A preliminary report from a randomized multicenter study," *Scand J Urol Nephrol*, vol. 20, no. 2, pp. 101–105, 1986, doi: 10.3109/00365598609040556.
- [283] H. N. Holmegard, B. G. Nordestgaard, P. Schnohr, A. Tybjærg-Hansen, and M. Benn, "Endogenous sex hormones and risk of venous thromboembolism in women and men," *J Thromb Haemost*, vol. 12, no. 3, pp. 297–305, Mar. 2014, doi: 10.1111/JTH.12484.
- [284] J. Hermanides et al., "Venous thrombosis is associated with hyperglycemia at diagnosis: a case-control study," *J Thromb Haemost*, vol. 7, no. 6, pp. 945–949, 2009, doi: 10.1111/J.1538-7836.2009.03442.X.
- [285] S. M. Dean and W. Abraham, "Venous thromboembolic disease in congestive heart failure," *Congest Heart Fail*, vol. 16, no. 4, pp. 164–169, Jul. 2010, doi: 10.1111/J.1751-7133.2010.00148.X.
- [286] M. M. Samama et al., "A comparison of enoxaparin with placebo for the prevention of venous thromboembolism in acutely ill medical patients. Prophylaxis in Medical Patients with Enoxaparin Study Group," *N Engl J Med*, vol. 341, no. 11, pp. 793–800, Sep. 1999, doi: 10.1056/NEJM199909093411103.
- [287] C. L. Fanola et al., "Incident Heart Failure and Long-Term Risk for Venous Thromboembolism," *J Am Coll Cardiol*, vol. 75, no. 2, pp. 148–158, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.JACC.2019.10.058.
- [288] A. Delluc, C. Tromeur, D. Mottier, and K. Lacut, "Lipid parameters and venous thromboembolism: clinical evidence, pathophysiology and therapeutic implications," *Clin Lipidol*, vol. 7, no. 4, Aug. 2012, doi: 10.2217/clp.12.41.
- [289] M. J. Grainge, J. West, and T. R. Card, "Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study," *Lancet*, vol. 375, no. 9715, pp. 657–663, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(09)61963-2.
- [290] B. Zöller, X. Li, J. Sundquist, and K. Sundquist, "Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden," *Lancet*, vol. 379, no. 9812, pp. 244–249, 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)61306-8.
- [291] M. E. Holmqvist et al., "Risk of venous thromboembolism in patients with rheumatoid arthritis and association with disease duration and hospitalization," *JAMA*, vol. 308, no. 13, pp. 1350–1356, Oct. 2012, doi: 10.1001/2012.JAMA.11741.
- [292] L. Smeeth, C. Cook, S. Thomas, A. J. Hall, R. Hubbard, and P. Vallance, "Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting," *Lancet*, vol. 367, no. 9516, pp. 1075–1079, Apr. 2006, doi: 10.1016/S0140-6736(06)68474-2.
- [293] M. T. Severinsen et al., "Genetic susceptibility, smoking, obesity and risk of venous thromboembolism," *Br J Haematol*, vol. 149, no. 2, pp. 273–279, Apr. 2010, doi: 10.1111/J.1365-2141.2010.08086.X.
- [294] O. Wu et al., "Oral contraceptives, hormone replacement therapy, thrombophilias and risk of venous thromboembolism: a systematic review. The Thrombosis: Risk and Economic

Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study,” *Thromb Haemost*, vol. 94, no. 1, pp. 17–25, Jul. 2005, doi: 10.1160/TH04-11-0759.

[295] E. R. Pomp, S. le Cessie, F. R. Rosendaal, and C. J. M. Doggen, “Risk of venous thrombosis: obesity and its joint effect with oral contraceptive use and prothrombotic mutations,” *Br J Haematol*, vol. 139, no. 2, pp. 289–296, Oct. 2007, doi: 10.1111/J.1365-2141.2007.06780.X.

[296] I. Martinelli, V. de Stefano, E. Taioli, K. Paciaroni, E. Rossi, and P. M. Mannucci, “Inherited thrombophilia and first venous thromboembolism during pregnancy and puerperium,” *Thromb Haemost*, vol. 87, no. 5, May 2002.

[297] J. W. Blom, C. J. M. Doggen, S. Osanto, and F. R. Rosendaal, “Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis,” *JAMA*, vol. 293, no. 6, pp. 715–722, Feb. 2005, doi: 10.1001/JAMA.293.6.715.

[298] E. J. Libourel et al., “Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism,” *Haematologica*, vol. 87, no. 10, Oct. 2002.

[299] P. S. Wells, R. I. Haddadene, A. Reilly, and M. A. Forgie, “Diagnosis of Venous Thromboembolism: 20 Years of Progress,” *Ann Intern Med*, vol. 168, no. 2, pp. 131–140, Jan. 2018, doi: 10.7326/M17-0291.

[300] G. le Gal et al., “Prediction of pulmonary embolism in the emergency department: the revised Geneva score,” *Ann Intern Med*, vol. 144, no. 3, pp. 165–171, Feb. 2006, doi: 10.7326/0003-4819-144-3-200602070-00004.

[301] M. Miniati, M. Bottai, S. Monti, M. Salvadori, L. Serasini, and M. Passera, “Simple and accurate prediction of the clinical probability of pulmonary embolism,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 178, no. 3, pp. 290–294, Aug. 2008, doi: 10.1164/RCCM.200802-207OC.

[302] J. Constans et al., “A clinical prediction score for upper extremity deep venous thrombosis,” *Thromb Haemost*, vol. 99, no. 1, pp. 202–207, Jan. 2008, doi: 10.1160/TH07-08-0485.

[303] W. Lim et al., “American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: diagnosis of venous thromboembolism,” *Blood Adv*, vol. 2, no. 22, pp. 3226–3256, Nov. 2018, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2018024828.

[304] T. L. Ortel et al., “American Society of Hematology 2020 guidelines for management of venous thromboembolism: treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism,” *Blood Adv*, vol. 4, no. 19, pp. 4693–4738, Oct. 2020, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2020001830.

[305] C. H. Ho, “Can very high level of D-dimer exclusively predict the presence of thromboembolic diseases?,” *J Chin Med Assoc*, vol. 74, no. 4, pp. 151–154, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.JCMA.2011.01.034.

[306] K. Hager and D. Platt, “Fibrin degradation product concentrations (D-dimers) in the course of ageing,” *Gerontology*, vol. 41, no. 3, pp. 159–165, 1995, doi: 10.1159/000213677.

- [307] P. S. Wells et al., "Evaluation of D-dimer in the diagnosis of suspected deep-vein thrombosis," *N Engl J Med*, vol. 349, no. 13, pp. 1227–1235, Sep. 2003, doi: 10.1056/NEJMOA023153.
- [308] R. A. Bucek, N. Koca, M. Reiter, M. Haumer, T. Zontsich, and E. Minar, "Algorithms for the diagnosis of deep-vein thrombosis in patients with low clinical pretest probability," *Thromb Res*, vol. 105, no. 1, pp. 43–47, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0049-3848(01)00411-X.
- [309] R. B. Ahuja, P. Bansal, G. S. Pradhan, and M. Subberwal, "An analysis of deep vein thrombosis in burn patients (Part 1): Comparison of D-dimer and Doppler ultrasound as screening tools," *Burns*, vol. 42, no. 8, pp. 1686–1692, Dec. 2016, doi: 10.1016/J.BURNS.2016.08.005.
- [310] T. J. An, S. M. Engstrom, W. K. Oelsner, M. A. Benvenuti, G. G. Polkowski, and J. G. Schoenecker, "Elevated d-Dimer Is Not Predictive of Symptomatic Deep Venous Thrombosis After Total Joint Arthroplasty," *J Arthroplasty*, vol. 31, no. 10, pp. 2269–2272, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.ARTH.2016.02.059.
- [311] K. K. Hedengran, M. R. Andersen, S. Stender, and P. B. Szecsi, "Large D-Dimer Fluctuation in Normal Pregnancy: A Longitudinal Cohort Study of 4,117 Samples from 714 Healthy Danish Women," *Obstet Gynecol Int*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/3561675.
- [312] A. van Hylckama Vlieg, C. A. Baglin, R. Luddington, S. Macdonald, F. R. Rosendaal, and T. P. Baglin, "The risk of a first and a recurrent venous thrombosis associated with an elevated D-dimer level and an elevated thrombin potential: results of the THE-VTE study," *J Thromb Haemost*, vol. 13, no. 9, pp. 1642–1652, Sep. 2015, doi: 10.1111/JTH.13043.
- [313] B. Cosmi, C. Legnani, M. Cini, G. Guazzaloca, and G. Palareti, "D-dimer levels in combination with residual venous obstruction and the risk of recurrence after anticoagulation withdrawal for a first idiopathic deep vein thrombosis," *Thromb Haemost*, vol. 94, no. 5, pp. 969–974, Nov. 2005, doi: 10.1160/TH05-02-0095.
- [314] G. Palareti et al., "D-dimer testing to determine the duration of anticoagulation therapy," *N Engl J Med*, vol. 355, no. 17, pp. 1780–1789, Oct. 2006, doi: 10.1056/NEJMOA054444.
- [315] B. Cosmi et al., "Usefulness of repeated D-dimer testing after stopping anticoagulation for a first episode of unprovoked venous thromboembolism: the PROLONG II prospective study," *Blood*, vol. 115, no. 3, pp. 481–488, Jan. 2010, doi: 10.1182/BLOOD-2009-08-237354.
- [316] M. A. Rodger et al., "Validating the HERDOO2 rule to guide treatment duration for women with unprovoked venous thrombosis: multinational prospective cohort management study," *BMJ*, vol. 356, 2017, doi: 10.1136/BMJ.J1065.
- [317] A. Tosetto et al., "Predicting disease recurrence in patients with previous unprovoked venous thromboembolism: a proposed prediction score (DASH)," *J Thromb Haemost*, vol. 10, no. 6, pp. 1019–1025, Jun. 2012, doi: 10.1111/J.1538-7836.2012.04735.X.
- [318] S. Eichinger, G. Heinze, L. M. Jandek, and P. A. Kyrle, "Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model," *Circulation*, vol. 121, no. 14, pp. 1630–1636, Apr. 2010, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.925214.

- [319] L. A. Linkins and S. Takach Lapner, "Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly," *Int J Lab Hematol*, vol. 39 Suppl 1, pp. 98–103, May 2017, doi: 10.1111/IJLH.12665.
- [320] J. Polgar, J. Matuskova, and D. D. Wagner, "The P-selectin, tissue factor, coagulation triad," *J Thromb Haemost*, vol. 3, no. 8, pp. 1590–1596, 2005, doi: 10.1111/J.1538-7836.2005.01373.X.
- [321] K. Ley, "The role of selectins in inflammation and disease," *Trends Mol Med*, vol. 9, no. 6, pp. 263–268, Jun. 2003, doi: 10.1016/S1471-4914(03)00071-6.
- [322] R. McEver, "Adhesive Interactions of Leukocytes, Platelets, and the Vessel Wall during Hemostasis and Inflammation," *Thromb Haemost*, vol. 86, no. 09, Dec. 2001, doi: 10.1055/s-0037-1616128.
- [323] T. Palabrica et al., "Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets," *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 848–851, 1992, doi: 10.1038/359848A0.
- [324] T. W. Wakefield et al., "P-Selectin and TNF Inhibition Reduce Venous Thrombosis Inflammation," *Journal of Surgical Research*, vol. 64, no. 1, Jul. 1996, doi: 10.1006/jsre.1996.0301.
- [325] P. André, D. Hartwell, I. Hrachovinová, S. Saffaripour, and D. D. Wagner, "Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 25, pp. 13835–13840, Dec. 2000, doi: 10.1073/PNAS.250475997.
- [326] I. Hrachovinová et al., "Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A," *Nat Med*, vol. 9, no. 8, Aug. 2003, doi: 10.1038/nm899.
- [327] L. C. Dunlop et al., "Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein," *J Exp Med*, vol. 175, no. 4, pp. 1147–1150, Apr. 1992, doi: 10.1084/JEM.175.4.1147.
- [328] J. E. Rectenwald et al., "D-dimer, P-selectin, and microparticles: novel markers to predict deep venous thrombosis. A pilot study," *Thromb Haemost*, vol. 94, no. 6, pp. 1312–1317, Dec. 2005, doi: 10.1160/TH05-06-0426.
- [329] C. N. Antonopoulos, G. S. Sfyroeras, J. D. Kakisis, K. G. Moulakakis, and C. D. Liapis, "The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism," *Thromb Res*, vol. 133, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.THROMRES.2013.08.014.
- [330] A. D. Blann, W. M. P. Noteboom, and F. R. Rosendaal, "Increased soluble P-selectin levels following deep venous thrombosis: cause or effect?," *Br J Haematol*, vol. 108, no. 1, pp. 191–193, 2000, doi: 10.1046/J.1365-2141.2000.01813.X.
- [331] E. Papalambros, F. Sigala, A. Travlou, E. Bastounis, and P. Mirilas, "P-selectin and antibodies against heparin-platelet factor 4 in patients with venous or arterial diseases after a 7-day heparin treatment," *J Am Coll Surg*, vol. 199, no. 1, pp. 69–77, Jul. 2004, doi: 10.1016/J.JAMCOLLSURG.2004.02.027.
- [332] T. Chung et al., "Platelet activation in acute pulmonary embolism," *J Thromb Haemost*, vol. 5, no. 5, pp. 918–924, May 2007, doi: 10.1111/J.1538-7836.2007.02461.X.

- [333] E. Ramacciotti et al., "Evaluation of soluble P-selectin as a marker for the diagnosis of deep venous thrombosis," *Clin Appl Thromb Hemost*, vol. 17, no. 4, pp. 425–431, Aug. 2011, doi: 10.1177/1076029611405032.
- [334] F. C. Vandy et al., "Soluble P-selectin for the diagnosis of lower extremity deep venous thrombosis," *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, vol. 1, no. 2, pp. 117–125, 2013, doi: 10.1016/J.JVSV.2012.09.001.
- [335] P. A. Kyrle, G. Hron, S. Eichinger, and O. Wagner, "Circulating P-selectin and the risk of recurrent venous thromboembolism," *Thromb Haemost*, vol. 97, no. 6, Jun. 2007.
- [336] R. Lacroix, C. Dubois, A. S. Leroyer, F. Sabatier, and F. Dignat-George, "Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 11, Jun. 2013, doi: 10.1111/jth.12268.
- [337] S. F. Mause and C. Weber, "Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange," *Circ Res*, vol. 107, no. 9, pp. 1047–1057, Oct. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.226456.
- [338] B. Furie and B. C. Furie, "Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation," *Trends Mol Med*, vol. 10, no. 4, pp. 171–178, Apr. 2004, doi: 10.1016/J.MOLMED.2004.02.008.
- [339] J. A. Chirinos et al., "Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism," *J Am Coll Cardiol*, vol. 45, no. 9, pp. 1467–1471, May 2005, doi: 10.1016/J.JACC.2004.12.075.
- [340] P. Bucciarelli et al., "Circulating microparticles and risk of venous thromboembolism," *Thromb Res*, vol. 129, no. 5, pp. 591–597, May 2012, doi: 10.1016/J.THROMRES.2011.08.020.
- [341] C. Ay, J. M. Freyssinet, T. Sailer, R. Vormittag, and I. Pabinger, "Circulating procoagulant microparticles in patients with venous thromboembolism," *Thromb Res*, vol. 123, no. 5, pp. 724–726, 2009, doi: 10.1016/J.THROMRES.2008.09.005.
- [342] R. D. Lee et al., "Pre-analytical and analytical variables affecting the measurement of plasma-derived microparticle tissue factor activity," *Thromb Res*, vol. 129, no. 1, pp. 80–85, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.THROMRES.2011.06.004.
- [343] Y. Yuana, R. M. Bertina, and S. Osanto, "Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles," *Thromb Haemost*, vol. 105, no. 3, pp. 396–408, Mar. 2011, doi: 10.1160/TH10-09-0595.
- [344] R. Lacroix et al., "Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop," *J Thromb Haemost*, vol. 11, no. 6, pp. 1190–1193, Jun. 2013, doi: 10.1111/JTH.12207.
- [345] S. Cointe et al., "Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop," *J Thromb Haemost*, vol. 15, no. 1, pp. 187–193, Jan. 2017, doi: 10.1111/JTH.13514.
- [346] G. Grimnes, T. Isaksen, Y. I. G. V. Tichelaar, J. Brox, S. K. Brækkan, and J. B. Hansen, "C-reactive protein and risk of venous thromboembolism: results from a population-based case-

- crossover study,” *Haematologica*, vol. 103, no. 7, pp. 1245–1250, Jul. 2018, doi: 10.3324/HAEMATOL.2017.186957.
- [347] A. R. Folsom, P. L. Lutsey, B. C. Astor, and M. Cushman, “C-reactive protein and venous thromboembolism,” *Thromb Haemost*, vol. 102, no. 10, Nov. 2009, doi: 10.1160/TH09-04-0274.
- [348] J. Zacho, A. Tybjaerg-Hansen, and B. G. Nordestgaard, “C-reactive protein and risk of venous thromboembolism in the general population,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 30, no. 8, pp. 1672–1678, Aug. 2010, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.198473.
- [349] L. Jara-Palomares et al., “D-dimer and high-sensitivity C-reactive protein levels to predict venous thromboembolism recurrence after discontinuation of anticoagulation for cancer-associated thrombosis,” *Br J Cancer*, vol. 119, no. 8, pp. 915–921, Oct. 2018, doi: 10.1038/S41416-018-0269-5.
- [350] P. H. Reitsma and F. R. Rosendaal, “Activation of innate immunity in patients with venous thrombosis: the Leiden Thrombophilia Study,” *J Thromb Haemost*, vol. 2, no. 4, pp. 619–622, Apr. 2004, doi: 10.1111/J.1538-7836.2004.00689.X.
- [351] P. Poredos and M. K. Jezovnik, “In patients with idiopathic venous thrombosis, interleukin-10 is decreased and related to endothelial dysfunction,” *Heart Vessels*, vol. 26, no. 6, pp. 596–602, Nov. 2011, doi: 10.1007/S00380-010-0111-3.
- [352] L. J. Downing et al., “IL-10 regulates thrombus-induced vein wall inflammation and thrombosis,” *J Immunol*, vol. 161, no. 3, Aug. 1998.
- [353] H. C. Hemker, S. Wielders, H. Kessels, and S. Béguin, “Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential,” *Thromb Haemost*, vol. 70, no. 4, Oct. 1993.
- [354] H. C. Hemker, P. L. Giesen, M. Ramjee, R. Wagenvoord, and S. Béguin, “The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma,” *Thromb Haemost*, vol. 83, no. 4, Apr. 2000.
- [355] P. L. Lutsey, A. R. Folsom, S. R. Heckbert, and M. Cushman, “Peak Thrombin Generation and Subsequent Venous Thromboembolism: The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE),” *J Thromb Haemost*, vol. 7, no. 10, p. 1639, Oct. 2009, doi: 10.1111/J.1538-7836.2009.03561.X.
- [356] O. Segers, R. van Oerle, H. ten Cate, J. Rosing, and E. Castoldi, “Thrombin generation as an intermediate phenotype for venous thrombosis,” *Thromb Haemost*, vol. 103, no. 01, Nov. 2010, doi: 10.1160/TH09-06-0356.
- [357] G. Hron, M. Kollars, B. R. Binder, S. Eichinger, and P. A. Kyrle, “Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation,” *JAMA*, vol. 296, no. 4, pp. 397–402, Jul. 2006, doi: 10.1001/JAMA.296.4.397.
- [358] A. Tripodi, C. Legnani, V. Chantarangkul, B. Cosmi, G. Palareti, and P. M. Mannucci, “High thrombin generation measured in the presence of thrombomodulin is associated with an increased risk of recurrent venous thromboembolism,” *J Thromb Haemost*, vol. 6, no. 8, pp. 1327–1333, Aug. 2008, doi: 10.1111/J.1538-7836.2008.03018.X.

- [359] S. Bloemen, S. Zwaveling, H. ten Cate, A. ten Cate-Hoek, and B. de Laat, "Prediction of bleeding risk in patients taking vitamin K antagonists using thrombin generation testing," *PLoS One*, vol. 12, no. 5, May 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0176967.
- [360] C. P. D. M. de Breet et al., "Thrombin Generation as a Method to Identify the Risk of Bleeding in High Clinical-Risk Patients Using Dual Antiplatelet Therapy," *Front Cardiovasc Med*, vol. 8, Jun. 2021, doi: 10.3389/FCVM.2021.679934.
- [361] J. J. van Veen, A. Gatt, and M. Makris, "Thrombin generation testing in routine clinical practice: are we there yet?," *Br J Haematol*, vol. 142, no. 6, pp. 889–903, Sep. 2008, doi: 10.1111/J.1365-2141.2008.07267.X.
- [362] A. B. Payne, C. H. Miller, W. C. Hooper, C. Lally, and H. D. Austin, "High factor VIII, von Willebrand factor, and fibrinogen levels and risk of venous thromboembolism in blacks and whites.," *Ethn Dis*, vol. 24, no. 2, 2014.
- [363] R. A. Kraaijenhagen et al., "High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism.," *Thromb Haemost*, vol. 83, no. 1, Jan. 2000.
- [364] P. A. Kyrle et al., "High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism," *N Engl J Med*, vol. 343, no. 7, pp. 457–462, Aug. 2000, doi: 10.1056/NEJM200008173430702.
- [365] J. F. Timp et al., "Predictive value of factor VIII levels for recurrent venous thrombosis: results from the MEGA follow-up study," *J Thromb Haemost*, vol. 13, no. 10, pp. 1823–1832, Oct. 2015, doi: 10.1111/JTH.13113.
- [366] J. O'Donnell, A. D. Mumford, R. A. Manning, and M. Laffan, "Elevation of FVIII: C in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response.," *Thromb Haemost*, vol. 83, no. 1, Jan. 2000.
- [367] V. Tichelaar, A. Mulder, H. Kluin-Nelemans, and K. Meijer, "The acute phase reaction explains only a part of initially elevated factor VIII:C levels: a prospective cohort study in patients with venous thrombosis," *Thromb Res*, vol. 129, no. 2, pp. 183–186, Feb. 2012, doi: 10.1016/J.THROMRES.2011.09.024.
- [368] J. C. Souto et al., "Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families," *Circulation*, vol. 101, no. 13, pp. 1546–1551, Apr. 2000, doi: 10.1161/01.CIR.101.13.1546.
- [369] M. Abdollahi, M. Cushman, and F. R. Rosendaal, "Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use.," *Thromb Haemost*, vol. 89, no. 3, Mar. 2003.
- [370] M. G. Conlan et al., "Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.," *Thromb Haemost*, vol. 70, no. 3, Sep. 1993.
- [371] J. J. A. Auwerda, P. Sonneveld, M. P. M. de Maat, and F. W. G. Leebeek, "Prothrombotic coagulation abnormalities in patients with newly diagnosed multiple myeloma," *Haematologica*, vol. 92, no. 2, pp. 279–280, Feb. 2007, doi: 10.3324/HAEMATOL.10454.

- [372] S. Battistelli et al., “Coagulation factor levels in non-metastatic colorectal cancer patients,” *Int J Biol Markers*, vol. 23, no. 1, pp. 36–41, 2008, doi: 10.5301/JBM.2008.4255.
- [373] V. Brinkmann et al., “Neutrophil extracellular traps kill bacteria,” *Science*, vol. 303, no. 5663, pp. 1532–1535, Mar. 2004, doi: 10.1126/SCIENCE.1092385.
- [374] T. A. Fuchs et al., “Extracellular DNA traps promote thrombosis,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 36, pp. 15880–15885, Sep. 2010, doi: 10.1073/PNAS.1005743107.
- [375] M. L. von Brühl et al., “Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo,” *J Exp Med*, vol. 209, no. 4, pp. 819–835, Apr. 2012, doi: 10.1084/JEM.20112322.
- [376] D. A. Stakos et al., “Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction,” *Eur Heart J*, vol. 36, no. 22, pp. 1405–1414, Jun. 2015, doi: 10.1093/EURHEARTJ/EHV007.
- [377] Y. Wang et al., “Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice,” *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-22156-5.
- [378] L. Martos et al., “Increase of Neutrophil Activation Markers in Venous Thrombosis-Contribution of Circulating Activated Protein C,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 16, pp. 1–19, Aug. 2020, doi: 10.3390/IJMS21165651.
- [379] M. L. van Montfoort et al., “Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 33, no. 1, pp. 147–151, Jan. 2013, doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300498.
- [380] J. A. Diaz et al., “Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis,” *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, vol. 1, no. 4, 2013, doi: 10.1016/J.JVSV.2012.12.002.
- [381] G. Vogel and E. Spanuth, “Predictive value of fibrin monomers in postoperative deep vein thrombosis,” *Klin Wochenschr*, vol. 68, no. 20, pp. 1020–1026, Oct. 1990, doi: 10.1007/BF01646548.
- [382] R. E. G. Schutgens, F. J. L. M. Haas, M. J. Agterof, M. Vos, and D. H. Biesma, “The role of fibrin monomers in optimizing the diagnostic work-up of deep vein thrombosis,” *Thromb Haemost*, vol. 97, no. 5, pp. 807–13, May 2007.
- [383] A. Rodriguez-Rius, S. Lopez, A. Martinez-Perez, J. C. Souto, and J. M. Soria, “Identification of a Plasma MicroRNA Profile Associated With Venous Thrombosis,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 40, no. 5, pp. 1392–1399, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314092.
- [384] V. M. Morelli, S. K. Brækkan, and J. B. Hansen, “Role of microRNAs in Venous Thromboembolism,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 7, Apr. 2020, doi: 10.3390/IJMS21072602.
- [385] A. A. Hembrom, S. Srivastava, I. Garg, and B. Kumar, “MicroRNAs in venous thromboembolism,” *Clin Chim Acta*, vol. 504, pp. 66–72, May 2020, doi: 10.1016/J.CCA.2020.01.034.
- [386] X. Wang et al., “Diagnostic potential of plasma microRNA signatures in patients with deep-vein thrombosis,” *Thromb Haemost*, vol. 116, no. 2, pp. 328–336, Aug. 2016, doi: 10.1160/TH16-01-0071.

- [387] S. Lindström et al., “Genomic and transcriptomic association studies identify 16 novel susceptibility loci for venous thromboembolism,” *Blood*, vol. 134, no. 19, pp. 1645–1657, Nov. 2019, doi: 10.1182/BLOOD.2019000435.
- [388] M. Germain et al., “Meta-analysis of 65,734 individuals identifies TSPAN15 and SLC44A2 as two susceptibility loci for venous thromboembolism,” *Am J Hum Genet*, vol. 96, no. 4, pp. 532–542, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.AJHG.2015.01.019.
- [389] D. A. Trégouët et al., “Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach,” *Blood*, vol. 113, no. 21, pp. 5298–5303, 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2008-11-190389.
- [390] S. B. Jensen et al., “Discovery of novel plasma biomarkers for future incident venous thromboembolism by untargeted synchronous precursor selection mass spectrometry proteomics,” *J Thromb Haemost*, vol. 16, no. 9, pp. 1763–1774, Sep. 2018, doi: 10.1111/JTH.14220.
- [391] M. Bruzelius et al., “PDGFB, a new candidate plasma biomarker for venous thromboembolism: results from the VEREMA affinity proteomics study,” *Blood*, vol. 128, no. 23, pp. e59–e66, Dec. 2016, doi: 10.1182/BLOOD-2016-05-711846.
- [392] H. Deguchi et al., “Acylcarnitines are anticoagulants that inhibit factor Xa and are reduced in venous thrombosis, based on metabolomics data,” *Blood*, vol. 126, no. 13, pp. 1595–1600, Sep. 2015, doi: 10.1182/BLOOD-2015-03-636761.
- [393] O. A. Zeleznik et al., “Metabolomic analysis of 92 pulmonary embolism patients from a nested case–control study identifies metabolites associated with adverse clinical outcomes,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 16, no. 3, pp. 500–507, Mar. 2018, doi: 10.1111/jth.13937.
- [394] X. Jiang et al., “Metabolites Associated With the Risk of Incident Venous Thromboembolism: A Metabolomic Analysis,” *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, vol. 7, no. 22, Nov. 2018, doi: 10.1161/JAHA.118.010317.
- [395] K. Fraser et al., “Plasma Biomarkers and Identification of Resilient Metabolic Disruptions in Patients With Venous Thromboembolism Using a Metabolic Systems Approach,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 40, no. 10, pp. 2527–2538, 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314480.
- [396] S. Mas, A. A. Badran, M. J. Juárez, D. H. Fernández de Rojas, S. Morais, and Á. Maquieira, “Highly sensitive optoelectrical biosensor for multiplex allergy diagnosis,” *Biosens Bioelectron*, vol. 166, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.BIOS.2020.112438.
- [397] M. I. Alcoriza-Balaguer et al., “LipidMS: An R Package for Lipid Annotation in Untargeted Liquid Chromatography-Data Independent Acquisition-Mass Spectrometry Lipidomics,” *Anal Chem*, vol. 91, no. 1, pp. 836–845, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03409.

- [398] J. Chalubinska-Fendler et al., "Lipopolysaccharide-Binding Protein Is an Early Biomarker of Cardiac Function After Radiation Therapy for Breast Cancer," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, vol. 104, no. 5, pp. 1074–1083, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.04.002.
- [399] M. Asada et al., "Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein Levels and the Incidence of Cardiovascular Disease in a General Japanese Population: The Hisayama Study," *J Am Heart Assoc*, vol. 8, no. 21, Nov. 2019, doi: 10.1161/JAHA.119.013628.
- [400] M. Serrano et al., "Serum lipopolysaccharide-binding protein as a marker of atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 230, no. 2, pp. 223–227, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.004.
- [401] S. M. Opal et al., "Relationship between Plasma Levels of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS-Binding Protein in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock," *J Infect Dis*, vol. 180, no. 5, pp. 1584–1589, Nov. 1999, doi: 10.1086/315093.
- [402] A. Myc, J. Buck, J. Gonin, B. Reynolds, U. Hammerling, and D. Emanuel, "The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome.," *Clin Diagn Lab Immunol*, vol. 4, no. 2, pp. 113–6, Mar. 1997, Accessed: Jun. 06, 2020. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067641>
- [403] F. Gaertner and S. Massberg, "Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity," *Seminars in Immunology*, vol. 28, no. 6. Academic Press, pp. 561–569, Dec. 01, 2016. doi: 10.1016/j.smim.2016.10.010.
- [404] J. A. Páramo and R. Lecumberri, "New mechanisms in vein thrombosis: Immunothrombosis," *Med Clin (Barc)*, vol. 153, no. 2, pp. 78–81, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.medcli.2019.01.001.
- [405] R. Palankar and A. Greinacher, "Challenging the concept of immunothrombosis," *Blood*, vol. 133, no. 6, pp. 508–509, Feb. 2019, doi: 10.1182/blood-2018-11-886267.
- [406] K. M. Alkharfy, N. M. Al-Daghri, P. M. Vanhoutte, S. Krishnaswamy, and A. Xu, "Serum retinol-binding protein 4 as a marker for cardiovascular disease in women," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, Oct. 2012, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0048612.
- [407] E. Ingelsson *et al.*, "Circulating retinol-binding protein 4, cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease in elderly," *Atherosclerosis*, vol. 206, no. 1, pp. 239–244, Sep. 2009, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2009.02.029.
- [408] Q. Sun *et al.*, "Plasma retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and risk of coronary heart disease: a prospective analysis among women in the nurses' health study," *Circulation*, vol. 127, no. 19, pp. 1938–1947, May 2013, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002073.
- [409] L. A. Calò, G. Maiolino, E. Pagnin, U. Vertolli, and P. A. Davis, "Increased RBP4 in a human model of activated anti-atherosclerotic and antiremodelling defences," *Eur J Clin Invest*, vol. 44, no. 6, pp. 567–572, 2014, doi: 10.1111/ECI.12270.
- [410] R. Barazzoni *et al.*, "High plasma retinol binding protein 4 (RBP4) is associated with systemic inflammation independently of low RBP4 adipose expression and is normalized by transplantation in nonobese, nondiabetic patients with chronic kidney disease," *Clin Endocrinol (Oxf)*, vol. 75, no. 1, pp. 56–63, 2011, doi: 10.1111/J.1365-2265.2011.03990.X.

- [411] A. Yao-Borengasser *et al.*, "Retinol binding protein 4 expression in humans: relationship to insulin resistance, inflammation, and response to pioglitazone," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 92, no. 7, pp. 2590–2597, 2007, doi: 10.1210/JC.2006-0816.
- [412] Y. Liu, D. Wang, D. Li, R. Sun, and M. Xia, "Associations of retinol-binding protein 4 with oxidative stress, inflammatory markers, and metabolic syndrome in a middle-aged and elderly Chinese population," *Diabetol Metab Syndr*, vol. 6, no. 1, Feb. 2014, doi: 10.1186/1758-5996-6-25.
- [413] A. Thompson *et al.*, "Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies," *Lancet*, vol. 375, no. 9725, pp. 1536–1544, 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60319-4.
- [414] Q. Wang *et al.*, "PLA2G7 gene polymorphisms and coronary heart disease risk: a meta-analysis," *Thromb Res*, vol. 126, no. 6, pp. 498–503, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.THROMRES.2010.09.009.
- [415] C. C. Tellis and A. D. Tselepis, "The role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis may depend on its lipoprotein carrier in plasma," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1791, no. 5, pp. 327–338, May 2009, doi: 10.1016/J.BBALIP.2009.02.015.
- [416] A. Zalewski and C. Macphee, "Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, no. 5, pp. 923–931, May 2005, doi: 10.1161/01.ATV.0000160551.21962.A7.
- [417] L. J. Küster, J. Filep, and J. C. Frölich, "Mechanism of PAF-induced platelet aggregation in man," *Thromb Res*, vol. 43, no. 4, pp. 425–433, Aug. 1986, doi: 10.1016/0049-3848(86)90087-3.
- [418] M. A. Ashraf and V. Nookala, "Biochemistry of Platelet Activating Factor," *StatPearls*, Apr. 2022, Accessed: Oct. 04, 2022. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557392/>
- [419] G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, and D. M. Stafforini, "The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis," *Crit Care Med*, vol. 30, no. 5 Suppl, 2002, doi: 10.1097/00003246-200205001-00020.
- [420] A. D. Tselepis *et al.*, "Plasma levels of lipoprotein-associated phospholipase A2 are increased in patients with  $\beta$ -thalassemia," *J Lipid Res*, vol. 51, no. 11, p. 3331, Nov. 2010, doi: 10.1194/JLR.M007229.
- [421] Y. Ling, S. Tang, Y. Cao, and C. Fu, "Relationship between Plasma Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Concentrations and Apolipoprotein in Stable Coronary Artery Disease Patients," *Dis Markers*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8818358.
- [422] E. Hailman *et al.*, "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14," *J Exp Med*, vol. 179, no. 1, pp. 269–277, Jan. 1994, doi: 10.1084/JEM.179.1.269.
- [423] R. R. Schumann, "Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule," *Biochem Soc Trans*, vol. 39, no. 4, pp. 989–993, Aug. 2011, doi: 10.1042/BST0390989.

- [424] C. Vaure and Y. Liu, "A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species," *Front Immunol*, vol. 5, no. JUL, 2014, doi: 10.3389/FIMMU.2014.00316.
- [425] A. Oliva *et al.*, "Low-Grade Endotoxemia and Thrombosis in COVID-19," *Clin Transl Gastroenterol*, vol. 12, no. 6, p. E00348, Jun. 2021, doi: 10.14309/CTG.0000000000000348.
- [426] H. Hoel *et al.*, "Elevated markers of gut leakage and inflammasome activation in COVID-19 patients with cardiac involvement," *J Intern Med*, vol. 289, no. 4, pp. 523–531, Apr. 2021, doi: 10.1111/JOIM.13178.
- [427] S. Zhou *et al.*, "Circulating proteins influencing COVID-19 susceptibility and severity: A Mendelian randomization study," *medRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.10.13.20212092.
- [428] S. B. Jensen, N. Latysheva, K. Hindberg, and T. Ueland, "Plasma lipopolysaccharide-binding protein is a biomarker for future venous thromboembolism: Results from discovery and validation studies," *J Intern Med*, vol. 292, no. 3, pp. 523–535, Sep. 2022, doi: 10.1111/JOIM.13502.
- [429] P. Sarzi-Puttini, V. Giorgi, S. di Lascio, and D. Fornasari, "Acetyl-L-carnitine in chronic pain: A narrative review," *Pharmacol Res*, vol. 173, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.PHRS.2021.105874.
- [430] J. W. Pettegrew, J. Levine, and R. J. McClure, "Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression," *Mol Psychiatry*, vol. 5, no. 6, pp. 616–632, 2000, doi: 10.1038/SJ.MP.4000805.
- [431] P. Decina *et al.*, "L-acetyl-carnitine in Huntington's disease: double-blind placebo controlled crossover study of drug effects on movement disorder and dementia," *Mov Disord*, vol. 5, no. 3, pp. 263–266, 1990, doi: 10.1002/MDS.870050317.
- [432] M. Malaguarnera *et al.*, "Acetyl-L-carnitine treatment in minimal hepatic encephalopathy," *Dig Dis Sci*, vol. 53, no. 11, pp. 3018–3025, Nov. 2008, doi: 10.1007/S10620-008-0238-6.
- [433] N. Veronese, B. Stubbs, M. Solmi, O. Ajnakina, A. F. Carvalho, and S. Maggi, "Acetyl-L-Carnitine Supplementation and the Treatment of Depressive Symptoms: A Systematic Review and Meta-Analysis," *Psychosom Med*, vol. 80, no. 2, pp. 154–159, Feb. 2018, doi: 10.1097/PSY.0000000000000537.
- [434] H. Y. Nam, E. J. Na, E. Lee, Y. Kwon, and H. J. Kim, "Antiepileptic and neuroprotective effects of oleamide in rat striatum on kainate-induced behavioral seizure and excitotoxic damage via calpain inhibition," *Front Pharmacol*, vol. 8, no. NOV, p. 817, Nov. 2017, doi: 10.3389/FPHAR.2017.00817/BIBTEX.
- [435] M. A. Akanmu, S. O. Adeosun, and O. R. Ilesanmi, "Neuropharmacological effects of oleamide in male and female mice," *Behavioural brain research*, vol. 182, no. 1, pp. 88–94, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.BBR.2007.05.006.
- [436] E. Murillo-Rodríguez *et al.*, "Oleamide modulates memory in rats," *Neurosci Lett*, vol. 313, no. 1–2, pp. 61–64, Nov. 2001, doi: 10.1016/S0304-3940(01)02256-X.

- [437] I. Fedorova *et al.*, “Behavioral Evidence for the Interaction of Oleamide with Multiple Neurotransmitter Systems” *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Oct; 299(1):332-42.
- [438] C.-F. Wu, C.-L. Li, H.-R. Song, H.-F. Zhang, J.-Y. Yang, and Y.-L. Wang, “Selective effect of oleamide, an endogenous sleep-inducing lipid amide, on pentylenetetrazole-induced seizures in mice,” *J Pharm Pharmacol*, vol. 55, no. 8, pp. 1159–1162, Feb. 2003, doi: 10.1211/0022357021431.
- [439] S. Huitrón-Reséndiz, L. Gombart, B. F. Cravatt, and S. J. Henriksen, “Effect of oleamide on sleep and its relationship to blood pressure, body temperature, and locomotor activity in rats,” *Exp Neurol*, vol. 172, no. 1, pp. 235–243, 2001, doi: 10.1006/EXNR.2001.7792.
- [440] J. J. Hopps, W. R. Dunn, and M. D. Randall, “Enhanced vasorelaxant effects of the endocannabinoid-like mediator, oleamide, in hypertension,” *Eur J Pharmacol*, vol. 684, no. 1–3, pp. 102–107, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.EJP.2012.03.027.
- [441] P. Wisitpongpun, P. Potup, and K. Usuwanthim, “Oleamide-Mediated Polarization of M1 Macrophages and IL-1 $\beta$  Production by Regulating NLRP3-Inflammasome Activation in Primary Human Monocyte-Derived Macrophages,” *Front Immunol*, vol. 13, p. 1721, Apr. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.856296/BIBTEX.
- [442] M. P. McRae, “Therapeutic Benefits of L-Arginine: An Umbrella Review of Meta-analyses,” *J Chiropr Med*, vol. 15, no. 3, p. 184, 2016, doi: 10.1016/J.JCM.2016.06.002.
- [443] F. Shiraseb, O. Asbaghi, R. Bagheri, A. Wong, A. Figueroa, and K. Mirzaei, “Effect of L-Arginine Supplementation on Blood Pressure in Adults: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis of Randomized Clinical Trials,” *Adv Nutr*, vol. 13, no. 4, pp. 1226–1242, Aug. 2022, doi: 10.1093/ADVANCES/NMAB155.
- [444] L. D. Monti, E. Galluccio, V. Villa, B. Fontana, S. Spadoni, and P. M. Piatti, “Decreased diabetes risk over 9 year after 18-month oral L-arginine treatment in middle-aged subjects with impaired glucose tolerance and metabolic syndrome (extension evaluation of L-arginine study),” *Eur J Nutr*, vol. 57, no. 8, pp. 2805–2817, Dec. 2018, doi: 10.1007/S00394-017-1548-2.
- [445] M. Liang *et al.*, “L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway,” *Food Chem Toxicol*, vol. 115, pp. 315–328, May 2018, doi: 10.1016/J.FCT.2018.03.029.
- [446] A. Viribay, J. Burgos, J. Fernández-Landa, J. Seco-Calvo, and J. Mielgo-Ayuso, “Effects of Arginine Supplementation on Athletic Performance Based on Energy Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Nutrients*, vol. 12, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/NU12051300.
- [447] C. L. Chen, S. C. Hsu, D. K. Ann, Y. Yen, and H. J. Kung, “Arginine Signaling and Cancer Metabolism,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 14, Jul. 2021, doi: 10.3390/CANCERS13143541.
- [448] J. Rodrigues-Krause, M. Krause, I. M. G. da Rocha, D. Umpierre, and A. P. T. Fayh, “Association of L-Arginine Supplementation with Markers of Endothelial Function in Patients with Cardiovascular or Metabolic Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Nutrients*, vol. 11, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.3390/NU11010015.
- [449] R. H. Böger, “L-Arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous?,” *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 11, no. 1, pp. 55–61, Jan. 2008, doi: 10.1097/MCO.0B013E3282F2B0C3.

- [450] A. Schumann-Gillett and M. L. O'Mara, "The effects of oxidised phospholipids and cholesterol on the biophysical properties of POPC bilayers," *Biochim Biophys Acta Biomembr*, vol. 1861, no. 1, pp. 210–219, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2018.07.012.
- [451] A. Elbaradei, Z. Wang, and N. Malmstadt, "Oxidation of Membrane Lipids Alters the Activity of the Human Serotonin 1A Receptor," *Langmuir*, vol. 38, no. 22, pp. 6798–6807, Jun. 2022, doi: 10.1021/ACS.LANGMUIR.1C03238.
- [452] Y. Ouchi, K. Unoura, and H. Nabika, "Role of Oxidized Lipids in Permeation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Through a Lipid Membrane: Molecular Mechanism of an Inhibitor to Promoter Switch," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/S41598-019-48954-Z.
- [453] C. Code, A. K. Mahalka, K. Bry, and P. K. J. Kinnunen, "Activation of phospholipase A<sub>2</sub> by 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine in vitro," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1798, no. 8, pp. 1593–1600, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2010.05.002.
- [454] I. Tamayo *et al.*, "Group V secretory phospholipase A<sub>2</sub> impairs endothelial protein C receptor-dependent protein C activation and accelerates thrombosis in vivo," *J Thromb Haemost*, vol. 12, no. 11, pp. 1921–1927, Nov. 2014, doi: 10.1111/JTH.12676.
- [455] D. J. Stephenson, L. A. Hoeflerlin, and C. E. Chalfant, "Lipidomics in translational research and the clinical significance of lipid-based biomarkers," *Translational Research*, vol. 189. Mosby Inc., pp. 13–29, Nov. 01, 2017, doi: 10.1016/j.trsl.2017.06.006.
- [456] Y. Y. Zhao, H. Miao, X. L. Cheng, and F. Wei, "Lipidomics: Novel insight into the biochemical mechanism of lipid metabolism and dysregulation-associated disease," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 240. Elsevier Ireland Ltd, pp. 220–238, Oct. 05, 2015, doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.005.
- [457] N. Augé, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre, and T. Levade, "Sphingomyelin metabolites in vascular cell signaling and atherogenesis," *Progress in Lipid Research*, vol. 39, no. 3. Prog Lipid Res, pp. 207–229, May 01, 2000, doi: 10.1016/S0163-7827(00)00007-2.
- [458] E. E. Egom *et al.*, "Serum sphingolipids level as a novel potential marker for early detection of human myocardial ischaemic injury," *Front. Physiol.*, vol. 4 JUN, 2013, doi: 10.3389/fphys.2013.00130.
- [459] R. Bhatia, K. Matsushita, M. Yamakuchi, C. N. Morrell, W. Cao, and C. J. Lowenstein, "Ceramide triggers Weibel-Palade body exocytosis," *Circ. Res.*, vol. 95, no. 3, pp. 319–324, Aug. 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000136519.84279.7a.
- [460] T. W. Wakefield, D. D. Myers, and P. K. Henke, "Role of selectins and fibrinolysis in VTE," *Thromb. Res.*, vol. 123, no. SUPPL. 4, 2009, doi: 10.1016/S0049-3848(09)70141-0.
- [461] D. D. Myers *et al.*, "Vein Wall and Circulating P-selectin Promote Venous Thrombogenesis During Aging in a Rodent Model," *J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord.*, vol. 1, no. 1, p. 114, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.jvsv.2012.10.047.
- [462] C. N. Antonopoulos, G. S. Sfyroeras, J. D. Kakisis, K. G. Moulakakis, and C. D. Liapis, "The role of soluble P selectin in the diagnosis of venous thromboembolism," *Thromb. Res.*, vol. 133, no. 1, pp. 17–24, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.thromres.2013.08.014.

- [463] C. Ay *et al.*, “High concentrations of soluble P-selectin are associated with risk of venous thromboembolism and the P-selectin Thr715 variant,” *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 7, pp. 1235–1243, Jul. 2007, doi: 10.1373/clinchem.2006.085068.
- [464] J. A. Diaz *et al.*, “P-Selectin inhibition therapeutically promotes thrombus resolution and prevents vein wall fibrosis better than enoxaparin and an inhibitor to von willebrand factor,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 4, pp. 829–837, Apr. 2015, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304457.
- [465] H. Deguchi, J. A. Fernández, I. Pabinger, J. A. Heit, and J. H. Griffin, “Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway,” *Blood*, vol. 97, no. 7, pp. 1907–1914, Apr. 2001, doi: 10.1182/blood.V97.7.1907.
- [466] H. Deguchi *et al.*, “Low level of the plasma sphingolipid, glucosylceramide, is associated with thrombotic diseases,” *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, vol. 1, no. 1, pp. 33–40, Jul. 2017, doi: 10.1002/rth2.12018.
- [467] S. Mahajan-Thakur, A. Böhm, G. Jedlitschky, K. Schrör, and B. H. Rauch, “Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015, doi: 10.1155/2015/831059.
- [468] J. Wang, U. R. Pendurthi, and L. V. M. Rao, “The Role of Sphingomyelin (SM) in Tissue Factor (TF) Encryption: ATP-Induced Activation of Acid Sphingomyelinase in Macrophages Decrypts Tissue Factor By Hydrolysis of SM in the Outer Leaflet,” *Blood*, vol. 128, no. 22, pp. 16–16, Dec. 2016, doi: 10.1182/blood.v128.22.16.16.
- [469] J. Wang, U. Pendurthi, and L. V. M. Rao, “Alterations in Sphingomyelin Metabolism Influences Tissue Factor Procoagulant Activity and the Release of TF-Positive Microvesicles,” *Blood*, vol. 134, no. Supplement\_1, pp. 1103–1103, Nov. 2019, doi: 10.1182/blood-2019-125933.
- [470] Y. Sung *et al.*, “Deep Vein Thrombosis Exhibits Characteristic Serum and Vein Wall Metabolic Phenotypes in the Inferior Vena Cava Ligation Mouse Model,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 55, no. 5, pp. 703–713, May 2018, doi: 10.1016/j.ejvs.2018.01.027.
- [471] G. D’Angelo, S. Capasso, L. Sticco, and D. Russo, “Glycosphingolipids: Synthesis and functions,” *FEBS Journal*, vol. 280, no. 24. FEBS J, pp. 6338–6353, Dec. 2013, doi: 10.1111/febs.12559.
- [472] A. H. Merrill, “Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics,” *Chemical Reviews*, vol. 111, no. 10. Chem Rev, pp. 6387–6422, Oct. 12, 2011, doi: 10.1021/cr2002917.
- [473] C. J. M. Doggen, N. L. Smith, R. N. Lemaitre, S. R. Heckbert, F. R. Rosendaal, and B. M. Psaty, “Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1970–1975, Oct. 2004, doi: 10.1161/01.ATV.0000143134.87051.46.
- [474] N. Sattar *et al.*, “Lipoprotein (a), cholesterol and triglycerides in women with venous thromboembolism,” *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 11, no. 3, pp. 225–229, Apr. 2000, Accessed: May 01, 2021. [Online]. Available: <http://europepmc.org/article/MED/10870800>.

- [475] A. Vayá *et al.*, "Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors," *Br. J. Haematol.*, vol. 118, no. 1, pp. 255–259, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2141.2002.03563.x.
- [476] T. Kawasaki, J. I. Kambayashi, H. Ariyoshi, M. Sakon, E. Suehisa, and M. Monden, "Hypercholesterolemia as a risk factor for deep-vein thrombosis," *Thromb. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 67–73, Oct. 1997, doi: 10.1016/S0049-3848(97)00192-8.
- [477] M. D. Smirnov and C. T. Esmon, "Phosphatidylethanolamine incorporation into vesicles selectively enhances factor Va inactivation by activated protein C," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 2, pp. 816–819, Jan. 1994, doi: 10.1016/s0021-9258(17)42183-1.
- [478] J. A. Fernández, K. Kojima, J. Petäjä, T. M. Hackeng, and J. H. Griffin, "Cardiolipin enhances protein C pathway anticoagulant activity," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 26, no. 2, pp. 115–123, 2000, doi: 10.1006/bcmd.2000.0285.
- [479] M. Sanmarco *et al.*, "Antibodies to phosphatidylethanolamine as the only antiphospholipid antibodies found in patients with unexplained thromboses," *Thromb. Haemost.*, vol. 85, no. 5, pp. 800–805, Dec. 2001, doi: 10.1055/s-0037-1615751.
- [480] H. L. Staub, M. L. Bertolaccini, and M. A. Khamashta, "Anti-phosphatidylethanolamine antibody, thromboembolic events and the antiphospholipid syndrome," *Autoimmunity Reviews*, vol. 12, no. 2. *Autoimmun Rev*, pp. 230–234, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.autrev.2012.07.008.
- [481] M. Sanmarco *et al.*, "Antiphosphatidylethanolamine antibodies are associated with an increased odds ratio for thrombosis - A multicenter study with the participation of the European Forum on antiphospholipid antibodies," *Thromb. Haemost.*, vol. 97, no. 6, pp. 949–954, Jun. 2007, doi: 10.1160/TH06-10-0604.
- [482] F. Visioli and A. Poli, "Fatty acids and cardiovascular risk. Evidence, lack of evidence, and diligence," *Nutrients*, vol. 12, no. 12, pp. 1–19, Dec. 2020, doi: 10.3390/nu12123782.
- [483] P. Didisheim and R. S. Mibashan, "ACTIVATION OF HAGEMAN FACTOR (FACTOR XII) BY LONG-CHAIN SATURATED FATTY ACIDS," *Thromb. Diath. Haemorrh.*, vol. 143, no. 02, pp. 346–353, Jun. 1963, doi: 10.1055/s-0038-1654989.
- [484] K. A. Mitropoulos and M. P. Esnouf, "The autoactivation of factor XII in the presence of long-chain saturated fatty acids - A comparison with the potency of sulphatides and dextran sulphates," *Thromb. Haemost.*, vol. 66, no. 4, pp. 446–452, Oct. 1991, doi: 10.1055/s-0038-1646436.
- [485] K. A. Mitropoulos, B. E. A. Reeves, D. P. O'Brien, J. A. Cooper, and J. C. Martin, "The relationship between factor VII coagulant activity and factor XII activation induced in plasma by endogenous or exogenously added contact surface," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, vol. 4, no. 2, pp. 223–234, 1993, doi: 10.1097/00001721-199304000-00003.
- [486] K. A. Mitropoulos, G. J. Miller, J. C. Martin, B. E. A. Reeves, and J. Cooper, "Dietary fat induces changes in factor VII coagulant activity through effects on plasma free stearic acid concentration," *Arterioscler. Thromb.*, vol. 14, no. 2, pp. 214–222, 1994, doi: 10.1161/01.atv.14.2.214.

- [487] L. W. Wilson, D. Powers, and L. A. Soloff, "THE HEMODYNAMIC EFFECTS OF INFUSIONS OF LONG CHAIN SATURATED FATTY," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 249, pp. 75–78, 1965, doi: 10.1097/00000441-196501000-00013.
- [488] S. Renaud, E. Dumont, F. Godsey, A. Suplisson, and C. Thevenon, "Platelet functions in relation to dietary fats in farmers from two regions of France," *Thromb. Haemost.*, vol. 40, no. 3, pp. 518–531, Jul. 1979, doi: 10.1055/s-0038-1648685.
- [489] D. de Moraes Mizurini, I. da Costa Maia, F. L. de Carvalho Sardinha, R. de Queiroz Monteiro, S. Ortiz-Costa, and M. Das Graças Tavares do Carmo, "Venous thrombosis risk: Effects of palm oil and hydrogenated fat diet in rats," *Nutrition*, vol. 27, no. 2, pp. 233–238, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.nut.2009.11.027.
- [490] J. Lagrange *et al.*, "Implication of free fatty acids in thrombin generation and fibrinolysis in vascular inflammation in Zucker rats and evolution with aging," *Front. Physiol.*, vol. 8, no. NOV, p. 949, Nov. 2017, doi: 10.3389/fphys.2017.00949.
- [491] S. Yuan, M. Bäck, M. Bruzelius, A. M. Mason, S. Burgess, and S. Larsson, "Plasma phospholipid fatty acids, FADS1 and risk of 15 cardiovascular diseases: A mendelian randomisation study," *Nutrients*, vol. 11, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.3390/nu11123001.