

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Nous fenotips intermediaris basats en el model cel·lular de la coagulació com a factors de risc de trombosi venosa

Tesi doctoral realitzada per Noelia Vilalta Setó per optar al títol de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Tesis realitzada sota la direcció del Dr. Jordi Fontcuberta Boj, el Dr. Juan Carlos Souto, i el Dr. Jose Mateo.

Tutoritzada pel Dr. Jordi Sierra Gil

Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona, 2019

Agraïments

Agraïments

En primer lloc voldria agrair als directors (companys i amics) d'aquesta tesi: el Jordi, el Jose i el Joan Carles que m'hagin permès robar-los temps lliure per a repassar i repassar aquesta tesi, haver-la llegit des de la primera majúscula fins al darrer punt i enriquir-la amb les seves aportacions. Gràcies per adaptar-vos a les dates límits i precipitades que en aquests darrers mesos us he "imposat" en certa manera. Ha estat un veritable honor.

Al Dr. Sierra, per acceptar ser el tutor de tesi tot i la seva atapeïda agenda i per donar-me l'oportunitat de treballar al Sant Pau. En aquests darrers deu anys, s'ha convertit en la meva segona casa (de vegades la primera) on he conegut persones extraordinàries.

Als amics d'esmorzars, dinars, berenars, sopars i el que convingui: la Marina, el Txuan i el Miquel. Tant important és l'estudi i la redacció de la tesi, com la capacitat per fer catarsis. Gràcies per ser un pilar tant important no només a la feina, sinó del dia a dia.

A "las chicas" (Dolors, Isa, Lidia i Cris) i als "chicos" (Marc i Quino) del laboratori. Sense la vostra feina de "poyata" aquesta tesi no hauria estat possible. Gràcies per ensenyar-me els secrets del laboratori i per permetre'm aprendre cada dia.

Als companys del "Sintrom": Chus, Bea, Montses, Elena, Puri i Manolo. Em feu sentir com a casa.

A la mama, per recolzar-me amb tot i estar sempre al meu costat. Sense tu, el padrí i la padrina no hauria arribat fins aquí. Som un gran equip. Us estimo.

A la padrina, per donar-me el teu caràcter i personalitat, t'enyoro molt i molt.

Als dos Miquels de la meva vida: passat, present i futur. Sé que m'esteu acompanyant.

I al Biel: Gràcies per fer-me feliç. Cada dia t'estimo més.

Glossari d'abreviatures

Glossari d'abreviatures

Abreviatura	Descripció
AAS	Àcid acetil salicílic
ADP	Adenosina Difosfat
AGR	Agregació màxima
AINES	Antiinflamatoris no esteroïdals
am	Abans del migdia
AT	Antitrombina
AUC	Àrea sota la corba
cfDNA	ADN lliure
CHCM	Concentració d'hemoglobina corpuscular mitja
CNV	Variació número de còpies
DE	Desviació estàndard
EPI	Epinefrina
ETP	Potencial endogen de trombina
FE	Ferro sèric
FIX	Factor IX de la coagulació
FIXa	Factor IX activat de la coagulació
FT	Factor tissular
Ft	Ferritina
FV	Factor V de la coagulació
FVII	Factor VII de la coagulació
FVIIa	Factor VII activat de la coagulació
FVIII	Factor VIII de la coagulació
FVL	Factor V Leiden
FvW	Factor de Von Willebrand
FX	Factor X de la coagulació
FXa	Factor X activat de la coagulació
FXI	Factor XI de la coagulació
GP	Glicoproteïna
GWAS	Genome Wide Association Study
h ²	Heretabilitat
H3cit	Histona H3 citrulinada
HB	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular mitja

HCT	Hematòcrit
HFR	Reticulòcits de fluorescència elevada
HP	Haptoglobina
HR	<i>Hazard ratio</i> (quocient de riscos)
HTA	Hipertensió arterial
IC	Interval de confiança
ICC	Insuficiència cardíaca congestiva
IMC	Índex de Massa Corporal
IRC	Insuficiència renal crònica
IRF	Índex de fluorescència reticulocitària
IRR	<i>Incidence rate ratio</i> (Ratio de taxa d'incidències)
ISTH	Societat Internacional de Trombosi i Hemostàsia
LFR	Reticulòcits de fluorescència baixa
LTA	Light transmission aggregometry
MFR	Reticulòcits de fluorescència mitja
MP	Micropartícules
MPO	Mieloperoxidasa
MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
MTEV	Malaltia tromboembòlica venosa
NE	Neutròfil elastasa
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (Trampes extracel·lulars de neutròfils)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Seqüenciació de nova generació)
NS	No significatiu
OMS	Organització Mundial de la Salut
OR	Odds ratio
PAI-1	Inhibidor de l'activador del plasminogen
PC	Proteïna C
PCI	Inhibidor de la proteïna C
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PFA	Analitzador de funcionalisme plaquetari
PFAadp	PFA-100® utilitzant com a inductor l'ADP
PFAepi	PFA-100® utilitzant com a inductor l'epinefrina
pm	Després del migdia
PS	Proteïna S
QTL	<i>Quantitative trait locus</i> (Lloc de trets quantitativus)
RBC	Recompte total d'hematies

RDW	Amplitud de distribució eritrocitaria
RET	Reticulòcits
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	Espècies reactives d'oxigen
RPCA	Resistència a la proteïna C activada
RPFA	PFA redundant (curt per ADP i per epinefrina)
SI	Índex de saturació
SIR	<i>Standardized incidence ratio</i> (Relació d'incidència normalitzada)
SLP	Pendent màxima d'agregació
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfisme únic de nucleòtids)
STFR	Receptor soluble de la transferrina
t-PA	Activador tissular del plasminogen
TAFI	Inhibidor de la fibrinòlisi activable per trombina
TEM	Tromboelastometria
TEP	Tromboembolisme pulmonar
TEV	Tromboembolisme venós
TFPI	Inhibidor de la via del factor tissular
TGT	Temps de generació de trombina
THS	Teràpia hormonal substitutiva
TLC	Temps de lisi del coàgul
TO	Temps d'obturació
TP	Temps de protrombina
TTPa	Temps de tromboplastina parcial activada
TVP	Trombosi venosa profunda
TXA2	Tromboxà A2
ULWF	Multímers ultra grans de Factor de Von Willebrand
VCM	Volum corpuscular mig
VPM	Volum plaquetari mig

Índex

I. Resums	14
II. Índex de taules	20
III. Índex de figures	22
1. Introducció	
1.1 De la protrombina a la cascada de la coagulació	24
1.2 Un model complex: el model Cel·lular	26
1.2.1 Iniciació	26
1.2.2 Amplificació	27
1.2.3 Propagació	27
1.3 El tromboembolisme venós	28
1.3.1 Diagnòstic del tromboembolisme venós	28
1.3.2 Causes de tromboembolisme venós	29
1.3.2.1 Les proteïnes activadores i inhibidores de la coagulació	29
1.3.2.2 El paper de la immunitat	30
1.3.2.3 Les plaquetes	30
1.3.2.4 Les micropartícules	31
1.3.3 La trombofília	31
1.3.3.1 Factors de risc actualment descrits	32
1.3.3.2 El futur de la investigació en trombofília	35
2. Hipòtesi i objectius	
2.1 Hipòtesis	40
2.2 Objectius	42
3. Material i mètodes	
3.1 Projectes d'investigació en trombosi venosa	44
3.1.1 Projecte "Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT-2)"	44
3.1.2 Projecte "Riesgo de Enfermedad TROMboembólica VEnosa (RETROVE)"	46
3.2 Anàlisi estadística	49
3.2.1 Anàlisi estadística del projecte GAIT-2	49
3.2.2 Anàlisi estadística del projecte RETROVE	50
3.3 Metodologia de laboratori	52
3.3.1 Estudi de la sèrie vermella i la sèrie leucocitària	52
3.3.2 Estudi del funcionalisme fèrric	53
3.3.3 Estudi del funcionalisme plaquetari	53
3.3.4 Estudi dels marcadors plasmàtics de les trapes de neutròfils (NETs)	55
3.3.5 Estudi d'altres paràmetres plasmàtics	55
3.3.6 Anàlisi genètica	56
4. Estat actual del tema	
4.1 Fenotips eritrocitaris i susceptibilitat genètica a la trombosi venosa	58
4.2 Funció plaquetària i susceptibilitat a la trombosi venosa	61
4.3 Leucòcits i susceptibilitat a la trombosi venosa	64
5. Resultats	
5.1 Estudi dels fenotips eritrocitaris i susceptibilitat genètica a la trombosi venosa	68
5.1.1 Càlcul de l'heretabilitat, efecte atribuïble a les covariables i	68

atribuïble a l'entorn	
5.1.1.1 Paràmetres eritrocitaris i índexs	70
5.1.1.2 Recomptes reticulocitaris	70
5.1.1.3 Haptoglobina	70
5.1.1.4 Paràmetres fèrrics	70
5.1.2 Correlacions genètiques dels fenotips eritrocitaris i risc de TEV	70
5.2 Estudi de la funció plaquetària i la seva susceptibilitat a la trombosi	72
5.2.1 Funcionalisme plaquetari per PFA-100® i risc trombòtic	73
5.2.2 Funcionalisme plaquetari per Multiplate™ i risc trombòtic	77
5.3 Estudi dels fenotips de la sèrie leucocitària i susceptibilitat a la trombosi	78
5.3.1 Relació entre els recomptes leucocitaris i risc de tromboembolisme	78
5.3.2 Estudi de la relació de biomarcadors plasmàtics de NETs i trombosi venosa	80
5.3.2.1 Model de regressió logística entre NE i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofília	82
5.3.2.2 Model de regressió logística entre H3cit i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofília	82
5.3.2.3 Model de regressió logística entre cfDNA i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofília	83
6. Discussió	
6.1 Genètica dels fenotips eritrocitaris i susceptibilitat a la trombosi	86
6.2 Estudi de la funció plaquetària i la seva susceptibilitat a la trombosi	88
6.3 Estudi dels fenotips de la sèrie leucocitària i susceptibilitat a la trombosi	90
6.3.1 Relació entre els recomptes leucocitaris i risc de TEV	90
6.3.2 Estudi de la relació de biomarcadors plasmàtics de NETs i trombosi	91
6.4 Discussió conjunta	93
7. Conclusions	96
8. Línies de futur	98
9. Bibliografia	100
10. Annexos	
10.1 Subvencions i ajuts rebuts	112
10.2 Articles publicats	113

I. Resum

El tromboembolisme venós (TEV) és una malaltia complexa. És conseqüència de la interacció de factors ambientals i genètics que molts cops es reflecteixen en els anomenats fenotips intermediaris. Aquests, s'associen per definició al risc de trombosi i per això tenen una gran utilitat tant diagnòstica com en la busca de factors causals.

La forma d'estudiar l'hemostàsia ha variat i, avui en dia, es parla del model cel·lular. El model cel·lular proporciona una visió més àmplia dels processos de l'hemostàsia projectant les múltiples interaccions entre els elements que hi intervenen. En aquest model, les cèl·lules no actuen només com una superfície fosfolipídica que serveix de suport als diferents factors, sinó que tenen un paper actiu. Això fa que les cèl·lules sanguínies siguin objectius on focalitzar la busca de nous fenotips implicats en les malalties de l'hemostàsia.

El principal objectiu d'aquesta tesi ha estat la caracterització de nous fenotips eritrocitaris, plaquetaris i leucocitaris per descriure la seva associació amb el risc de TEV.

Els estudis realitzats s'han desenvolupat en l'àmbit de dos projectes: *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (GAIT-2) un estudi de 35 famílies, i el projecte Riesgo de Enfermedad TROMboembólica Venosa (RETROVE), un estudi de casos i controls no emparentats amb 400 casos amb TEV i 400 controls.

L'estudi de la sèrie eritrocitària a la població GAIT-2 ha conduït cap a la identificació de 5 fenotips intermediaris genèticament correlacionats amb la trombosi: Hematòcrit, l'amplitud de distribució eritrocitària (RDW), índex de fluorescència reticulocitària (IRF), el receptor soluble de la transferrina i el ferro sèric. Aquests genotips poden utilitzar-se per a la recerca de gens relacionats amb la trombosi.

L'estudi de la funció plaquetària en pacients amb trombosi (projecte RETROVE) mitjançant dispositius habitualment utilitzats per a l'estudi de malalties hemorràgiques, com el PFA-100®, ens ha permès demostrar que el risc de TEV és superior en aquells pacients amb temps d'obturació curts. Aquest fet podria indicar que l'adhesió plaquetària tindria un paper en la formació i probablement en la propagació del trombus.

I finalment l'estudi de la població leucocitària fet dins el projecte RETROVE, ens ha permès identificar la xifra de monòcits superior a $0,7 \times 10^9/L$ com un factor de risc de TEV, fet que concorda amb estudis previs. I per altra banda, s'ha observat que els neutròfils dels pacients amb antecedents de TEV, tenen major capacitat per a fer NETosi, fet que s'observa amb un increment dels marcadors plasmàtics de trampes de neutròfils (NETs). Aquests marcadors poden ser utilitzats com a fenotips intermediaris de trombosi, però, a més, en un futur, poden arribar a ser dianes terapèutiques antitrombòtiques.

I. Abstract

Venous thromboembolism (VTE) is a complex disease. It is the result of the interaction between the environment and genes. This interaction is manifested by “intermediary phenotypes”. These intermediary phenotypes are useful for estimating the risk of developing the disease.

The prevailing view of hemostasis has changed and nowadays, there is another point of view based on a model in which coagulation is regulated by properties of cell surfaces: The Cell-based Model of Hemostasis. This model provides a wide vision of the hemostatic process and reflects the multiple pathways of hemostasis in vivo. The clearer understanding of the role of cells will allow us to answer some unanswered questions in hemostasis.

The main objective of this thesis has been the characterization of new erythrocyte, platelet and leucocyte phenotypes that will allow us to describe the association between blood cells and VTE risk.

The studies included in this thesis were performed in the context of two projects: the *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (GAIT-2) project, a study of 35 families and 935 individuals, and the project Riesgo de Enfermedad TROmboembólica Venosa (RETROVE), a case-control study of 400 unrelated cases with VTE and 400 controls.

Using the extended pedigrees of GAIT-2 project, we have identified 5 intermediate erythrocyte-related phenotypes: Hematocrit, red cell distribution width (RDW), index reticulocyte fluorescence (IRF), soluble transferrin receptor and serum iron, that are genetically correlated with VTE. They can be used in the research for thrombosis – related genes.

The study of platelet function in patients with thrombosis (in the RETROVE project) using devices that are frequently used for the study of hemorrhagic diseases, like PFA-100®, has allowed us to demonstrate that the risk of VTE is higher in patients with shortest closure times. This fact, supports the relevance of platelet adhesion in thrombus formation and probably, in their perpetuation.

And finally, the study of leucocyte counts in the RETROVE project, have allowed us, in one hand, to identify that monocyte counts over $0,7 \times 10^9/L$ are statistically associated

with previous VTE. Our findings are in line with previous studies that reported the same association. In the other hand, we have observed that circulating neutrophils in patients with VTE are prone to undergo NETosis, which is associated with enhanced expression of neutrophil extracellular traps (NETs) biomarkers. These biomarkers can be used as intermediary phenotypes for VTE, and, in the future, they can be therapeutic targets.

II. Índex de taules

Taula 1. Factors adquirits o ambientals associats amb el risc de TEV	32
Taula 2. Factors genètics associats amb el risc de TEV	33
Taula 3. Fenotips sanguinis (intermediaris) associats amb el risc de TEV	34
Taula 4. Relacions entre els individus inclosos a l'estudi GAIT-2	45
Taula 5. Característiques clíniques dels casos i controls inclosos dins el projecte RETROVE	47
Taula 6. Descripció dels 400 episodis trombòtics inclosos dins l'estudi RETROVE	47
Taula 7. Resum de les determinacions plasmàtiques realitzades en la investigació	55
Taula 8. Variables, heretabilitat, efecte de l'entorn i variabilitat explicada per les covariables	69
Taula 9. Heretabilitat estimada per la trombosi en la població GAIT-2	71
Taula 10. Correlacions genètiques dels fenotips eritrocitaris i el risc de TEV en la població GAIT-2	71
Taula 11. Característiques clíniques dels casos i controls dins l'estudi RETROVE i diferències entre els dos grups	72
Taula 12. Anàlisi descriptiva dels resultats obtinguts amb el PFA-100® i el Multiplate™ a l'estudi RETROVE	73
Taula 13. OR del risc de TEV estratificats segons el percentil (10, 20, 30 i 50) per cada paràmetre de PFA	74
Taula 14. Característiques de les variables incloses dins els models de regressió logística	76
Taula 15. OR del risc de TEV per a paràmetres de PFA per sota del percentil 10 dels controls i de Multiplate™ per sobre del percentil 90 dels controls	76
Taula 16. Descripció dels recomptes leucocitaris en els individus inclosos al projecte RETROVE	78
Taula 17. OR del risc de TEV tenint en compte els percentils 10 i 90 dels controls	79
Taula 18. OR de trombosis espontànies, provocades, úniques i múltiples tenint en compte el percentil 90 de la xifra de monòcits dels controls.	80
Taula 19. Taula descriptiva dels biomarcadors de NETs i altres paràmetres de trombofília en els individus del projecte RETROVE	81



Índex de figures

III. Índex de figures

Figura 1. Representació de la via intrínseca segons Davie (1a) i MacFarlane (1b)	24
Figura 2. Model actual de la coagulació	25
Figura 3. Exemple de corba obtinguda amb l'aparell Multiplate™	54
Figura 4. Contribucions potencials dels hematies normals i patològics a la trombosi arterial i venosa	58
Figura 5. Mecanismes de trombosi mediada per plaquetes	62
Figura 6. Mecanismes proposats de trombosi dependents de NETs	65
Figura 7. Risc de TEV segons el model sense ajustar per PFAadp (esquerra) i PFAepi (dreta).	75
Figura 8. Model de regressió logística de NE (8a), H3cit (8b) i cfDNA (8c)	83

1. Introducció

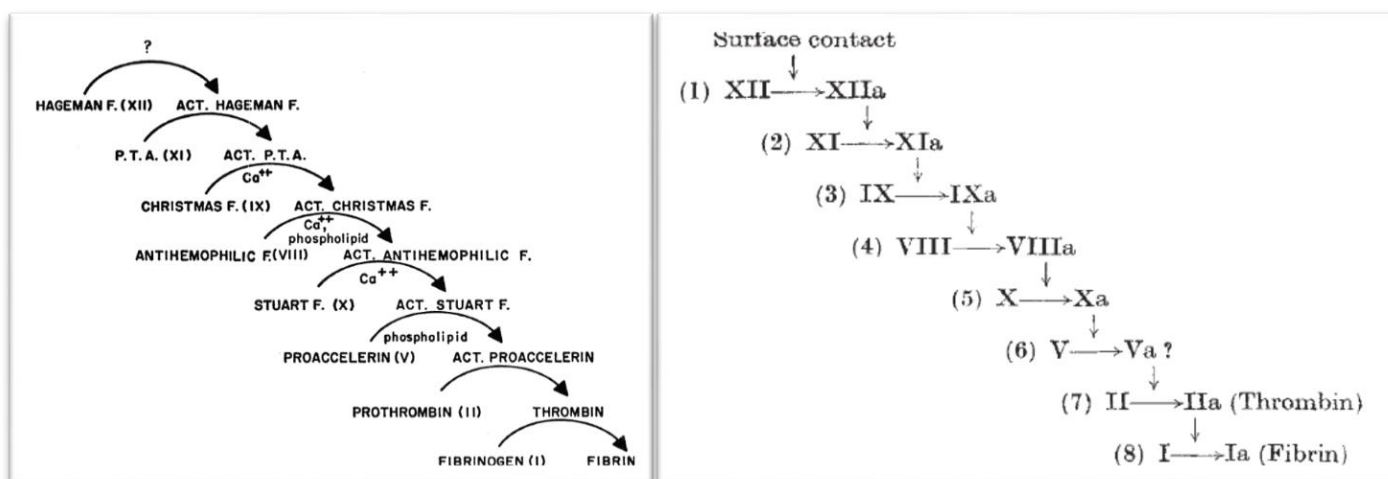
1. Introducció

1.1 De la protrombina a la cascada de la coagulació

La coagulació des de sempre s'ha entès com un procés complex i el coneixement del seu funcionament, fins i tot avui dia, encara té aspectes que resulten enigmàtics. Es van requerir més de 40 anys per a que Seegers (1) i col·laboradors aïllessin protrombina amb puresa i quantitat suficient per poder dur a terme estudis per entendre la seva formació. Nombroses teories van intentar explicar-ho però, no va ser fins trenta anys més tard quan, al 1964, Davie (2) per una banda i MacFarlane (3) per l'altra, van descriure un model d'activació seqüencial de proteïnes anomenant-lo *la cascada de la coagulació*.

El model de la cascada de la coagulació descriu que cada proteïna o factor de la coagulació circula de forma inactiva. Quan s'inicia la coagulació, cada factor (excepte el fibrinogen) és transformat a una forma activa amb capacitat enzimàtica. Cada enzim interacciona amb un substrat específic convertint-lo en un enzim actiu. Aquest model va permetre descriure principalment la via intrínseca, anomenada així per que no requeria de substàncies de fora del torrent circulatori (Figura 1).

Figura. 1. Representació de la via intrínseca segons Davie (1a) i MacFarlane (1b)



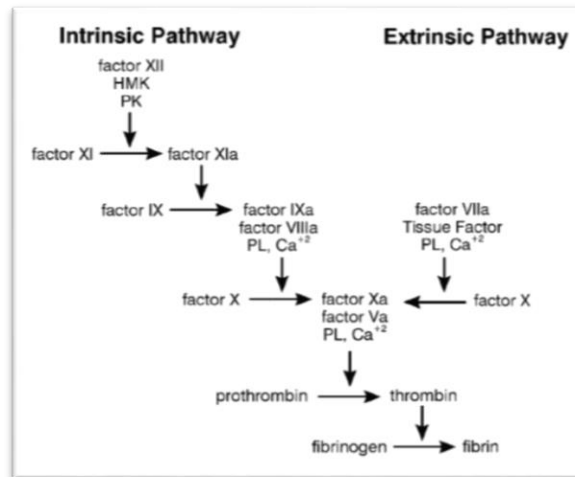
1a.

1b.

Tanmateix, aquest model no permetia explicar tots els aspectes de la coagulació: No quedava clar quin era el mecanisme d'activació de Factor V (FV), quins mecanismes d'inhibició del procés hi havia o quin era el paper del calci i els fosfolípids en la reacció.

La descripció de la cascada va suposar un gran avenç en el coneixement de la coagulació i, a mesura que els coneixements s'ampliaven, també ho feia la seva complexitat fins arribar al model actual, en el que es representa un conjunt de reaccions proteolítiques on cada proteasa activa la següent (4)(Figura 2).

Figura. 2 Model actual de la cascada de la coagulació. Adaptat de Hoffman (4)



Tradicionalment la cascada de la coagulació s'ha dividit en una via intrínseca i una d'extrínseca, fet que ha permès explicar d'una manera gràfica i senzilla la metodologia utilitzada als laboratoris de coagulació. El temps de protrombina (TP) correspon a l'activació de la coagulació a través de la via extrínseca i, el temps de tromboplastina parcial activat (TTPa) a l'activació de la via intrínseca. Tanmateix, no explica tant bé el funcionament de la coagulació *in vivo*. Per exemple, no explica per què l'activació del factor X (FX) de la coagulació mitjançant el factor VII (FVII) no és suficient per compensar la manca de factor VIII (FVIII) o de factor IX (FIX) en individus hemofílics o, per què el dèficit d'alguns factors, com per exemple del factor XII (FXII) no provoca sagnat, mentre que el dèficit de FX, factor V (FV) o FVII sí.

Va ser amb el descobriment del paper dels fosfolípids presents a la membrana plaquetària quan, implícitament, es va parlar del paper de les cèl·lules (en aquest cas les plaquetes) en el procés hemostàtic (5). Concretament, es va descriure el paper de la fosfatidilserina, que proporciona una superfície aniónica òptima per a la unió dels complexos per a que tingui lloc la reacció de la coagulació.

1.2 Un model complex: el model cel·lular

El model descrit per Davie (2) i Macfarlane (3) segueix tenint validesa però enlloc de ser una sèrie seqüencial de reaccions, a cada fase es constitueix un sistema complex format per un enzim, un substrat, un cofactor proteic (en forma activada) i una superfície o receptor que fa de nexa d'unió i permet que les molècules es trobin en una superfície més localitzada que a l'espai tridimensional. Tota aquesta estructura s'anomena complex multicomponent o complexos macromoleculars (6).

Amb el progrés i l'estudi de les vies de la coagulació, també es va observar que les proteïnes de la coagulació no tenien una funció única i unidireccional. Un exemple n'és la trombina, que a més d'activar el fibrinogen és capaç d'activar el FXI a la superfície de les plaquetes activades (7).

El model cel·lular descriu l'hemostàsia en tres fases que es superposen: La iniciació, l'amplificació i la propagació. Durant la iniciació, l'estímul procoagulant ha de ser suficientment fort per a que els factors Xa, IXa i la trombina iniciïn la coagulació. A la següent fase, l'estímul procoagulant s'amplifica i es trasllada a la superfície plaquetària. Les plaquetes s'activen i a la seva superfície s'hi acumulen factors. Finalment a la fase de propagació, les proteases actives es combinen amb els seus cofactors amb l'objectiu de generar suficient trombina per a que polimeritzi la fibrina.

1.2.1 Iniciació

El factor tissular (FT) és una proteïna integral de membrana que es troba en aquelles cèl·lules que la sintetitzen. Sobretot es troba en elevada quantitat en cèl·lules extravasculares, monòcits, en cèl·lules endotelials quan hi ha inflamació i també en micropartícules (MP) derivades de diferents tipus cel·lulars. El FT no és present a totes les cèl·lules, sinó només en aquelles on és necessari, així s'evita que hi hagi una activació inadequada de la coagulació.

Quan es trenca la paret vascular, s'expressa el FT que té una elevada afinitat pel FVII. La seva unió fa que el FVII s'activi (FVIIa), i el complex FT/FVIIa s'encarregarà de l'activació del FX i del FIX. El FX es combinarà amb el FV per donar lloc a petites quantitats de trombina (4,8)

1.2.2 Amplificació

L'exposició dels teixits extravasculars fa que aquestes superfícies entrin en contacte amb les plaquetes i els components plasmàtics, això fa que se situïn al lloc on hi ha una lesió, que serà on hi ha el FT exposat. Les plaquetes, per la seva banda, s'adhereixen a la superfície lesionada gràcies a la trombina generada durant la fase prèvia. La trombina s'uneix a dos receptors: per una banda al seu receptor plaquetari (PAR) provocant que s'alliberi el FV intraplaquetari contingut als grànuls alfa, i a la glicoproteïna Ib/IX augmentat l'afinitat d'aquesta pel factor de Von Willebrand (fvW) que circula unit al FVIII provocant-ne la separació d'aquest. A la fi d'aquesta fase tenim les plaquetes activades amb els cofactors V i VIII a la seva superfície (8,9).

1.2.3 Propagació

En aquesta fase, els complexos Xasa (FVIII-FIX) i protrombinasa (FX-FV) s'adhereixen a la superfície plaquetària. La unió del complex Xasa permet l'activació del FXa que forma un complex amb el seu cofactor per generar la trombina suficient per fer el tap plaquetari. També s'ha vist que les plaquetes expressen llocs d'elevada afinitat pels factors IX(a), X(a) i XI(a) per participar en la coordinació del procés coagulatiu (4).

El model cel·lular proporciona una visió més àmplia dels mecanismes que intervenen en la coagulació projectant les múltiples interaccions entre els elements que intervenen en el procés. En aquest model, les cèl·lules no actuen només com una superfície sinó que tenen un paper actiu. Això fa que les cèl·lules sanguínies siguin objectius on focalitzar la busca de nous fenotips implicats en les malalties de la coagulació.

1. 3 El tromboembolisme venós

El coneixement actual de l'etiopatogènia de la trombosi es basa en la primera descripció realitzada a mitjans del segle XIX per Virchow. Virchow va postular diferents mecanismes que podrien contribuir a la trombosi, però no va ser fins unes dècades després de la seva mort que es va arribar a un consens on es va descriure que les principals causes de trombosi es resumien en canvis en el vas sanguini, el flux i els components de la sang. Aquestes premisses actualment segueixen essent vàlides i en honor seu, s'anomena la tríada de Virchow (10). Els mecanismes que va anticipar Virchow són el resultat de la interacció de factors ambientals i genètics.

La trombofília pot considerar-se un estat latent de la coagulació en que la resistència a la trombosi es troba disminuïda, augmentant la possibilitat de fer trombus arterials i venosos (11). El tromboembolisme venós (TEV) és un trastorn episòdic de caràcter complex i multifactorial que sorgeix degut a la concurrència en un individu d'un o més factors precipitants, no sempre evidents. La interacció entre factors ambientals i genètics influeix en el seu desenvolupament (12).

El TEV inclou dues manifestacions clíniques principals: la trombosi venosa profunda (TVP) i el tromboembolisme pulmonar (TEP). La TVP pot afectar qualsevol localització. Tot i que el més freqüent és l'afectació d'extremitats inferiors, també pot afectar altres territoris com les extremitats superiors (associada o no a l'ús de catèters venosos centrals), territori esplàncnic (venes porta, mesentèriques o esplènica), venes suprahepàtiques (síndrome de Budd-Chiari), vena renal, vena ovàrica o sins venosos cerebrals.

La incidència global de TEV en la població general és de 1-2 casos per 1000 habitants any. Acostuma a ser un patologia associada a l'edat, que afecta normalment a individus de més de 50 anys, amb l'excepció del TEV en dones en el context de tractament hormonal/embaràs o població pediàtrica i oncològica (12).

1.3.1 Diagnòstic del tromboembolisme venós

Els pacients amb TVP solen presentar una clínica poc específica, caracteritzada per dolor i tumefacció de l'extremitat afecta. Les manifestacions clíniques del TEP també solen ser inespecífiques, incloent dispnea (típicament d'inici sobtat), dolor toràcic de característiques pleurítiques, esputs hemoptoics o síncope.

Donada l'escassa especificitat dels signes i símptomes, el TEV sempre s'ha de confirmar mitjançant proves objectives. Actualment les proves de primera elecció per al diagnòstic de TVP de membres inferiors i el TEP són l'ecografia Doppler i l'angiografia per tomografia computeritzada (angio-TC), respectivament. El dímer-D, un marcador de generació de fibrina, junt amb l'aplicació d'escales de probabilitat clínica pretest (la més utilitzada és l'escala de Wells)(13) resulten d'utilitat en els algoritmes diagnòstics per evitar la realització de proves d'imatge innecessàries, donat el seu elevat valor predictiu negatiu (14).

La rendibilitat del Dímer-D és superior en pacients que acudeixen a un servei d'urgències. L'elevada freqüència de nivells elevats de Dímer-D en pacients hospitalitzats, gent gran o amb càncer limita la seva aplicabilitat en aquests escenaris. S'ha suggerit utilitzar diferents punts de tall ajustat per edat, però l'evidència actual disponible en aquest sentit és limitada (15).

1.3.2 Causes de tromboembolisme venós

En condicions normals, davant la ruptura d'un vas sanguini, s'origina un coàgul com a mecanisme defensiu per evitar la pèrdua de sang. Quan aquest procés té lloc fora d'aquest context, és quan ens trobem amb una trombosi patològica.

Amb la tríada de Virchow com a matriu, es poden afegir nous mecanismes que, en absència de traumatisme vascular ocasionen un trombe patològic. Un dels factors de risc a considerar és la hipòxia. A les zones valvulars venoses, la concentració d'oxigen és menor, accentuant-se en aquells casos en que les vàlvules es troben lesionades. La hipòxia, dona lloc a unes condicions proinflamàtores i procoagulants que impliquen diferents agents i mecanismes, entre ells, les proteïnes pro i anticoagulants, la via del FT, la p-selectina, les plaquetes, les MP i l'activació de la immunitat innata (incloent monòcits i granulòcits) i adquirida.

1.3.2.1 Les proteïnes activadores i inhibidores de la coagulació

Com és conegut, els determinants de risc de trombosis millor estudiats són els components de la coagulació plasmàtica tant els factors procoagulants com els inhibidors. Moltes de les variacions quantitatives o qualitatives en la concentració plasmàtica, s'expliquen per anomalies genètiques com el dèficit d'antitrombina, de proteïna C, de proteïna S, la mutació del factor V Leiden i la mutació 20210A del gen de la protrombina o el grup sanguini no O que condiciona els nivells plasmàtics de Factor VIII (FVIII). Tot i que aquestes alteracions o variants genètiques

patofisiològicament poden explicar una tendència a la coagulació, és necessària la interacció amb altres mecanismes relacionats com, l'estil de vida i els factors ambientals, per que en un moment determinat s'alteri l'equilibri entre els factors protrombòtics i els inhibidors.

1.3.2.2 El paper de la immunitat

Com a conseqüència dels processos inflamatoris i infecciosos que tenen lloc a la zona on s'originarà el trombus, es produeix l'activació de la immunitat innata involucrant l'activació de l'endoteli, dels neutròfils i els monòcits. Els neutròfils activats poden alliberar material intranuclear formant xarxes extracel·lulars o *neutrophil extracellular traps* (NETs).

Les NETs són una barrera física inicialment destinada a evitar la disseminació de microorganismes, però també suposen un bastiment molecular sobre el que es desencadenen els processos de coagulació i formació de fibrina. En un article publicat per Van Montfoort (16) es descriu la correlació entre el desenvolupament de les NETs (com a conseqüència de l'activació dels neutròfils) i el risc de TEV. Una forma indirecta d'objectivar l'activació dels neutròfils és mitjançant la mesura dels complexos elastasa/alfa-1-antitripsina i els nivells de nucleosomes circulants. S'ha vist que els nucleosomes no només formen part de les NETs sinó que també es detecten en processos que comporten una destrucció cel·lular, principalment quan impliquen la mort de cèl·lules endotelials. De fet, existeixen dades epidemiològiques que relacionen l'augment de risc de trombosi en el context de malalties infeccioses (17).

1.3.2.3 Les plaquetes

Fins ara s'havia prestat poca atenció al paper de les plaquetes com a agents rellevants en la patogènesi del TEV. Actualment es coneix que les plaquetes activades són catalitzadores importants de l'activació de la trombina (tant a través de la via intrínseca com de la via extrínseca) per a generar trombina i, finalment, formar la xarxa de fibrina (18). També s'han vist involucrats en aquests mecanismes els receptors plaquetaris com la glicoproteïna VI (receptor pel col·lagen) que intervé en els processos d'agregació i adhesió cel·lulars i que posseeix variants genètiques associades al risc de TEV (19).

En recolzament al paper de les plaquetes en l'etiologia del TEV, s'ha de mencionar que els fàrmacs inhibidors de la funció plaquetària, com els antiagregants, disminueixen la incidència de TEV tant primari com recurrent (20). Aquesta afirmació

es recolza en els resultats que van oferir els estudis ASPIRE (21) i WAFASA (22) en els que es van reclutar a pacients que havien patit un TEV profund proximal espontani. L'objectiu primari era avaluar el risc de recurrència de TEV en pacients després d'haver finalitzat el tractament amb fàrmacs antivitamina K. Un grup va rebre dosis baixes d'àcid acetilsalicílic (AAS) mentre que l'altre grup va rebre placebo. Tots dos estudis van demostrar una disminució en el risc de recurrència de TEV i d'esdeveniments vasculars majors (accidents vasculars cerebrals, infarts aguts de miocardi) sense augmentar significativament el risc de sagnat en el grup tractat amb antiagregants.

1.3.2.4 Les micropartícules (MP)

Les MP són vesícules procedents de la superfície cel·lular amb diferents orígens. La majoria (80%) es formen a la superfície de les plaquetes però també en podem trobar procedents de monòcits i de cèl·lules endotelials. Les proteïnes que conformen la seva superfície en reflecteixen la procedència. Entre aquestes proteïnes cal destacar-ne una: el FT. S'ha establert una correlació entre l'expressió de FT a la superfície d'algunes MP i el risc de TEV per la seva activitat procoagulant capaç d'activar la via extrínseca (23).

1.3.3 La trombofília

El 1996 un comitè d'experts de la Organització Mundial de la Salut (OMS) i de la Societat Internacional de Trombosi i Hemostàsia (ISTH) va definir la trombofília hereditària com una tendència genèticament determinada al TEV. Aquesta definició implicava que, tant sols un subgrup selecte de pacients amb TEV devia la seva malaltia a variants genètiques (algunes ja conegudes com els dèficits d'antitrombina, proteïna S o proteïna C o les mutacions del Factor V Leiden o PT20210A i altres, encara per descobrir). Anomalies dominants, en alguns casos, i combinacions de defectes més lleus, entre d'altres, poden provocar TEV a edats joves, recidives freqüents o història familiar de trombosi. Els trets lleus poden ser solament observats mitjançant estudis de laboratori. De fet, encara no es coneixen, ni s'han entès, totes les influències genètiques i les seves interaccions (24). En contraposició, la majoria de casos observats en la clínica diària, són atribuïts a circumstàncies ambientals o adquirides, amb molt poca o nul·la influència genètica.

Pocs anys més tard, es va imposar la noció que qualsevol episodi de trombosi és el resultat de la interacció entre gens i factors ambientals, obligant a entendre la malaltia

tromboembòlica (MTEV) com un tret complex. La base genètica subjacent a aquesta complexitat sembla ser la part més important, explicant entre un 50 i un 60% de la predisposició a la malaltia (25–27). Tanmateix, fins avui, només hem aconseguit detectar una part molt petita (aproximadament un 5%) d'aquesta base genètica o heretabilitat (28).

1.3.3.1 Factors de risc actualment descrits

Els factors de risc prèviament descrits, entre d'altres, són el resultat d'una conjunció de factors causals alguns d'ells presents a l'ambient de l'individu i d'altres, que pertanyen a la seva base genètica. Queda clar que qualsevol TEV es de naturalesa multifactorial, és a dir, resulta de la interacció de múltiples factors ambientals i genètics. La identificació d'aquests factors ens permet entendre, tot i que parcialment, els casos que observem a la clínica diària. Tanmateix, la comprensió de cada cas encara és insuficient per tres motius: per què encara desconeixem la majoria de determinants genètics, per què segurament queden factors ambientals desencadenants a descobrir, i, per què tot i identificar factors de risc, desconeixem com interactuen entre sí, o el pes relatiu de cadascun d'ells en un pacient en concret.

Qualsevol que siguin les variants genètiques de risc de trombosi que un pacient posseeixi, o les circumstàncies ambientals que l'influeixin, mai observem una afectació clínica contínua. Fins i tot en aquells casos més cridaners de trombofilia, en la majoria de pacients, la trombosis passa en episodis separats sovint per períodes asimptomàtics prolongats. Aquesta discontinuïtat suggereix la necessitat de factors desencadenants per a cada episodi, potser estímuls directes, el deteriorament temporal de la resistència intrínseca a la trombosi, o alguna combinació d'aquests. Aquest mode de presentació característic en forma de successos separats en el temps subratlla la importància de la interacció amb l'ambient.

Per explicar qualsevol episodi de TEV disposem actualment d'una relació nombrosa de factors de risc ambiental (Taula 1) i una altra de factors de risc genètic (Taula 2).

Taula 1. Factors adquirits o ambientals associats amb el risc de TEV.

Factor de risc	Risc	Cita	Comentari
Edat >75 anys	2.25-12.60 (HR)	(29)	Segons dècada, comparat amb <45 anys
Sexe masculí	1.60 (RR)	(30)	Només augmenta el risc de recidiva
Raça negra	1.60 (HR)	(29)	Comparat amb raça blanca
Obesitat (IMC>30)	2.33 (OR)	(29,31)	
Tabaquisme	1.06-1.49 (HR)	(32)	Segons la intensitat d'exposició

HTA	1.51 (OR)	(31)	
Diabetis mellitus	1.41 (OR)	(29,31)	
Varices	1.40 (HR)	(32)	
Qualsevol malaltia greu	1.70 (OR)	(33)	Variable entre 1.4-4.9 segons el tipus
ICC	1.30-1.40 (HR)	(32)	Variable segons sexe
IRC	1.60-1.90 (HR)	(32)	Variable segons sexe
Càncer	1.80-2.20 (HR)	(32)	Variable segons sexe
MPOC	1.40-1.60 (HR)	(32)	Variable segons sexe
Malaltia autoimmune	3.90-16.40 (SIR)	(34,35)	Variable segons el tipus
Infeccions	1.74-2.70 (RR)	(34)	Variable segons el tipus
Ingrés en un hospital	1.90 (HR)	(32)	
Fàrmacs antipsicòtics	1.55-1.84 (HR)	(32)	Variable segons sexe
AINEs	2.50 (IRR)	(36)	
Tamoxifè	1.50 (HR)	(32)	
Anticonceptius orals	1.33 (HR)	(32)	
THS	1.20 (HR)	(32)	
Embaràs i puerperi	4.30 (RR)	(37)	
Traumatisme greu	4.80-8.60 (OR)	(38)	Variable segons tipus
Cirurgia general	9.50 (OR)	(39)	
Cirurgia ortopèdica	16.25 (OR)	(39)	
Enllitament	5.60 (OR)	(39)	
Enguixament	36.5 (OR)	(31)	
Viatge >5h, mes previ	2.80 (RR)	(40)	Variable segons duració del viatge
Estació de l'any (hivern)	1.14 (RR)	(41)	
Pol·lució ambiental	1.47 (OR)	(42)	
Consum de cafè	0.70 (OR) /	(43,44)	Factor protector
Alcohol	0.75 (HR)	(34,36)	Factor protector

Taula adaptada de (45)

Taula 2. Factors genètics associats amb el risc de TEV.

Gen o variant genètica	RR	Cita	Comentari
SERPINC1 (Antitrombina)	10	(28)	Més de 130 mutacions privades amb dèficit AT en plasma
AT Cambridge II (Ala384Ser)	10	(46)	Molt difícil de detectar en plasma
SERPINC1 rs2227589	1.30	(28)	
PROC (Proteïna C)	8	(28)	Més de 160 mutacions privades amb dèficit de PC
PROCR (Receptor endotelial) rs867186	1.22	(28)	
PROS1 (Proteïna S)	8	(28)	Més de 200 mutacions privades amb dèficit de PS
F5 rs6025 (FV Leiden)	5	(28)	
F5 rs4524	1.21	(28)	Independent de FVL (no estan en desequilibri de lligament)
F5 Cambridge (Arg306Thr)	-	(47)	Provoca RPCA. El seu risc relatiu es desconeix
F5 Hong-Kong (Arg306Gly)	-	(48)	Provoca RPCA. El seu risc relatiu es desconeix
F2 rs1799963 (PT20210A)	3	(28)	
ABO rs8176719 y rs8176750	2-4	(28)	Correspon amb els portadors B i A1 del grup ABO

VWF rs1063856-C	1.15	(28)	Augmenta els nivells de FvW i el risc de TEV
STAB2 rs4981021	1.29	(28)	
TC2N rs1884841	1.22	(28)	
STXBP5 rs1039084-G	0.78	(28)	Factor protector
FGG rs2066865	1.47	(28)	Aquest SNP disminueix la relació $\gamma A/\gamma'$ y augmenta el risc de TEV
F11 rs2036914 y rs2289252	1.35	(28)	Aquests SNPs modulen els nivells de de F XI en plasma
GP6 rs1613662	1.15	(28)	
HIVEP1 rs169713-C	1.20	(28)	
KNG1 rs710446	1.19	(28)	Modula FXI, escurça el TTPA i augmenta el risc de TEV
F12 rs1801020 (FXII C46T)	5	(49)	El risc s'associa als homozigots T/T
F13A1 rs5985 (FXIII Val34Leu)	0.85	(50)	Factor protector associat al genotip Leu/Leu
SERPINA10 rs2232698	3.30	(51)	SNP al gen inhibidor de proteasa dependent de proteïna Z.
Trombomodulina (THBD) rs1042579	0.72	(52)	Relacionat amb l'augment de l'activitat de la Prot. C

Taula adaptada de (45)

Altres variants genètiques potencialment relacionades amb el risc de TEV (pendents de confirmació):(53) ANX5 haplotip M2 (OR 1.90); APOA4 Gln360His (OR 0.34); BA13 rs9363864 (OR 0.58); CYP4V2 rs13146272 (OR 1.20); SELE (gen de E-selectina) Leu554Phe (OR 0.39); F2 A19911G (OR 1.43 para G/G); F9 rs4149755 (OR 1.50); F10 rs69333 (OR 0.80); FGA rs6050 (OR 1.40) i rs2070006 (OR 1.25); FGB rs1800788 (OR 1.30); IL1RN rs2232354 (OR 3.90); IL4R Ile50Val (OR 0.66); LPL Asn291Ser (OR 3.09); SERPINA 1 (gen del PAI-1) rs2267667 (OR 1.26); KLKB1 rs3087505 (OR 1.27); PROC rs5937 (OR 1.37) y rs2069915 (OR 0.78); PROCR G4678C (OR 0.50); CPB2 (gen del TAFI) rs17844078 (OR 0.52); TFPI rs2192824 (OR 1.25); TNFSF4 -921C/T (OR 1.86). (54): PROC rs1799809 (OR 1.17); PROCR rs2069951 (OR 1.30); F2 rs3136516 (OR 1.19); F5 rs1800595 (OR 1.18); F8 rs1800291 (OR 1.13); NAT8B rs2001490 (OR 1.10); F13B rs6003 (OR 1.09); RGS7 rs670659 (OR 1.09); F9 rs6048 (OR 1.08); F11 rs3822057 (OR 1.06); NR1I2 rs3742264 (OR 1.05); F3 1208indel (OR 1.06). (55): DAB2IP rs7025486 (OR: 1.2), (56): VAMP/8 endobrevin rs101

També s'han identificat múltiples paràmetres de laboratori, tècnicament considerats com "fenotips intermediaris" que s'associen amb el risc de trombosi (Taula 3). Tots aquests fenotips intermediaris també són complexes, és a dir, són el resultat de la interacció entre gens i ambient. La seva vinculació amb la malaltia pot ser utilitzada amb tres propòsits: explicar els casos clínics, formar part de models de predicció de risc trombòtic i per a buscar factors genètics encara desconeguts.

Taula 3. Fenotips sanguinis (intermediaris) associats amb el risc de TEV.

Fenotip intermediari	Risc	Cita	Comentari
Antitrombina	2.0 (OR)	(57)	Associat amb valors <i>borderline</i> baixos
Proteïna C	2.2 (OR)	(57)	Associat amb valors <i>borderline</i> baixos
Proteïna S	1.8 (OR)	(57)	Associat amb valors <i>borderline</i> baixos
Homocisteïna	2.5 (OR)	(25,58)	Associat amb nivells > percentil 95
Factor II	2.1 (OR)	(58)	Associat amb nivells > 115%
Factor VII	2.4 (HR)	(25,59)	Associat amb nivells > percentil 95
Factor VIII	3.7 (OR)	(25,58)	Associat amb nivells > percentil 90
Factor IX	2.5 (OR)	(25,58)	Associat amb nivells > 130%
Factor XI	2.2 (OR)	(25,58)	Associat amb nivells > percentil 90
RPCA	1.7 (OR)	(25,60)	En absència de FVL
Fibrinogen	2.9 (OR)	(61)	Associat amb nivells > percentil 90

Factor vW	4.0 (OR)	(25,58,61)	Associat amb nivells > percentil 90
PCI	1.6 (OR)	(58)	Associat amb nivells > percentil 95
TFPI	1.9 (OR)	(58)	Associat amb nivells < percentil 5
TTPa	2.4 (OR)	(62)	Associat amb valors inferiors a 0.90 (ratio)
Paràmetres dinàmics del TTPa	-	(63)	El seu RR encara no es coneix
t-PA	1.8 (OR)	(25,64)	Associat amb nivells > percentil 75
PAI-1	1.6 (OR)	(64)	Associat amb nivells > percentil 75
TAFI	1.7 (OR)	(58,65)	Associat amb nivells > percentil 90
TLC	2.0 (OR)	(66)	Associat amb nivells > percentil 90
TGT (potencial endogen de trombina)	1.03 (OR)	(67)	Per cada % d'augment
TEM (amplitud màxima)	-	(68)	El seu RR encara no es coneix
Volum plaquetari mig (VPM)	1.30 (HR)	(69)	Associat amb VPM > 9.5 fL
Agregabilitat plaquetària	-	(70)	Associat amb augment. No quantificat el risc
Hematòcrit	1.25 (HR)	(71)	Associat amb cada 5% d'increment
Proteïna Z	2.20 (OR)	(25)	Associat amb descens de nivells
Tiroxina lliure (T4)	2.50 (OR)	(58)	Associat amb nivells > percentil 98
Folat sèric	-	(72)	El seu RR encara no es coneix
Complex-elastasa alfa-1 antitripsina	3 (OR)	(16)	Associat amb nivells > percentil 80
Recompte de monocits	2.8 (OR)	(73)	Xifres superiors a 0.55x10 ⁹ /L
RDW	3 (OR)	(74)	

Taula adaptada de (45)

RPCA: Resistència a la proteïna C activada; PCI: Inhibidor de la proteïna C; TFPI: Inhibidor de la via del factor tissular; TTPa: Temps de tromboplastina parcial activat; t-PA: Activador tissular del plasminogen; PAI-1: Inhibidor dels activadors del plasminogen; TAFI: Inhibidor de la fibrinòlisi activable per trombina; TLC: Temps de lisi del coàgul; TGT: Test de generació de trombina; TEM: Tromboelastometria; RDW: Amplitud de distribució eritrocitària.

1.3.3.2 El futur de la investigació en trombofília

Hi ha dos camps clau que són necessaris per a l'avanç del coneixement en el pronòstic i en la prevenció de la trombosi: completar la base genètica i la generació de models predictius per a definir el risc individual de trombosi.

1. Completar la base genètica: Donat que la constitució genètica dels individus explica entre un 50-60% de la seva predisposició al TEV i les variants genètiques identificades fins a l'actualitat no suposen conjuntament ni un 10% del risc, està clar que una àrea imprescindible d'investigació ha de ser el descobriment de factors genètics encara desconeguts. A la taula 2 es descriuen 20 gens i les seves variants, clarament associats al risc i altres 36 potencialment associats (peu de taula). Sense comptar amb les mutacions privades als gens SERPINC1, PROC i PROS1, causants dels dèficits patològics d'antitrombina, proteïna C i proteïna S, respectivament. Tot en conjunt sumen almenys 25 variants de risc reconegut i altres 36 sense confirmar encara. La majoria d'aquestes 61 variants s'han identificat recentment mitjançant estudis

genòmics d'associació o GWAS. Els GWAS permeten estudiar centenars de milers de variants genètiques i estimar la seva possible associació amb el risc de TEV mitjançant dissenys epidemiològics clàssics que comparen casos amb controls sans. Els marcadors genètics utilitzats per localitzar els gens causals són del tipus *single nucleotide polymorphism* (SNP) amb una freqüència al·lèlica relativament alta (variables comuns).

Tot i les esperances dipositades en aquests estudis, els resultats han estat frustrants. Només han permès identificar variants d'alta freqüència poblacional (presents en més del 5% dels individus) però amb un risc relatiu molt petit, menys de 1.50. D'aquí que l'atenció s'hagi de dirigir cap a variants més rares, com l'antitrombina (AT) Cambridge (46) o la SERPINA10 rs2232698 (51), que suposen uns riscos relatius molt notables per als seus portadors: 10 i 3.3 respectivament. En aquest sentit s'estan postulant altres tipus de dissenys epidemiològics, implicant mides mostrals inferiors però en grups selectes (per exemple, estudis familiars) com a fonts de nous descobriments. I, el que és encara més important, estudis que permetin no només augmentar la nostra llista de factors de risc, sinó també millorar la utilitat i l'aplicabilitat clínica de les troballes a un nivell individual (58).

Sens dubte, els espectaculars avenços en les tècniques de laboratori, com la NGS (Seqüenciació de Nova Generació), serviran per identificar variants rares (o molt rares) responsables de formes familiars. En unir les tècniques de seqüenciació massiva amb els algoritmes apropiats, es multiplica l'habilitat per respondre qüestions sobre l'espectre de mutació d'una malaltia. Un altre camp innovador està relacionat amb l'epigenètica, que és el conjunt de processos químics que modifiquen l'activitat de l'ADN sense alterar la seqüència. La seva influència actual al TEV és pràcticament desconeguda però ha de ser explorada com a candidata a explicar part dels mecanismes genètics. En concret, els processos de metilació / acetilació de l'ADN sobre la transcripció gènica i els efectes dels microARN sobre la síntesi de proteïnes o fenotips intermediaris involucrats (Taula 3), necessiten ser estudiats per dilucidar la seva aportació al risc de la malaltia. En relació amb aquests processos epigenètics, les dades provinents d'anàlisis completes de la transcripció (transcriptòmica) i el coneixement dels elements químics que reflecteixen l'estat metabòlic d'un organisme o metaboloma, haurien de contribuir a omplir les actuals llacunes. Per desentranyar completament l'arquitectura genòmica de la trombosi, en última instància, s'hauran de conèixer també altres formes de variabilitat, a part dels SNPs, com les CNV (variació del nombre de còpies) i les interaccions gen-gen o gen-ambient (28). Aquest progrés

gegant en l'adquisició de dades només tindrà sentit si, en paral·lel, es desenvolupen els mètodes matemàtics i bioinformàtics imprescindibles per analitzar i explotar la descomunal informació obtinguda.

2. Generació de models predictius: Precisament aquests mètodes d'anàlisi i de processament massiu d'informació, també seran imprescindibles en el desenvolupament de models predictius que permetin estimar el risc individual. El perfil de risc individual es pot considerar com un conjunt de variables clíniques i biològiques on l'avaluació combinada i ponderada hauria de permetre estimar de forma quantitativa i objectiva el risc de malaltia en cada individu. Idealment, això permetria assignar a qualsevol individu i en qualsevol moment, el seu nivell de risc de trombosi permetent adoptar les mesures preventives adequades amb gran selectivitat.

En l'actualitat hi ha múltiples models que d'una forma bastant simplista (i amb poca aplicabilitat individual) s'han fet servir en àmbits estancs: en pacients oncològics (72), en models predictius del risc de recidiva (75) en l'embaràs (76), en cirurgia general (77), en cirurgia ortopèdica (78) o en pacients mèdics hospitalitzats (79). Tots ells s'han basat sobretot en factors de risc clínic, molt específics de cada situació i gairebé sense comptar amb la base genètica de l'individu o les dades biològiques que sabem que s'associen al risc de trombosi. En aquest sentit, resulten molt més interessants els esforços per determinar el risc basal d'un individu, si més no amb informació clínica (32). Ha quedat demostrat que la incorporació de dades genètiques millora substancialment la capacitat predictiva d'aquests models (54). A més, també es pot incorporar la informació disponible (que és molta) proporcionada pels fenotips intermediaris, augmentant més el poder dels models. Altres avenços necessaris s'han de produir en els mètodes matemàtics per abordar la quantitat i complexitat de la informació (80).

Per exemple, Eichinger et al, van proposar un algorisme de risc de recurrència en pacients amb trombosi espontània prèvia (81). Hipsley-Cox (32) i Heinemann (82) van desenvolupar un score per predir el risc d'un primer esdeveniment de trombosi en individus asimptomàtics. D'ells, només Heinemann va utilitzar factors genètics (dos, per ser més exactes) per calcular el risc. Posteriorment, de Haan (54), va augmentar el valor predictiu mitjançant l'addició de més variables genètiques descobertes en estudis de GWAS. No obstant això, aquest treball només aconsegueix explotar la informació aportada per cinc variants genètiques, entre les més de trenta variants diferents i associades independentment al risc de trombosi, que inclou en els seus models

matemàtics. Això ens convida a suggerir la necessitat d'utilitzar noves eines matemàtiques per respondre a les preguntes que ens formulem avui dia.

Només cal comprendre que les possibilitats combinatòries dels factors de risc actualment acceptats (Taules 1-3) són immenses, i que el nombre de perfils individuals (compost per les dades genètiques, epigenètiques, ambientals, plasmàtiques i les seves interaccions) que defineixen el risc de cada subjecte, també és enorme. Per a això, cal un bon processament de la informació mitjançant el disseny d'estudis (casos i controls, cohorts prospectives poblacionals) i la utilització de nous models matemàtics com *Multilinear Principal Component Analysis*, *Independent Component Analysis*, *Support Vector Machines*, *Partial Least Squares* o *neural Network Machine Learning Methods*. En el futur hauríem de poder agrupar els múltiples nivells de risc individual en categories clínicament equivalents. Mitjançant aquests progressos, en anys venidors disposaríem d'un model unificat per estimar el risc de trombosi de qualsevol persona i en qualsevol situació clínica.

En els últims anys s'ha progressat en el descobriment de factors de risc de trombosi i en els mecanismes pels quals aquests la produeixen. No obstant això, tot i tenir cada vegada més informació, seguim sense poder explicar una part no menyspreable dels TEV que veiem a la pràctica diària. Això porta a insistir en la recerca d'algorismes que ens permeten fusionar tota la informació per definir el risc individual de patir un esdeveniment de trombosi.

2. ■ Hipòtesi i objectius

2. Hipòtesi i objectius

2.1 Hipòtesis

- En els estudis epidemiològics clàssics (per exemple, estudis de casos i controls) els recomptes d'hematies, els seus índexs i l'haptoglobina s'han relacionat amb la trombosi. Fins i tot, pacients amb desordres hemolítics crònics exhibeixen un estat protrombòtic. També hi ha una controvèrsia sobre la relació entre ferro i trombosis (70,83–90)

Hipòtesi 1: És possible determinar la influència genètica (heretabilitat) d'aquests fenotips eritrocitaris mitjançant l'estudi GAIT-2 i avaluar el rol d'aquests fenotips com a fenotips intermediaris amb el risc de TEV.

- Clàssicament les plaquetes s'han associat a la trombosi arterial. Tanmateix, estudis recents han demostrat que tenen un rol fonamental en els mecanismes de TEV en models animals. Tot i que l'estudi de Framingham no va trobar una associació entre risc de TEV i agregabilitat plaquetària, altres estudis més modestos han suggerit una possible associació (91–97).

Hipòtesi 2: Es possible determinar la relació entre hiperreactivitat plaquetària i risc de TEV mitjançant l'ús de monitors de la funció plaquetària com el PFA-100[®] i Multiplate[™]. L'estudi RETROVE proporciona una població de casos i controls suficient per considerar si hi ha diferències o no.

- L'efecte protrombòtic dels leucòcits es considera secundari a la presència de FT present als monòcits, neutròfils i MP. Els recomptes elevats de leucòcits són un factor predictor de TEV en pacients amb trastorns mieloproliferatius, tanmateix, hi ha poca informació en pacients sense aquestes malalties (98–103).

Hipòtesi 3: L'estudi RETROVE permet estudiar l'associació entre recomptes de leucòcits com a factor de risc de TEV i definir quines poblacions leucocitàries són més susceptibles de generar trombosi, així com establir valors de risc.

- Els neutròfils són els leucòcits més abundants i el seu paper en la trombosi ha resultat més evident arran del descobriment de la seva capacitat per a formar NETs (104–107).

Hipòtesi 4: És possible mitjançant l'estudi RETROVE l'anàlisi de biomarcadors plasmàtics de NETs que reflecteixin la seva formació. Aquests biomarcadors poden tenir un paper com a fenotips intermediaris en l'estudi del risc de TEV.

2.2 Objectius

- Objectiu principal: Obtenir nous fenotips basats en les cèl·lules sanguínies per a determinar el risc de trombosi.
- Objectius secundaris:
 1. Estimar els determinants genètics de fenotips eritrocitaris nous i altres prèviament estudiats en la població del projecte GAIT-2.
 2. Analitzar i estimar el paper dels fenotips de funció plaquetària obtinguts amb l'analitzador PFA-100® com a factor de risc de trombosi en la població del projecte RETROVE.
 3. Analitzar i estimar el risc de TEV associat a l'augment d'alguns recomptes leucocitaris en la població de l'estudi RETROVE.
 4. Analitzar i estimar el risc de TEV associat a biomarcadors de NETs com a fenotips intermediaris, en la població del projecte RETROVE

3. ■ Material i mètodes

3. Material i mètodes

3.1 Projectes d'investigació en trombosi venosa

Els estudis desenvolupats per a l'elaboració d'aquesta tesi s'han fet a partir de mostres de pacients i controls sans de dos estudis desenvolupats a la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

3.1.1 Projecte: *“Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT-2)”*

- Lloc: El projecte GAIT-2 és la continuació del projecte GAIT-1 que es va desenvolupar a Barcelona a la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durant els anys de 2006 a 2010. Tots els procediments van ser revisats pel Comitè d'Ètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i l'estudi es va desenvolupar seguint les guies establertes de la Declaració de Helsinki. Es va sol·licitar el consentiment informat a tots els subjectes adults que el van donar per ells mateixos i pels seus fills menors.
- Objectiu: L'objectiu era determinar les contribucions dels gens, dels factors ambientals específics de cada individu, i els factors ambientals compartits en comú per membres d'una llar a la variació dels fenotips relacionats amb l'hemostàsia.
- Individus inclosos: Es van reclutar un total de 35 famílies amb unes característiques especials per maximitzar el poder de detectar alteracions genètiques: Tenir ≥ 10 individus vius en ≥ 3 generacions. Totes les famílies van ser seleccionades a través d'un individu propòsit amb trombofília idiopàtica.
- Definicions:
 - Trombofília:
 - Esdeveniments trombòtics múltiples (≥ 1 espontanis)
 - Un únic episodi espontani de trombosi en un familiar de primer grau.
 - Aparició de trombosi abans dels 45 anys.
 - Trombofília idiopàtica: Es considerarà idiopàtica un cop descartades totes les causes biològiques conegudes (durant el període de 2006 a 2010) com: Deficiència d'antitrombina, deficiències de proteïna S i C, resistència a la proteïna C activada, deficiència de plasminogen,

mutació del factor V Leiden, disfibrinogenèmia presència d'anticoagulant lúpic i d'anticossos antifosfolípids.

- **Metodologia:** Cada individu inclòs va ser entrevistat per un metge per a determinar:
 - Antecedents patològics
 - Antecedents ginecològics i reproductius
 - Tractament habitual (incloent la presa d'anticonceptius orals)
 - Història de tabaquisme
 - Antecedents de diabetis o malaltia lipídica
 - Episodis previs de trombosi venosa o arterial: Edat en què es van produir i si hi havia una causa que l'hagués pogut provocar.
 - Lloc de residència de cada subjecte amb l'objectiu de poder avaluar les influències ambientals compartides (com ara la dieta) comuns dins dels membres d'una llar.
- **Característiques de la mostra:** Es van reclutar un total de 935 individus. L'edat dels subjectes va oscil·lar entre 2,6 anys i 101 anys (desviació estàndard (DE) 21,4), amb una mitjana de 39,5 anys al moment de la inclusió. Aproximadament hi havia el mateix nombre de homes (465, 49,7%) que de dones (470, 50,3%).

La profunditat i complexitat d'aquests genealogies s'il·lustra pel nombre de parelles relatives que conté la taula 4.

Taula 4. Relacions entre els individus inclosos a l'estudi GAIT-2.

Número de relacions	Coefficient de parentiu x2	Relació
935	1	El propi individu
1001	0,5	Pare-fill
597	0,5	Germans
467	0,25	Avi/a- Net/a
7	0,25	Germanastres
1248	0,25	Oncle-nebot
1807	0,125	Tercer grau
1697	0,0625	Quart grau
1296	0,03125	Cinquè grau
349	0,015625	Sisè grau
177	0,0078125	Setè grau
7116	0	No relacionats

- Moment de l'estudi: Tant als individus propòsit com a qualsevol familiar se'ls hi practicava l'estudi almenys sis mesos després de l'episodi trombòtic.

3.1.2 Projecte: “Riesgo de Enfermedad Tromboembólica Venosa (RETROVE)”

- Lloc: El reclutament es va dur a terme entre els anys 2012 i 2016 a la Unitat de Trombosi i Hemostàsia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Tots els procediments van ser revisats pel Comitè d'Ètica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i l'estudi es desenvolupa seguint les guies establertes de la Declaració de Helsinki. Es va sol·licitar el consentiment informat a tots els subjectes candidats a incloure's a l'estudi.
- Objectius: L'objectiu principal és identificar biomarcadors de TEV per poder confeccionar un algorisme matemàtic que permeti predir el risc de TEV.
- Definicions:
 - Diagnòstic de trombosi: El diagnòstic de trombosi es va realitzar mitjançant tècniques d'imatge: Ultrasonografia, tomografia, ressonància magnètica, arteriografia, flebografia i gammagrafia pulmonar.
 - TEV espontani o no provocat: Es va incloure en aquest grup tots aquells casos en els que no es va enregistrar cap factor causant de trombosi en els darrers tres mesos previs a l'esdeveniment trombòtic
 - TEV no espontani o provocat: Quan es va identificar un o més factors causants de trombosi durant els tres mesos previs a l'esdeveniment trombòtic. Els factors causants que es van recollir van ser: Cirurgies prèvies, immobilització i antecedents d'embaràs o puerperi. Es van recollir altres comorbiditats que podrien influir en el desenvolupament d'una trombosi.
- Característiques de la mostra: El projecte RETROVE és un estudi prospectiu de casos i controls en el que es van incloure consecutivament 400 individus adults (majors de 18 anys) amb TEV i 400 voluntaris sans (no relacionats amb els casos) com a controls. Les característiques clíniques dels casos i els controls es recullen a la taula 5.

Taula 5. Característiques clíniques dels casos i controls inclosos dins el projecte RETROVE.

Característica	Casos		Controls	
	Homes	Dones	Homes	Dones
Sexe (n)	196	204	194	206
Edat (anys) (Mitja $\pm$ DE)	61,5 $\pm$ 16,9	66,2 $\pm$ 20	47,6 $\pm$ 17,7	50,5 $\pm$ 18,7
IMC (kg·m ⁻²) (Mitja $\pm$ DE)	28 $\pm$ 4,1	28,3 $\pm$ 6,1	26 $\pm$ 25,4	24,4 $\pm$ 4,1
Tabaquisme (n, %)	37 (18,9)	18 (8,8)	40 (20,6)	35 (17)
Consum d'alcohol (n, %)	119 (60,7)	76 (34,3)	130 (67)	98 (47,6)
Hipertensió (n, %)	83 (42,3)	94 (46,1)	35 (18)	40 (19,4)
Dislipidèmia (n, %)	62 (31,6)	75 (36,8)	36 (18,6)	43 (20,9)
Estatines (n, %)	46 (23,5)	60 (29,4)	18 (9,3)	32 (15,5)
Diabetis mellitus (n,%)	23 (11,7)	17 (8,3)	10 (5,2)	10 (4,9)
Malalties autoimmunes (n, %)	20 (10,2)	21 (10,3)	14 (7,2)	18 (8,7)
Ictus hemorràgic (n, %)	0 (0)	2 (1)	1 (5)	0 (0)
Antecedents de trombosi arterial (n, %)	14 (7,1)	15 (7,4)	1 (5)	1 (5)
AINES (n, %)	29 (14,8)	58 (28,4)	23 (11,9)	34 (16,5)
Antiagregants plaquetaris (n, %)	24 (12,2)	18 (8,8)	2 (1)	5 (2,4)

Com que l'objectiu era establir un algorisme matemàtic que ponderés també el paper de l'edat i sexe, la cohort de controls no té la mateixa distribució en edat i sexe que la cohort de casos. Per tal d'obtenir una imatge més fidedigna de l'estructura poblacional es van reclutar seguint la distribució per edat i sexe de la població espanyola segons el cens de 2001.

Es va incloure qualsevol tipus de trombosi venosa excepte aquelles secundaries a un procés oncològic. Dels 400 individus amb trombosi, 315 havien presentat una trombosi única (la d'inclusió a l'estudi) i 85 més d'una (70 individus dues trombosis, 12 individus 3 trombosis i 3 individus 4 trombosis). Les característiques de les trombosis incloses estan descrites a la taula 6.

Taula 6. Descripció dels 400 episodis trombòtics inclosos dins l'estudi RETROVE

Característiques	Espontanis			No-espontanis		
	Homes	Dones	Total	Homes	Dones	Total
TVP única (n, %)	82 (56,2)	63 (49,6)	145 (53,1)	27 (54)	38 (49,4)	65 (51,2)
TVP + TEP	30 (20,6)	19 (15)	49 (18)	10 (20)	11 (14,3)	21 (16,5)
TEP	31 (21,2)	42 (33,1)	73 (26,7)	12 (24)	26 (33,8)	38 (29,9)
Trombosi visceral	2 (1,4)	-	2 (0,7)	1 (2)	-	1 (0,8)
Trombosi si venós	1 (0,7)	3 (2,4)	4 (1,5)	-	2 (2,6)	2 (1,6)
Total	146 (36,5)	127 (31,8)	273 (68,3)	50 (12,5)	77 (19,3)	127 (31,8)

TVP (Trombosi venosa profunda), TEP (Tromboembolisme pulmonar)

- Moment de l'estudi: Les mostres de sang, en el cas dels casos, es van obtenir almenys sis mesos després de l'esdeveniment trombòtic per tal de minimitzar a influència de la fase aguda. Cap dels participants (ni casos ni controls) havia rebut tractament amb antivitamínics K els 21 dies previs o amb anticoagulants directes els 3 dies abans de l'estudi, heparina de baix pes les 36 hores prèvies o tractament antiagregant o AINES la setmana abans de l'extracció. Les mostres es van obtenir de la vena antecubital entre les 9:00 am i les 12:00 pm en condicions basals i després d'un dejuni d'almenys 12 hores.

3.2 Anàlisi estadística

Donat que les característiques de les dues mostres són diferents (projecte GAIT-2, famílies i projecte RETROVE, casos i controls) l'anàlisi estadística utilitzada per cada grup de pacients també ho ha estat.

3.2.1 Anàlisi estadística del projecte GAIT-2

En l'estudi de les malalties complexes i prevalents (prevalença superior al 10%), s'obtenen els millors resultats mitjançant l'anàlisi de components de variància en arbres genealògics ampliat. El primer pas d'aquesta anàlisi és determinar les contribucions relatives dels gens (heretabilitat), dels factors ambientals o covariables (que són específics d'un individu com l'edat, el sexe o el tabac) i els factors ambientals que els membres comparteixen en una llar (generalment se suposa que l'efecte principal de la llar que contribueix a la variabilitat fenotípica és la dieta). Tots ells contribueixen a la variabilitat d'aquest fenotip complex.

La complexitat del fenotip (y) per cada individu (i) es modelitza mitjançant una funció lineal com la següent:

$$y_i = \mu + \sum \beta_j x_{ij} + g_i + c_i + e_i$$

On μ és la mitjana de la població, x_{ij} és la covariable, i β_j és el seu coeficient de regressió. La resta variables de la fórmula anterior, g_i , c_i , i e_i , representen les desviacions aleatòries de μ per a individus i que són atribuïbles als efectes genètics additius, a la llar (entorn comú) i als errors residuals, respectivament. El component d'error residual inclou un error aleatori real, un error de mesura i qualsevol component genètic no additiu.

Se suposa que els efectes de g_i , c_i i e_i no estan correlacionats entre ells i normalment distribuïts amb una mitjana de zero identificant així les seves variàncies: σ_g^2 , σ_c^2 i σ_e^2 . Sota aquesta hipòtesi, la variància del fenotip (σ_y^2) resulta de la suma d'aquests tres components:

$$\sigma_y^2 = \sigma_g^2 + \sigma_c^2 + \sigma_e^2$$

Finalment, l'heretabilitat (h^2) del fenotip és la proporció de la variabilitat fenotípica total atribuïble als efectes genètics: $h^2 = \sigma_g^2 / \sigma_y^2$ i l'efecte de la llar (c^2) és la proporció de la variabilitat total a causa dels efectes compartits de les llars: $c^2 = \sigma_c^2 / \sigma_y^2$.

Les covariables de trets específics utilitzades en els models de components de variància eren: l'edat, el sexe, l'activitat física, el tractament amb anticonceptius orals i el tabac. El coeficient de regressió per a la variable continua, com l'edat, representa l'efecte associat a la desviació d'un any a partir de l'edat mitjana. Els coeficients de regressió per a covariables discretes (sexe, activitat física o tractament amb anticonceptius orals) representen l'efecte de la covariable en comparació amb la seva absència.

El TEV és un tret binari, és a dir, o hi és present o no hi és. Tanmateix, per a l'anàlisi estadística, el TEV s'ha considerat com una variable continua transformada en un model lineal per a identificar la susceptibilitat a patir-lo o no .

En estudiar aquests trets en famílies, es va poder estimar la correlació tant genètica (ρ_g) com l'ambiental (ρ_e). La correlació fenotípica (ρ_p) es va derivar d'aquestes dues correlacions i de les heretabilitats dels trets de la següent manera:

$$\rho_p = \sqrt{h^2_1 h^2_2} \rho_g + \sqrt{(1-h^2_1)(1-h^2_2)} \rho_e$$

On h^2_1 i h^2_2 són les heretabilitats pel tret 1 i pel tret 2.

Totes les anàlisis estadístiques es van realitzar el paquet *Sequential Oligogenic Linkage Analysis Routines* (SOLAR, versió oficial 6.6.2). SOLAR utilitza la probabilitat més pròxima per a models de components de la variància utilitzant el test de probabilitat de *ratio* estàndard (LRT) per poder avaluar la significació estadística dels diferents paràmetres del model. Es van considerar estadísticament significatius els valors de p inferiors a 0,05. En el nostre estudi, les covariables recollides amb més susceptibilitat per a la malaltia TEV van ser l'edat, el sexe, el tabaquisme i l'ús de mètodes anticonceptius. Tots aquests paràmetres es van transformar matemàticament per a que seguissin una distribució normal.

3.2.2 Anàlisi estadística del projecte RETROVE

El projecte RETROVE és un estudi de casos i controls. L'objectiu d'aquest estudi és identificar biomarcadors de risc trombòtic i per tant, l'anàlisi estadística és completament diferent al descrit prèviament. Les principals eines estadístiques utilitzades es descriuen a continuació:

- Per a comparar parelles de variables categòriques s'ha utilitzat la *chi* quadrat.
- El test no paramètric *U-Mann Whitney* s'ha utilitzat per avaluar les diferències entre dos valors independents tant de variables ordinals com continues.

- L'anàlisi de regressió logística s'ha utilitzat per a modelar la probabilitat de TEV segons els diferents biomarcadors analitzats. Com que patir un TEV és una variable dicotòmica, també s'ha utilitzat el model de regressió logística binari per a buscar relacions de causalitat entre els paràmetres analitzats i el risc trombòtic.
- El coeficient de correlació de Spearman s'ha utilitzat per a mesurar l'associació entre dues variables independents. El rang va de -1 a 1 on 0 és no correlació.
- El valors de p inferiors a 0,05 s'han considerat estadísticament significatius.

Totes les anàlisis estadístiques s'han realitzat mitjançant el programa SPSS (IBM Corporation North Castle Drive, Armonk, NY).

3.3 Metodologia de laboratori

3.3.1. Estudi de la sèrie vermella i la sèrie leucocitària

La mostra utilitzada per a la determinació dels recomptes eritrocitaris i leucocitaris és 5mL de sang total obtinguda per punció directa de la vena antecubital i conservada amb tubs Vacutainer (Becton Dickinson, New Jersey, USA) que contenen EDTA (40µL de K3-EDTA, 0,37mol/L per tub) com a anticoagulant. Les mostres es van processar durant les dues hores posteriors a l'extracció.

Pel que fa a l'obtenció dels recomptes d'hematies, leucòcits i plaquetes s'han utilitzat analitzadors hematològics automàtics Sysmex® (Roche Diagnostics International, Basilea Suïssa) amb els que s'obté d'una forma ràpida i senzilla no només aquests paràmetres, sinó altres com els índexs reticulocitaris i plaquetaris (108).

Aquests analitzadors automàtics segueixen els principis d'impedància i de dispersió òptica (Sysmex XE-2100®) i de citometria de flux fluorescent i d'enfoc hidrodinàmic (Sysmex XE-5000®).

El principi d'impedància descrit per Wallace Coulter (1913-1998) l'any 1956 consisteix en el pas de cèl·lules suspeses en un líquid conductor a través d'una corrent elèctrica constant. L'augment transitori de la impedància serà proporcional al volum de la cèl·lula que la travessa. Per altra banda, la dispersió òptica es basa en la difracció de la trajectòria d'un raig làser que incideix sobre la cèl·lula. L'anàlisi de la llum difractada permet estimar el volum i la complexitat interna de la cèl·lula (109).

La citometria de flux per fluorescència consisteix en la lectura de la superfície cel·lular mitjançant diferents fluorocroms que permetran mesurar i diferenciar els diferents tipus de cèl·lules en mostres de sang total i fluids corporals. Les tecnologies de fluorescència i d'enfoc hidrodinàmic permeten diferenciar de forma consistent totes les poblacions normals de leucòcits, eritròcits i plaquetes de les anormals, per tant disminuint el número d'intervencions manuals (110).

El recomptes eritrocitaris obtinguts mitjançant l'analitzador Sysmex XE-5000® són: Hemoglobina (g/L), el recompte total d'hematies ($10^{12}/L$), l'hematòcrit (L/L), el volum corpuscular mig (VCM, fl), l'hemoglobina corpuscular mitja (HCM, pg), la concentració d'hemoglobina corpuscular mitja (CHCM, g/L), l'amplitud de distribució eritrocitària

(RDW, %), el percentatge de reticulòcits (%), les diferents fraccions de fluorescència dels reticulòcits: baixa, mitja i elevada (LFR, MFR, HFR, %), l'índex de fluorescència reticulocitària (IRF, %) i el recompte plaquetari ($10^9/L$).

Els recomptes leucocitaris obtinguts mitjançant l'analitzador Sysmex XE-2100[®] són: Recompte total de leucòcits ($10^9/L$) i xifres totals i absolutes de monòcits, limfòcits, eosinòfils, neutròfils i basòfils (totes elles amb % i $10^9/L$, respectivament).

3.3.2 Estudi del funcionalisme fèrric

Per a la mesura dels nivells de ferro sèric ($\mu g/L$), la capacitat total d'unió del ferro ($\mu mol/L$), la ferritina sèrica ($\mu g/L$), el receptor soluble de la transferrina (mg/L) i l'haptoglobina (g/L) s'han utilitzat mètodes automàtics ja comercialitzats, concretament, el mòdul de laboratori Elecsys[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya). Elecsys[®] és un analitzador utilitzat principalment per a l'estudi de tècniques de bioquímica i immunoassaig que pot estar format per diferents mòduls analítics (111).

3.3.3 Estudi del funcionalisme plaquetari

Per a l'estudi del funcionalisme plaquetari mitjançant l'aparell PFA-100[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanya), s'ha utilitzat 4,5 mL de sang total obtinguda per punció directa de la vena antecubital conservada amb tubs Vacutainer (Becton Dickinson, New Jersey, USA) que contenen una solució del 3,8% de citrat sòdic com a anticoagulant. Per als estudis d'agregometria l'anticoagulant utilitzat ha estat l'hirudina (Roche Diagnostics GmGH, Mannheim, Alemanya). En ambdós casos, les mostres es van processar entre 15 i 60 minuts després de la seva extracció.

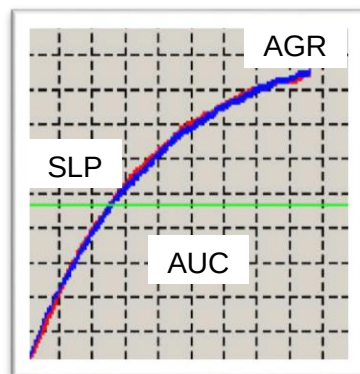
Per a la determinació del funcionalisme plaquetari el dispositiu utilitzat ha estat el PFA-100[®] que simula el flux sanguini d'un vas sota condicions fisiològiques. L'aparell conté una membrana recoberta de col·lagen i un altre inductor plaquetari que pot ser o bé l'ADP o bé l'epinefrina. Aquesta membrana té un forat a través de qual la sang total citratada circula. Davant la presència d'aquests agonistes i les condicions d'alt flux, es promou l'activació, adhesió i agregació plaquetària que acabarà finalment formant un coàgul estable que tancarà el forat. El temps que tarda en obturar-se el forat és el temps d'oclusió i és inversament proporcional a la capacitat funcional de les plaquetes (112).

Per a fer l'anàlisi, la sang total citratada és transferida a un reservori dels cartutxos que s'insereixen a l'instrument i que contenen un dels dos inductors (ADP o epinefrina). Al nostre centre, els valors de normalitat pel PFA-100® s'han obtingut prèviament a partir de 80 mostres de controls sans. El rang de referència per al temps d'oclusió amb ADP és de 58 a 123 segons i per epinefrina de 72 a 191 segons.

Per a la determinació de l'agregació plaquetària, s'ha utilitzat el dispositiu Multiplate™ (Roche Diagnostics International Ltd., Rotkreuz, Suïssa) que és un agregòmetre que es basa en el principi d'impedància i permet la mesura amb sang total. El seu funcionament es basa en que, un cop dipositada la sang a la cubeta on es farà el test, aquesta s'escalfa a 37°C. Això permet que les plaquetes en presència de diferents agonistes, s'adhereixin a dos elèctrodes de platí provocant un increment de la resistència elèctrica entre tots dos. El canvi de la resistència o impedància és enregistrat de forma continua i és proporcional a la quantitat de plaquetes adherides als elèctrodes (113,114).

L'aparell Multiplate™ enregistra una corba d'agregació on es poden distingir diferents paràmetres: L'àrea sota la corba (AUC), l'agregació màxima (AGR) i la pendent màxima de la corba (SLP) (Figura 3). S'han utilitzat dues concentracions diferents de l'agonista ADP per a realitzar el test: 0,25µM i 0,5µM. Es considera una agregació dins la normalitat si quan s'utilitza la concentració màxima d'ADP (0,5µM) s'obté una agregació superior al 80%.

Figura. 3. Exemple de corba obtinguda amb l'aparell Multiplate™ (imatge del propi centre)



3.3.4 Estudi dels marcadors plasmàtics de les trapes de neutròfils (NETs)

Els marcadors plasmàtics de trapes de neutròfils s'han analitzat a partir de mostres de plasma pobre en plaquetes (PPP) emmagatzemades a -80°C fins al moment del seu processament. S'han utilitzat kits ELISA comercialitzats per a la determinació dels marcadors plasmàtics.

- Per a la quantificació de l'ADN lliure (cfDNA) s'ha utilitzat el kit Quant it picogreen dsDNA kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les concentracions d'ADN s'han calculat basades en una corba de calibració estàndard amb concentracions conegudes d'ADN (Novagen)
- La histona H3 citrulinada (H3cit) s'ha quantificat mitjançant el kit EpiQuik circulating Histone H3 ELISA kit (EpiGentek, Farmingale, NY).
- Per a la determinació de la mieloperoxidasa plasmàtica (MPO) el kit utilitzat ha estat: ELISA kit for MPO Homo Sapiens (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- I finalment la quantificació de la neutròfil elastasa (NE) s'ha realitzat mitjançant el kit: Human NE/ELA2 (Elabscience, Houston, Texas, USA).

3.3.5 Estudi d'altres paràmetres plasmàtics

Per tal de correlacionar els resultats obtinguts amb els mètodes principals i donar una explicació biològica, també s'han analitzat altres paràmetres plasmàtics. Tots ells s'han determinat a partir de plasma pobre en plaquetes (PPP) obtingut per centrifugació a 2000g durant 20 minuts.

A la taula 7 es descriu d'una manera abreviada el paràmetre analitzat, el tipus de mostra processada i el dispositiu utilitzat per a fer-ho.

Taula 7. Resum de les determinacions plasmàtiques realitzades en la investigació

Paràmetre analitzat	Tipus de mostra	Reactiu utilitzat
FVIII coagulatiu (%)	PPP processat immediatament després de l'extracció	STA-Def FVIII (Stago, Asnières Sur Seine, France)
FXII coagulatiu (%)	PPP congelat a -20°C fins al moment del processament	STA-Immunodef XII (Stago, Asnières Sur Seine, France)
Fibrinogen coagulatiu (mètode de Clauss) (g/L)	PPP processat immediatament després de l'extracció	STA-liquid fib (Stago, Asnières Sur Seine, France)

Dímer –D (ng/mL)	PPP processat immediatament després de l'extracció	D-Dimer HS500 (Werfen Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA)
Factor de von Willebrand antigènic (%)	PPP congelat a -20°C fins al moment del processament	Von Willebrand Factor activity HemosIL (Werfen Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA)
Cofactor de la ristocetina (%)	PPP congelat a -20°C fins al moment del processament	Factor Ristocetin Cofactor activity (Werfen Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA)
Generació de trombina: Temps de latència (Lag time, min), Pic de trombina (nM), potencial endogen de trombina (nM·min) i temps fins al pic (min).	PPP congelat a -20°C fins al moment del processament	Calibrador de trombina, substrat fluorogènic i Flu-Ca-Kit (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands)

3.3.6 Anàlisi genètica

Per a l'estudi del genotip del grup sanguini, l'ADN s'ha extret de leucòcits de sang perifèrica seguint el protocol estàndard del nostre centre:

Les cèl·lules nucleades obtingudes a partir de sang anticoagulada (EDTA) es resuspenen en tubs de centrifugació de polipropilè de 15 ml amb 3 ml de tampó de lisi del nucli (Tris-HCl 10 mM, 400m NaCl i 2mM Na² EDTA, pH 8,2). Els lisats cel·lulars es digereixen durant la nit a 37°C amb 0,2 ml de SDS al 10% i 0,5 ml d'una solució de proteasa K (1 mg de proteasa K en SDS al 1% i 2 mM Na² EDTA). Després de la digestió, s'afegeix 1 ml de NaCl saturat (aproximadament 6 M) a cada tub i s'agita vigorosament durant 15 segons, seguit d'una centrifugació a 2500 rpm durant 15 minuts. El sobrenedant que conté l'ADN es transfereix a un altre tub de polipropilè de 15 ml.

El genotip del grup ABO s'ha realitzar per PCR convencional amb posterior digestió enzimàtica (115).

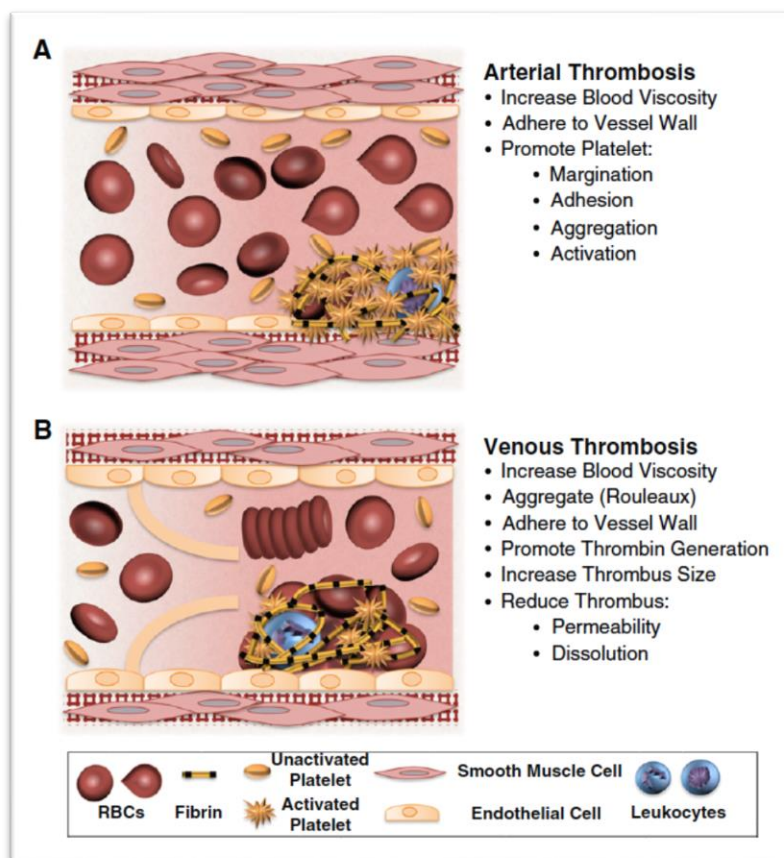
4. ■ Estat actual del tema

4. Estat actual del tema

4.1 Fenotips eritrocitaris i susceptibilitat genètica a la trombosi venosa

Les variables relacionades amb la sèrie vermella com els recomptes d'hematies, els índexs eritrocitaris, l'haptoglobina i els paràmetres del metabolisme fèrric són candidats per a ser fenotips intermediaris per a establir el risc de TVE. No hi ha fenotips trombòtics associats a la sèrie vermella però sí que s'ha observat que les anomalies quantitatives i qualitatives dels hematies s'han associat a un increment del risc de trombosi arterial i venosa. Tot i que s'han postulat nombrosos mecanismes (Figura 4), encara només són un fonament teòric (116)

Figura. 4. Contribucions potencials dels hematies normals i patològics a la trombosi arterial i venosa. Figura extreta de (116)



S'han postulat diferents factors i mecanismes que contribuïrien al desenvolupament de la trombosi, ara bé, són difícils d'interpretar perquè les anomalies als hematies poden també aparèixer en altres contextos. A continuació se'n detallen els més destacats:

1. L'hematòcrit: Pocs estudis han examinat l'associació entre hematòcrit i TEV. L'estudi més gran ha evidenciat que els pacients amb un hematòcrit elevat tenen 1,5 cops més de risc de trombosi no espontània, sobretot en els homes (70). En canvi, un altre estudi, evidencià que el risc més elevat era en dones i en relació al risc de recurrència (117). El fet de trobar resultat discordants entre dues poblacions diferents de pacients fa pensar que existeixen diferents mecanismes pel que fa a la primera trombosi o bé en el risc de recurrència.

Altres circumstàncies que s'associen a nivells més elevats d'hematòcrit, com el tractament amb eritropoetina (118) o bé síndromes mieloproliferatius tipus policitemia vera (119) també comporten major risc trombòtic. Tot i així, en aquest grup de pacients, el mecanisme és controvertit doncs també associen nivells elevats d'altres paràmetres associats a trombosi, com són els leucòcits.

2. El funcionament anormal dels hematies: Aquelles malalties que afecten la mida, la forma o les propietats viscoelàstiques dels hematies també incrementen el risc de trombosi. Un exemple n'és l'anèmia de cèl·lules falciformes que associa un major risc de patir ictus en edats joves (120) o de TEP (121,122). En aquests casos, el TEP es genera als mateixos vasos pulmonars a diferència de la resta que sol ser per un mecanisme embolic.

Els tractaments associats també poden influir, per exemple, després de l'esplenectomia (en casos de talassèmia o esferocitosi) el risc de trombosi venosa s'incrementa entre 3,3 i 7,2 cops donat que disminueix l'aclariment dels hematies patològics (123,124).

Es desconeix si la RDW és un factor de risc independent de trombosi o es degut a una altra comorbiditat que incrementa la variabilitat dels hematies i en promou la trombosi (125). Per exemple, si que s'ha observat que després de transfusions d'hematies, augmenta el RDW incrementant també el risc de trombosi arterial i venosa en pacients post-cirurgia i hospitalitzats (126,127).

3. La viscositat sanguínia: Ja és conegut que l'increment de la viscositat sanguínia és un factor de risc de trombosi (128) i aquesta ve donada sobretot pels hematies (128–130) doncs en són les cèl·lules més abundants.

Viscositat i hematòcrit van de la mà: L'increment de la viscositat és paral·lel a l'increment de l'hematòcrit fet que explicaria que, petits increments d'hematòcrit, siguin els responsables d'un major risc de malaltia vascular coronària (131).

A nivell venós, la velocitat del flux és menor, aquest fet, junt amb la morfologia de l'eritròcit, permet una sèrie d'interaccions electrostàtiques que promouen l'agregació dels hematies (disposició en "rouleaux") i l'increment de la viscositat (132,133).

4. Efectes sobre el vas sanguini: Els hematies es poden adherir directament a l'endoteli o al subendoteli mitjançant interaccions amb altres proteïnes sanguínies o cèl·lules com són els neutròfils i les plaquetes (134,135). Nombrosos receptors (integrina $\alpha_4\beta_1$, CD36, fosfatidilserina, etc) i lligands (integrines β_3 , trombospondina, laminina, fibronectina o fibrinogen) s'han vist implicats en l'adhesió i contribueixen a l'oclusió venosa (136–139).

Altres mecanismes que poden afectar la funcionalitat de l'endoteli es troben per exemple en les anèmies. A l'anèmia hemolítica, l'hemoglobina lliure disminueix la quantitat d'òxid nítric lliure, disminuint la capacitat de vasodilatació promovent així el contacte amb la paret del vas. La hipòxia, també provoca canvis en l'expressió gènica donant lloc a un fenotip endotelial diferent i major risc trombòtic (140).

5. La generació de trombina: Els hematies o les MP que se'n deriven poden expressar a la seva superfície fosfatidilserina fet que pot comportar l'activació de la via de contacte (141). Aquest fet però, només s'ha pogut demostrar *in vitro* i el seu paper *in vivo* encara resulta desconegut (142,143).
6. El fibrinogen i la fibrina: Abans ja s'ha esmentat la capacitat que tenen els hematies d'unir-se al fibrinogen i participar en l'increment de la sedimentació eritrocitària i la viscositat sanguínia (129,130). Aquesta unió també permet el reclutament d'hematies al trombus, i, s'ha vist que no només contribueixen a definir la mida del trombus sinó que a més tenen mecanismes per inhibir la fibrinòlisi: Disminueixen la permeabilitat del trombus per canvis en la forma dels hematies (144) i inhibeixen l'activació de la plasmina (145,146).

4.2 Funció plaquetària i susceptibilitat a la trombosi venosa

Quan es forma un trombus a la circulació venosa, l'endoteli venós inicialment s'activa degut a processos inflamatoris que conduiran a l'expressió de selectines (147) a la seva superfície i a la secreció de factor de vW (148). Aquesta activació endotelial propicia la unió de plaquetes i leucòcits.

Per una banda, els leucòcits s'activen gràcies a l'expressió del FT que també activa la coagulació plasmàtica. El flux lent de la circulació venosa, propicia unes condicions d'hipòxia que promouen l'expressió endotelial de molècules d'adhesió i per tant la unió dels leucòcits (147). Els mecanismes que impliquen el flux són complexos i alguns grups, com per exemple el de Mehrabadi (149) ho ha intentat estudiar mitjançant el dispositiu PFA-100[®]. Mitjançant aquest dispositiu, han desenvolupat un model de formació de trombus a alt flux per predir el creixement del trombus segons els temps d'obturació (TO).

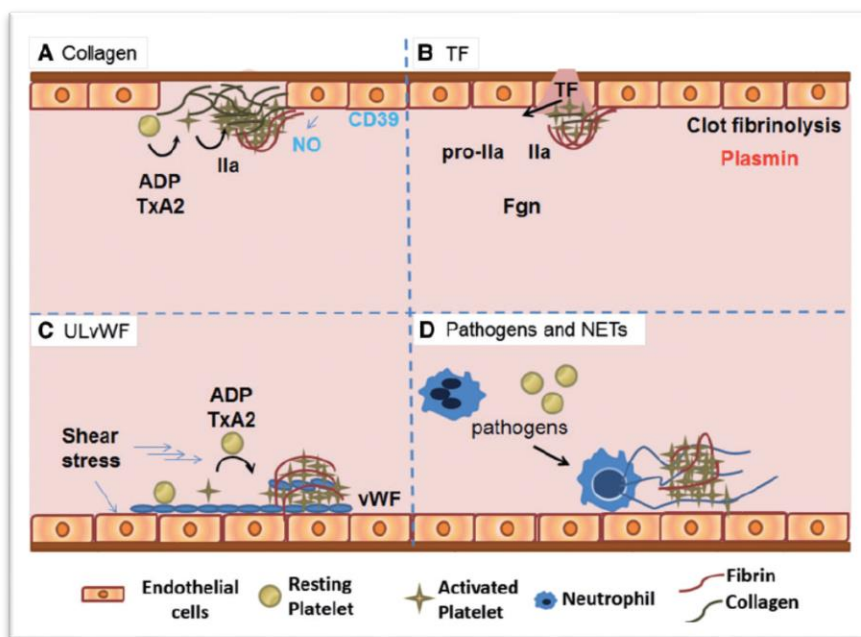
Per altra banda, el paper de les plaquetes en la trombosi venosa també s'ha descrit i és degut, principalment, a quatre factors (figura 5) (150,151).

1. El dany endotelial (Fig. 5A) fa que s'exposi el col·lagen subendotelial i entri en contacte amb les cèl·lules del torrent sanguini. Les plaquetes, mitjançant les seves glicoproteïnes (GP) de membrana GPVI i GPIb-V-IX interaccionen amb el col·lagen i amb el factor de Von Willebrand formant una capa per sobre de l'endoteli (152). Les plaquetes activades són capaces de reclutar altres plaquetes, factors de coagulació i altres cèl·lules gràcies a la secreció de mediadors de l'agregació com el tromboxà A₂ (TXA₂), l'ADP, multímers ultra grans de factor de vW i serotonina, així com l'estímul de la producció de trombina.
2. El FT (Fig. 5B): La lesió tissular també provoca l'alliberació de FT del múscul lli, les cèl·lules adventicials i els perícits. El FT mitjança la conversió de la protrombina a trombina, la generació de fibrina i l'activació de la coagulació plasmàtica.
3. Els multímers ultragrans de factor de vW (ULWF) (Fig. 5C): Les cèl·lules endotelials activades, o bé per un estrès elevat per forces de cisallament i/o per epinefrina, secreten els ULWF que teixiran una xarxa per atrapar

plaquetes a la superfície de l'endoteli intacte. El contacte entre els ULvWF i la GPIb provoca l'activació plaquetària. Les plaquetes adherides, també alliberaran ADP i TXA₂ que promouran l'activació de més plaquetes i, finalment, a la formació i retracció de coàguls tridimensionals.

4. Les trapes extracel·lular de neutròfils (NETs) (Fig. 5D). En presència de patògens, les plaquetes i els neutròfils interaccionen per formar NETs (veure més endavant).

Figura. 5 Mecanismes de trombosi mediada per plaquetes. Obtinguda de (150)



L'endoteli juga un paper important perquè expressa trombo-reguladors (NO, prostaciclina i CD39-ectonucleotidasa) que impedeixen la propagació del coàgul. Segons on es forma el coàgul, el trombus pot ser ric en plaquetes ("coàguls blancs", que es formen a les artèries) o rics en fibrina i hematies ("coàguls vermells", que es formen a les venes).

El procés de formació d'un trombus pot conduir a la formació incontrolada d'un coàgul que pot resultar en una trombosi arterial o una trombosi venosa.

Clàssicament s'ha considerat que la funció plaquetària era més rellevant en la trombosi arterial. Tanmateix, hi ha estudis que han demostrat que les plaquetes juguen un paper fonamental en la trombosi venosa tant *in vitro* (92–94,104) com *in vivo* (95).

Tot i que un estudi recent de Framingham (96) no va trobar relació entre agregabilitat plaquetària i risc de TEV, altres estudis (tot i que més modestos) han suggerit una possible relació entre TEV i hiperagregabilitat a dosis baixes d'inductors (97). Tot i aquests estudis, el risc de TEV no s'ha associat de forma clara amb la funció plaquetària global o l'agregació.

4.3 Leucòcits i susceptibilitat a la trombosi venosa

Tal i com s'ha esmentat abans, l'endoteli vascular juga un paper fonamental en el desenvolupament de la trombosi, mecanisme en el qual, els leucòcits hi estan implicats. Un estudi que va utilitzar ratolins com a models (104), va demostrar que induint una restricció del flux sanguini, fins i tot sense dany endotelial, era suficient per generar TEV donat que es generava una situació proinflamatòria sobre l'endoteli. Aquesta condició, afavoria el reclutament de cèl·lules que participen en la immunitat innata, sobretot neutròfils i monòcits. Aquest, juntament amb altres estudis (16,98), han demostrat que els leucòcits tenen un paper en el desenvolupament de la trombosi.

S'han postulat diversos mecanismes per intentar explicar la participació dels leucòcits en esdeveniments vasculars:

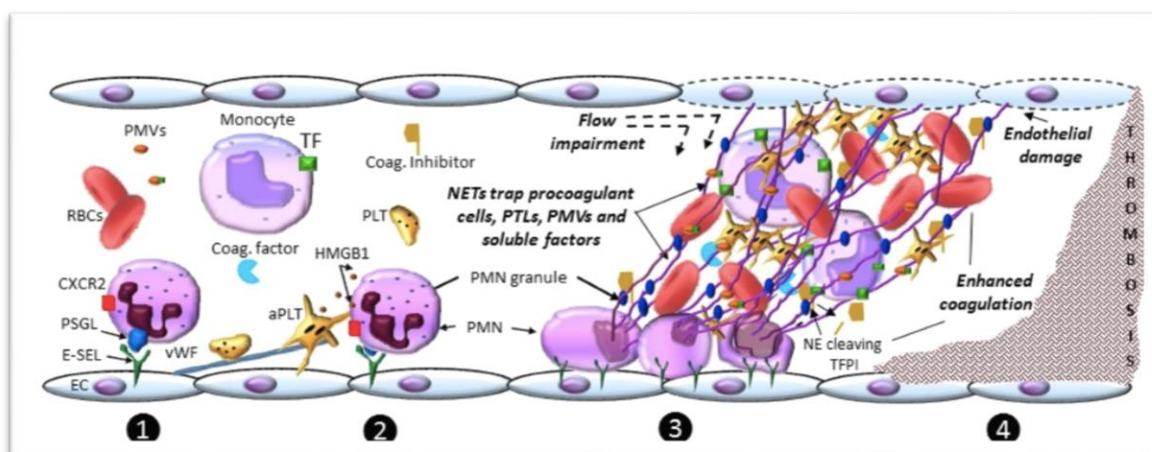
1. Els neutròfils s'adhereixen a la superfície lesionada immediatament, fins i tot abans que les plaquetes, mitjançant la molècula ICAM-1 (153). Un cop adherits, els neutròfils per una banda, alliberen diferents substàncies per promoure la trombosi com la catepsina G que és una proteasa que actua sobre factors de la coagulació per promoure la formació del trombus (154). I per l'altra, allibera substàncies per inhibir-la, com l'ADAMTS-13, que és una proteasa que s'adhereix als ULVWF inhibint la seva funció i, per tant, reduint l'estat inflamatori que provocaria una activació plaquetària (155).
2. Les trapes extracel·lulars de neutròfils (NETs): El rol dels neutròfils en la trombosi ha resultat més evident arran del descobriment de la seva capacitat per a alliberar les NETs mitjançant un procés anomenat NETosi (104). Brinkmann va descriure per primer cop les NETs l'any 2004 (156) i actualment hi ha una millor evidència i un millor coneixement sobre la seva formació, característiques i paper que desenvolupen.

Són moltes les vies moleculars que desemboquen a la NETosi: Per exemple la generació de espècies reactives d'oxigen (ROS), la delobulació nuclear promoguda per enzims com la MPO i la NE i la modificació de la cromatina mitjançant la citrulinació d'histones per la peptidil-arginina deiminasa 4 (PAD4) (157–159).

Les NETs són el resultat de l'extrusió del neutròfil d'una matriu formada per ADN, histones i múltiples proteïnes amb activitat antimicrobiana. *In vitro*, s'ha observat que les plaquetes tenen capacitat per unir-se tant a l'ADN com a les histones (105,160). Mitjançant un model murí, Bril (161) va demostrar que la histona H3, que és present a les NETs, pot interaccionar amb el domini A1 del factor de vW (Figura 6.1) afavorint el contacte d'aquest amb les plaquetes i la seva activació (Figura 6.2). Un cop activades, interaccionen amb els neutròfils a través de la GPIb promovent la formació de més NETs. Aquest cercle viciós afavoreix la formació d'un trombus ric en plaquetes i en hematies (Figura 6.4).

Tanmateix, les NETs no només activen les plaquetes, sinó que també promouen la coagulació mitjançant l'activació de les proteïnes plasmàtiques de la coagulació (Figura 6.3). La presència d'àcids nucleics a nivell extracel·lular, activa els factors de la coagulació i, per tant, incrementa la síntesi de trombina (162). Recentment també s'ha demostrat que el factor XII pot promoure la síntesi de NETs iniciant la citrulinació de les histones (163). Les NETs poden iniciar la coagulació a través de la via extrínseca per que expressen FT i contenen serin-proteases que inactiven el TFPI (104,164). Un estudi molt recent (165) ha demostrat que la presència de la histona H4 i l'ADN extracel·lular incrementa l'expressió d'ARNm de diferents factors de la coagulació fet que explicaria l'efecte protrombòtic d'aquests dos elements.

Figura. 6 Mecanismes proposats de trombosi dependents de NETs. Obtingut de (166)



3. El FT: Els monòcits són la principal font de FT. Són reguladors importants de la trombosi mitjançant l'expressió del FT a la seva superfície i el desprendiment de MP procoagulants riques en FT sota diferents estímuls patològics (101).

En aquest aspecte, dos estudis han demostrat el paper dels monòcits en la trombosi. A l'estudi prospectiu de cohorts Tromsø (101) es va demostrar que els monòcits dels pacients amb TEV espontani expressaven a la seva superfície més quantitat de FT, demostrant que aquest també era més actiu. A més, van observar que hi havia neutròfils que contenien més ARNm codificant per FT, provocant que aquests neutròfils tinguessin més tendència a alliberar MP riques en FT. Per altra banda, l'estudi de casos i controls MEGA (73) va observar que, recomptes de monòcits superiors a $0,55 \times 10^9/L$ (fins i tot dins el rang de normalitat) es relacionaven amb major incidència de TEV: OR 2,8 (IC 95% 1,3-5,8).

Per tant, el paper dels leucòcits en el desenvolupament de la trombosi venosa queda clar, tanmateix, els mecanismes pels quals es desenvolupa són compartits amb altres vies trombòtiques com l'activació plaquetària i l'eritrocitària. Tot fa pensar, cada cop més, en que el procés de la coagulació i, per tant, de la trombosi, és un procés molt més complex del que es pensava, que implica múltiples vies metabòliques i múltiples elements, molts dels quals, encara resten per conèixer.

5. Resultats

5. Resultats

A continuació s'exposen els resultats obtinguts de l'anàlisi dels diferents fenotips en relació amb el risc de TEV en les dues poblacions abans esmentades: Projecte GAIT-2 i Projecte RETROVE.

5.1 Estudi dels fenotips eritrocitaris i la susceptibilitat genètica a la trombosi

El projecte d'investigació GAIT-2 és una mostra formada per famílies extenses. Aquest fet permet que es pugui avaluar amb relativa facilitat la base genètica de determinats fenotips així com estudiar quines variables tant de l'individu com de l'entorn, poden influir en aquesta.

“En els estudis epidemiològics clàssics (per exemple, estudis de casos i controls) els recomptes d'hematies, els seus índexs i l'haptoglobina s'han relacionat amb la trombosi. Fins i tot, pacients amb desordres hemolítics crònics exhibeixen un estat protrombòtic. També hi ha una controvèrsia sobre la relació entre ferro i trombosis (70,83–90)

Hipòtesi 1: És possible determinar la influència genètica (heretabilitat) d'aquests fenotips eritrocitaris mitjançant l'estudi GAIT-2 i avaluar el rol d'aquests fenotips com a fenotips intermediaris amb el risc de TEV.”

5.1.1 Càlcul de l'heretabilitat, efecte atribuïble a les covariables i atribuïble a l'entorn

En primer lloc per a conèixer si els paràmetres eritrocitaris tenen una base genètica s'ha determinat l'heretabilitat de cadascun d'ells. Donat que durant l'estudi també es va recollir un llistat de covariables, també s'ha calculat quina variabilitat és explicada per les covariables, quines covariables hi influïen i si l'entorn hi podia influenciar. A la taula 8 es descriuen els resultats obtinguts.

Taula 8. Variables, valors, heretabilitat, efecte de l'entorn i variabilitat explicada per les covariables.

Variables	Nivells	h ² (p valor)	Efecte domiciliari (p valor)	Variabilitat atribuïda a les covariables	Covariables
Hb (g/l)	143 ± 15 (80–187)	0.32 (5 · 10 ⁻¹⁰)	NS	0.37	Edat, sexe i tabac
RBC (10 ¹² /L)	4.84 ± 0.44 (2.84–6.37)	0.44 (4 · 10 ⁻¹⁶)	NS	0.26	Sexe, anticonceptius orals i tabac
HCT (L/L)	0.42 ± 0.04 (0.26–0.54)	0.36 (7 · 10 ⁻¹²)	NS	0.36	Edat, sexe i tabac
VCM (fl)	86.8 ± 5.4 (59–117)	0.55 (5 · 10 ⁻²⁸)	NS	0.34	Edat i tabac
HCM (pg)	29.7 ± 2 (16–38.8)	0.53 (6 · 10 ⁻²⁷)	NS	0.26	Edat, sexe i tabac
CHCM (g/L)	342 ± 10.5 (256–371)	0.54 (5.3 · 10 ⁻¹⁹)	0.12 (2 · 10 ⁻³)	0.2	Edat, sexe i tabac
RDW (%)	13.2 ± 0.9 (11.4–22.8)	0.49 (5.4 · 10 ⁻¹⁹)	NS	0.09	Edat i sexe
RET (%)	1.05 ± 0.32 (0.25–2.7)	0.53 (1.1 · 10 ⁻²²)	NS	0.1	Edat
RET (10 ⁹ /L)	51 ± 16.2 (12–130)	0.52 (4.7 · 10 ⁻²¹)	NS	0.1	Edat i sexe
LFR (%)	92.6 ± 4 (65.4–99.2)	0.33 (1 · 10 ⁻¹²)	NS	0.13	Edat i sexe
MFR (%)	6.6 ± 3.2 (0.6–34)	0.24 (1.9 · 10 ⁻⁸)	NS	0.13	Edat i sexe
HFR (%)	0.8 ± 1.1 (0–14.7)	0.16 (1 · 10 ⁻⁴)	NS	0.1	Edat i sexe
IRF (%)	7.4 ± 4.05 (0.8–36)	0.27 (7.6 · 10 ⁻¹⁰)	NS	0.14	Edat i sexe
HP (g/L)	1.34 ± 0.7 (0–5.2)	0.44 (1 · 10 ⁻¹⁸)	NS	0.13	Edat i tabac
FE (μmol/l)	18 ± 6.8 (1–49)	0.1 (5 · 10 ⁻²)	0.11 (1 · 10 ⁻²)	0.04	Sexe i tabac
TIBC (μmol/l)	57.5 ± 9.2 (20–112)	0.45 (7.5 · 10 ⁻¹³)	0.12 (4 · 10 ⁻³)	0.05	Edat, sexe i anticonceptius orals
SI (%)	31.8 ± 12.5 (3–86)	0.16 (3 · 10 ⁻⁴)	0.12 (7 · 10 ⁻³)	0.06	Edat, sexe i tabac
Ft (microg/L)	121.2 ± 148 (2–1692)	0.18 (6 · 10 ⁻⁴)	0.10 (6 · 10 ⁻⁴)	0.31	Edat, sexe i tabac
STFR (mg/L)	3.65 ± 1.93 (0.7–46.3)	0.33 (5.7 · 10 ⁻⁹)	0.13 (1 · 10 ⁻³)	0.06	Edat i tabac

Els valors s'expressen en forma de mitja ± desviació estàndard i entre parèntesi s'identifiquen els valors mínim i màxim.

HB: Hemoglobina, RBC: Recompte d'hematies, HCT: Hematòcrit, VCM: Volum corpuscular mig, HCM: Hemoglobina corpuscular mitja, CHCM: Concentració d'hemoglobina corpuscular mitja, RDW: amplitud de distribució eritrocitària, RET: reticulòcits, LFR: reticulòcits de baixa fluorescència, MFR: reticulòcits de mitja fluorescència, HFR: reticulòcits d'elevada fluorescència, IRF: índex de fluorescència reticulocitària, HP: haptoglobina, FE: ferro sèric, TIBC: Capacitat total d'unió al ferro, SI: índex de saturació, Ft: ferritina sèrica, STFR: Receptor soluble de la transferrina, NS: No significatiu

5.1.1.1 Paràmetres eritrocitaris i índexs

La heretabilitat (h^2) per a l'hemoglobina, el recompte d'hematies, l'hematòcrit, el VCM, l'HCM, la CHCM i la RDW és estadísticament significativa amb un rang que oscil·la des de 0,32 (hemoglobina) a 0,55 (VCM). No s'ha detectat que l'efecte domiciliari influeixi en aquests paràmetres excepte en el cas de la CHCM on la influència és de 0,12 essent estadísticament significativa (p valor de $2 \cdot 10^{-3}$). Les covariables analitzades expliquen una part important de la variabilitat: Entre un 9% pel RDW i un 37% per l'hemoglobina.

5.1.1.2 Recomptes reticulocitaris

Els valors d' h^2 han resultat estadísticament significatius per a tots els trets relacionats amb els reticulòcits (reticulòcits, LFR, MFR, HFR, IFR) des de 0,16 per a HFR a 0,53 per als reticulòcits en percentatge. No s'ha detectat efecte domiciliari en aquests trets i la variabilitat explicada per les covariables és molt baixa (entre 0,1 i 0,14).

5.1.1.3 Haptoglobina

La h^2 és significativa (0,44), sense observar-se efecte domiciliari. L'edat i el tabac expliquen el 13% de la variabilitat de l'haptoglobina.

5.1.1.4 Paràmetres fèrrics

L' h^2 resulta força significativa per a tots els paràmetres (ferro, TIBC, SI, ferritina i el receptor soluble de la transferrina (STFR)). Els valors més elevats es troben en la capacitat total de transport de ferro (0,45) i amb el receptor soluble de la transferrina (0,33). En aquest cas si que s'observa efecte domiciliari i l'efecte més notable atribuïble a les covariables s'observa en la ferritina sèrica (31%) donat per l'edat, el sexe (ser home) i el tabac. El valor més baix atribuïble a les covariables sexe i tabac s'observa en la siderèmia (4%).

5.1.2 Correlacions genètiques dels fenotips eritrocitaris i el risc de TEV

A la taula 9 es descriu l' h^2 del TEV en la nostra població. L'heretabilitat de la trombosi venosa és elevada (0,67) sense efecte atribuïble per compartir el domicili (dieta). En el cas de la trombosi arterial, l' h^2 no és significativa.

Taula 9. Heretabilitat estimada per la trombosi en la població GAIT-2

	Trombosi venosa	Trombosi arterial	Trombosis
h²	0,67	0,23	0,46
Desviació estàndard	0,17	0,19	0,13
P valor	0,0000016	0,141	0,0000943
Efecte domiciliari	0	0	0

La correlació genètica és la semblança fenotípica entre diferents grups degut a que han heretat els mateixos gens. Els valors oscil·len entre -1 i 1. Com més prop estiguin de -1 o 1, més forta és la relació lineal entre les dues característiques. Quan es negativa significa una relació inversa o antagònica, en el nostre cas, a més valor del paràmetre, menys risc de trombosi. Les correlacions genètiques més significatives s'han observat amb l'hematòcrit ($\rho_G = 0.52$, $p = 0.01$), el RDW ($\rho_G = 0.28$, $p = 0.05$), l'IRF ($\rho_G = 0.45$, $p = 0.008$), el ferro sèric ($\rho_G = -0.7$, $p = 0.05$), i el receptor soluble de la transferrina ($\rho_G = 0.4$, $p = 0.006$) (taula 10).

Taula 10. Correlacions genètiques dels fenotips eritrocitaris i el risc de TEV en la població GAIT-2

Variables	ρ_G (pval)
Hb (g/l)	0.015 (NS)
RBC (10¹²/L)	0.08 (NS)
HCT (L/L)	0.52 (0.01)
VCM (fl)	0.05 (NS)
HCM (pg)	0.07 (NS)
CHCM (g/L)	0.23 (NS)
RDW (%)	0.28 (0.05)
RET (%)	0.07 (NS)
RET (10⁹/L)	0.02 (NS)
LFR (%)	-0.21 (NS)
MFR (%)	-0.01 (NS)
HFR (%)	0.31 (NS)
IRF (%)	0.45 (0.008)
HP (g/L)	-0.08 (NS)
FE (μmol/l)	-0.6915 (NS)
TIBC (μmol/l)	-0.04 (NS)
SI (%)	-0.7 (0.05)
Ft (microg/L)	0.16 (NS)
STFR (mg/L)	0.40 (0.006)

5.2 Estudi de la funció plaquetària i la seva susceptibilitat a la trombosi

S'ha analitzat l'associació entre els paràmetres que avaluen la funció plaquetària i el risc de TEV en l'estudi de casos i controls RETROVE.

“Clàssicament les plaquetes s'han associat a la trombosi arterial. Tanmateix, estudis recents han demostrat que tenen un rol fonamental en els mecanismes de TEV en models animals. Tot i que l'estudi de Framingham no va trobar una associació entre risc de TEV i agregabilitat plaquetària, altres estudis més modestos han suggerit una possible associació (91–97).

Hipòtesi 2: Es possible determinar la relació entre hiperreactivitat plaquetària i risc de TEV mitjançant l'ús de monitors de la funció plaquetària com el PFA-100® i Multiplate™. L'estudi RETROVE proporciona una població de casos i controls suficient per considerar si hi ha diferències o no.”

Hem trobat diferències estadísticament significatives entre casos i controls per l'edat i per altres variables tal i com es pot observar a la taula 11.

Taula 11. Característiques clíniques dels casos i controls dins l'estudi RETROVE i diferències entre els dos grups.

Característica	Casos		Controls		Significació (p)
	Homes	Dones	Homes	Dones	
Sexe (n)	196	204	194	206	
Edat (anys) (Mitja ± DE)	61,5±16,9	66,2±20	47,6±17,7	50,5±18,7	<2,2·10 ⁻¹⁶
IMC (kg·m ⁻²) (Mitja ± DE)	28± 4,1	28,3± 6,1	26± 25,4	24,4± 4,1	<2,2·10 ⁻¹⁶
Tabaquisme (n, %)	37 (18,9)	18 (8,8)	40 (20,6)	35 (17)	NS
Consum d'alcohol (n, %)	119 (60,7)	76 (34,3)	130 (67)	98 (47,6)	0,023
Hipertensió (n, %)	83 (42,3)	94 (46,1)	35 (18)	40 (19,4)	8,27·10 ⁻¹⁵
Dislipèmia (n, %)	62 (31,6)	75 (36,8)	36 (18,6)	43 (20,9)	3,46·10 ⁻⁶
Estatines (n, %)	46 (23,5)	60 (29,4)	18 (9,3)	32 (15,5)	5,81·10 ⁻⁷
Diabetis mellitus (n, %)	23 (11,7)	17 (8,3)	10 (5,2)	10 (4,9)	0,0073
Malalties autoimmunes (n, %)	20 (10,2)	21 (10,3)	14 (7,2)	18 (8,7)	NS
Ictus hemorràgic (n, %)	0 (0)	2 (1)	1 (5)	0 (0)	NS
Antecedents de trombosi arterial (n, %)	14 (7,1)	15 (7,4)	1 (5)	1 (5)	1,08·10 ⁻⁶

AINES (n, %)	29 (14,8)	58 (28,4)	23 (11,9)	34 (16,5)	0,0058
Antiagregants plaquetaris (n, %)	24 (12,2)	18 (8,8)	2 (1)	5 (2,4)	2,46·10 ⁻⁷

Segons l'anàlisi dels 400 esdeveniments trombòtics (veure Taula 6), hem observat més trombosis espontànies (n=273, 68,3%) que no espontànies (n=127, 31,8%). Els anàlisis descriptius i estadístics del PFA-100® i del Multiplate™ es descriuen a la taula 12.

Taula 12. Anàlisi descriptiu dels resultats obtinguts amb el PFA-100® i el Multiplate™ a l'estudi RETROVE

	Casos		Controls		P valor
	N	Mitja ± SD	N	Mitja ± SD	
Paràmetres PFA-100®					
PFAadp (s)	397 (3)	77 ± 20.5	397 (3)	86 ± 19.3	3.38·10 ⁻¹⁶
PFAepi (s)	397 (3)	110 ± 30	397 (3)	127 ± 33.2	1.15·10 ⁻¹⁷
Paràmetres Multiplate™					
AUC 0.25 µM (AU)	383 (17)	15.9 ± 9.5	383 (17)	15.2 ± 10.2	NS
AUC 0.5 µM (AU)	397 (3)	25.9 ± 14.7	389 (11)	24.8 ± 14.1	NS
AGR 0.25 µM (%)	385 (15)	31.4 ±17.1	385 (15)	30.3 ± 18.2	NS
AGR 0.5 µM (%)	397 (3)	47.3 ± 25	390 (10)	45.2 ± 24.4	NS
SLP 0.25 µM (AU·min ⁻¹)	384 (16)	5.1 ±1.8	385 (15)	4.93 ± 1.9	NS
SLP 0.5 µM (AU·min ⁻¹)	397 (3)	6.9 ± 3.0	390 (10)	6.7 ± 2.9	NS
Altres paràmetres					
FcVIIIc (%)	398 (2)	231.0 ± 84.1	397 (3)	143.2 ± 53.1	2.32·10 ⁻⁵⁹
vWF (%)	399 (1)	200.7 ± 92.8	400	117.0 ± 53.2	3.54·10 ⁻⁵²

*Els individus exclosos per raons tècniques es troben entre parèntesi

5.2.1 Funcionalisme plaquetari per PFA-100® i risc trombòtic

Hem trobat diferències significatives entre casos i controls només en els paràmetres del PFA. Pel PFA amb ADP (PFAadp), els pacients presenten TO més curts que els controls (77± 20,5 segons vs 86±19,3 segons; $p=3,38\cdot10^{-16}$). Pel PFA amb epinefrina (PFAepi) els pacients també presentaven TO inferiors als controls (110± 30 segons vs 127±33,2 segons; $p=1,15\cdot10^{-17}$). D'acord als valors de referència del nostre centre, hi havia 20 controls sans i 12 pacients amb un TO PFAadp>123 segons i 18 controls i 9 pacients amb un TO PFAepi>191 segons. Cal indicar que aquests individus no han afectat l'avaluació del risc trombòtic associat a TO curts. S'ha creat un paràmetre: PFA

redundant (RPFA) per fer referència a aquells individus que presenten curts tots dos paràmetres: PFAadp i PFAepi.

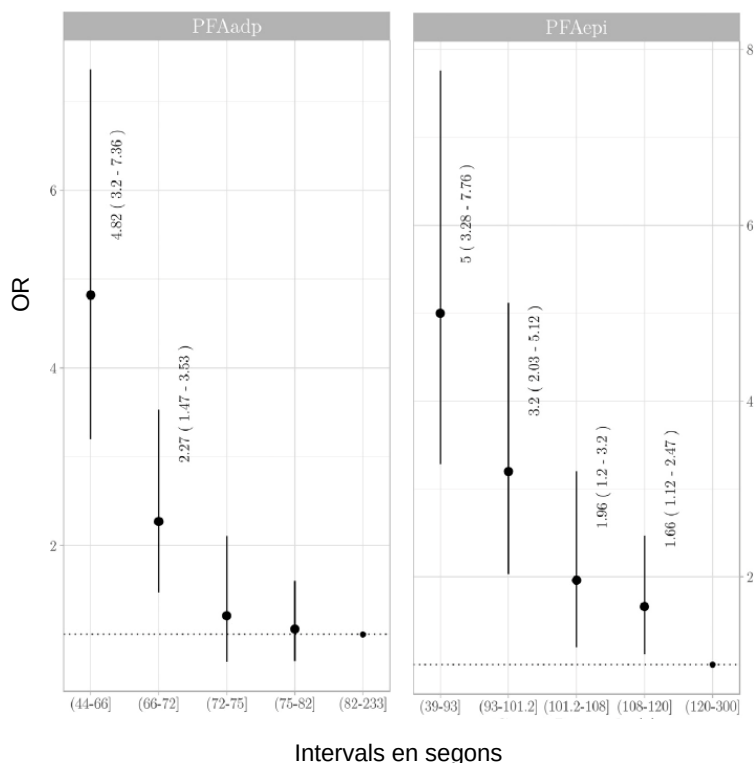
Per avaluar quina era l'associació entre TO i risc de TEV, s'ha estratificat la mostra en 4 percentils: el percentil 10, el 20, el 30 i el 50 (Taula 13) agafant com a referència els valors de la població control.

Taula 13. OR del risc de TEV estratificant segons percentil (10, 20, 30 i 50) per cada paràmetre de PFA

Interval	Casos	Controls	Model sense ajustar	
	N (%)	N (%)	OR (95% IC)	P valor
PFAadp (s)				
(44-66]	128 (32.2)	42 (10.6)	4.82 (3.02–7.36)	$1.10 \cdot 10^{-13}$
(66-72]	66 (16.6)	46 (9.8)	2.27 (1.47–3.53)	$2.52 \cdot 10^{-4}$
(72-75]	26 (6.5)	34 (11.6)	1.21 (0.69–2.11)	NS
(75-82]	53 (13.5)	79 (8.6)	1.06 (0.70–1.60)	NS
(82-233]	124 (31.2)	196 (49.4)	1.00 (referència)	–
PFAepi (s)				
(39-93]	110 (27.7)	41 (10.3)	5.00 (3.28–7.76)	$2.28 \cdot 10^{-13}$
(93-101.2]	67 (19.9)	39 (9.8)	3.20 (2.03–5.12)	$7.39 \cdot 10^{-7}$
(101.2-108]	43 (10.8)	41 (10.3)	1.96 (1.20–3.20)	0.007
(108-120]	73 (18.4)	82 (20.7)	1.66 (1.12–2.47)	0.012
(120-300]	104 (26.2)	194 (48.9)	1.00 (referència)	–

S'han trobat diferències significatives per sota del percentil 20 (72 segons) per PFAadp i per sota del percentil 50 (120 segons) per pFA epi. Es pot observar a la figura 7 que al relacionar TO curts (sense ajustar per cap paràmetre) i risc de trombosi, com més curt és el TO, major Odds Ratio (OR). És a dir, la relació entre TO i risc trombòtic sembla continua.

Figura 7. Risc de TEV segons el model sense ajustar per PFAadp (esquerra) i PFAepi (dreta). Es mostra la OR amb els intervals de confiança al 95% amb p-valor significatius. La línia de punts mostra el valor de OR de 1.



També s'han creat 4 models per ajustar per diferents variables que podrien actuar com a confusors. Les característiques de les variables incloses dins els models de regressió logística es descriuen a la Taula 14. A la taula 15 es descriuen els valors de OR obtinguts per als paràmetres de PFA-100[®] per sota del percentil 10 dels controls i per Multiplate[™] per sobre del percentil 90 dels controls segons els diferents models que es descriuen a continuació.

1. El model 1, és el model sense ajustar per cap paràmetre i, tal i com és d'esperar, mostra les OR més elevades: RPFA (OR=5.17, 95% CI 2.98–9.56), pel PFAadp (OR=4.02, 95%, CI 2.76–5.95) i pel PFAepi (OR=3.33, 95% CI 2.27–4.97) totes elles significatives.
2. Al model 2, es realitza l'ajust dels paràmetres per edat i sexe. Tot i així, les OR romanen altament significatives
3. El model 3 és el model ajustat per edat, sexe i factor de vW. Al afegir el factor de vW les OR disminueixen però encara guarden significació per a tots els paràmetres del PFA (OR=2.24, 95% CI 1.44–3.49 per PFAadp; OR=1.63, 95% CI 1.04–2.59 per PFAepi i OR=2.60, 95% CI 1.38–5.13 per RPFA).

4. Finalment, el model 4 és quan s'ha realitzat l'ajust per tots els paràmetres en que s'havia trobat diferències significatives entre casos i controls. S'observa que el risc de TEV obtingut és similar al trobat al model 3.

Taula 14. Característiques de les variables incloses dins els models de regressió logística

	Casos		Controls	
	Homes	Dones	Homes	Dones
Gènere (n)	196	204	194	206
Edat (n, %)				
Adults (18–64)	117 (59.7)	82 (40.2)	158 (81.4)	156 (75.7)
Edat avançada (65–94)	79 (40.3)	122 (59.8)	36 (18.6)	50 (24.3)
IMC (kg·m⁻²) (n, %)				
Normal (< 25.0)	52 (26.5)	63 (31.2)	89 (45.9)	117 (56.8)
Sobrepès (25.0–30.0)	91 (46.4)	73 (36.1)	75 (38.7)	68 (33.0)
Obesitat (> 30)	53 (27.0)	66 (32.7)	30 (15.5)	21 (10.2)
FVIII ≥216% (n, %)	87 (44.4)	112 (55.4)	9 (4.7)	31 (15.2)
vWF ≥186% (n, %)	107 (54.6)	118 (58.1)	19 (9.8)	22 (10.7)
Grup ABO (n, %)				
Grup 0	45 (23.2)	47 (23.4)	74 (38.7)	78 (38.4)
Grup no 0	149 (76.8)	154 (76.6)	117 (61.3)	125 (61.6)

Taula 15. OR de risc de TEV per a paràmetres de PFA per sota del percentil 10 dels controls i de Multiplate™ per sobre del percentil 90 dels controls.

Interval		Casos	Controls	Model 1	
		N (%)	N (%)	OR (95% CI)	P valor
PFAs					
PFAadp	(44–66]	128 (32.2)	42 (10.6)	4.02 (2.76–5.95)	1.04·10 ⁻¹²
PFAepi	(58–93]	110 (27.7)	41 (10.3)	3.33 (2.27–4.97)	1.65·10 ⁻⁹
RPFA	–	67 (16.9)	15 (3.8)	5.17 (2.98–9.56)	2.64·10 ⁻⁸
Multiplate™					
AUC 0.25 µM	[27.8–66)	37 (9.7)	39 (10.2)	0.94 (0.59–1.52)	NS
AUC 0.5 µM	[47–79)	42 (10.6)	40 (10.3)	1.03 (0.65–0.89)	NS
AGR 0.25 µM	[52.1–119)	39 (10.1)	39 (10.1)	1 (0.63–1.6)	NS
AGR 0.5 µM	[81.8–150)	48 (12.1)	40 (10.3)	1.2 (0.77–1.88)	NS
SLP 0.25 µM	[7.16–16.3)	43 (11.2)	39 (10.1)	1.12 (0.71–1.77)	NS
SLP 0.5 µM	[11.1–21.8)	41 (10.3)	39 (10)	1.04 (0.65–1.65)	NS

Model 2		Model 3		Model 4	
OR (95% IC)	P valor	OR (95% IC)	P valor	OR (95 IC)	P valor
3.36 (2.48–5.50)	$1.40 \cdot 10^{-10}$	2.24 (1.44–3.49)	$3.40 \cdot 10^{-4}$	2.90 (1.91–4.46)	$8.84 \cdot 10^{-7}$
2.87 (1.93–4.34)	$3.50 \cdot 10^{-7}$	1.63 (1.04–2.59)	0.035	1.97 (1.28–3.07)	0.002
4.41 (2.49–7.58)	$1.06 \cdot 10^{-6}$	2.60 (1.38–5.13)	0.004	2.82 (1.52–5.48)	0.002
0.92 (0.55–1.51)	NS	0.93 (0.53–1.59)	NS	0.96 (0.57–1.59)	NS
0.97 (0.59–1.59)	NS	1.03 (0.6–1.74)	NS	0.93 (0.56–1.54)	NS
0.98 (0.59–1.61)	NS	1 (0.58–1.71)	NS	0.99 (0.59–1.64)	NS
1.12 (0.7–1.81)	NS	1.04 (0.61–1.75)	NS	1.09 (0.67–1.78)	NS
1 (0.61–1.63)	NS	0.94 (0.55–1.61)	NS	1.08 (0.66–1.78)	NS
0.98 (0.6–1.6)	NS	1.05 (0.61–1.79)	NS	0.93 (0.56–1.54)	NS

5.2.2 Funcionalisme plaquetari per Multiplate™ i risc trombòtic

Tal i com es pot observar a la taula 15, no s'han observat OR significatives en l'estudi d'agregacions amb l'aparell Multiplate™ en cap model i ni en alta ni baixa concentració d'inductors.

5.3 Estudi dels fenotips de la sèrie leucocitària i susceptibilitat a la trombosi

En aquest apartat, s'han avaluat els fenotips leucocitaris dels individus inclosos dins el projecte RETROVE com a factors de risc trombòtic. Concretament, s'ha estudiat, per una banda, si els pacients amb trombosi tenen canvis en el recompte leucocitari respecte els controls sans. Per l'altra, donada la creixent importància del paper de les NETs en la trombosi, s'ha avaluat la capacitat dels neutròfils d'ambdós grups, per a fer NETs mitjançant la mesura indirecta de marcadors d'aquestes i si hi ha diferències entre ells.

5.3.1 Relació entre els recomptes leucocitaris i risc de TEV.

“L'efecte protrombòtic dels leucòcits es considera secundari a la presència de FT present als monòcits, neutròfils i MP. Els recomptes elevats de leucòcits són un factor predictor de TEV en pacients amb trastorns mieloproliferatius, tanmateix, hi ha poca informació en pacients sense aquestes malalties (98–103).

Hipòtesi 3: L'estudi RETROVE permet estudiar l'associació entre recomptes de leucòcits com a factor de risc de TEV i definir quines poblacions leucocitàries són més susceptibles de generar trombosi, així com establir valors de risc.”

A continuació es descriuen els valors obtinguts dels recomptes leucocitaris d'ambdós grups d'estudi amb el *p* valor per establir si hi ha diferències significatives o no (taula 16).

Taula 16. Descripció dels recomptes leucocitaris en els individus inclosos al projecte RETROVE.

	Pacients		Controls		<i>P</i> valor
	n	Mitja ± DE	n	Mitja ± DE	
Eosinòfils (x10 ⁹ /L)	398	0.18 ± 0.14	394	0.19 ± 0.15	n.s.
Monòcits (x10 ⁹ /L)	400	0.57 ± 0.20	396	0.51 ± 0.18	1.22·10 ⁻⁵
Limfòcits (x10 ⁹ /L)	396	1.9 ± 0.6	400	2.0 ± 0.5	n.s.
Neutròfils (x10 ⁹ /L)	400	4.1 ± 1.5	396	3.8 ± 1.5	6.8·10 ⁻³
Basòfils (x10 ⁹ /L)	396	0.030 ± 0.017	392	0.033 ± 0.019	0.047

Hem trobat diferències estadísticament significatives entre casos i controls en els recomptes de monòcits, neutròfils i basòfils. Concretament, els valors de monòcits són els que tenen major significació ($p=1,22 \cdot 10^{-5}$) essent més elevats en pacients que en controls. Per altra banda els pacients ($0,03 \pm 0,0,17$) tenen valors inferiors de basòfils respecte els controls ($0,033 \pm 0,19$). No s'han observat diferències en els recomptes leucocitaris entre homes i dones.

Per tal de poder definir un tall a partir del qual cal tenir en compte la xifra de monòcits, neutròfils o basòfils, s'ha estratificat en tres percentils: 10, 50 i 90 (Taula 17).

Taula 17. OR de risc de TEV, tenint en compte els percentils 10, 50 i 90 dels controls.

	Casos	Controls	OR (95% IC) [†]	P valor
Monòcits ($10^9/L$)				
[0.21–0.34)	13	18	0,8 (0,38–1,65)	n.s
[0.34–0,7)	302	335	1	-
[0.70–1.60)	85	43	2.19 (1.48–3.29)	0,000112
Neutròfils ($10^9/L$)				
[1.20–2,3)	27	44	0,59 (0,36–0,98)	n.s
[2,3–5,53)	319	309	1	-
[5.53–13.00)	54	40	1.22 (0.79–1.88)	n.s.
Basòfils ($10^9/L$)				
[0–0.01)	63	57	1,09 (0,74–1,64)	n.s
[0.001–0,059)	298	295	1	-
[0.059–0.12)	35	40	0.87 (0.53–1.4)	n.s.

Les OR s'han ajustat per aquelles variables en les que s'havien trobat diferències entre casos i controls (veure apartat de Material i Mètodes) que en aquest cas eren: edat, sexe, IMC, HTA, dislipèmia, diabetis mellitus, MPOC i insuficiència renal.

Tal i com es mostra a la taula 17, tants sols s'han trobat diferències significatives en el grup dels monòcits amb valors per sobre del percentil 90: Xifra de monòcits superior a $0,7 \times 10^9/L$ amb una significació del 0,000112. Al observar-se que les xifres elevades de monòcits són les que mostren relació amb el risc de trombosi, s'ha estudiat més detingudament aquesta població.

S'ha analitzat si hi havia diferències entre el recompte de monòcits entre el casos que havien patit una trombosi espontània o provocada, o una trombosi única respecte trombosis múltiples. Només, en el cas de trombosis espontànies i esdeveniment únics

s'ha observat relació: OR de 2,3 (1,4-3,7) i OR de 2 (1,3-3,2), respectivament (Taula 18).

Taula 18. OR de trombosis espontànies, provocades, úniques i múltiples tenint en compte el percentil 10, 50 i 90 de la xifra de monòcits dels controls.

	Percentil de monòcits	Casos	Controls	OR (95% IC)	P valor
Trombosis espontànies	[0.21–0.34)	11	18	1.2 (0,47–2,86)	n.s
	[0.34–0.7)	199	335	1	-
	[0.70–1.60)	63	43	2.3 (1.4–3,7)	0,1·10 ⁻³
Trombosis no espontànies	[0.21–0.34)	2	18	0,4 (0,05–1,3)	n.s
	[0.34–0.7)	103	335	1	-
	[0.70–1.60)	22	43	1,6 (0,9–2,8)	n.s.
Trombosi única	[0.21–0.34)	10	18	0,8 (0,3–1,8)	n.s
	[0.34–0.7)	233	335	1	-
	[0.70–1.60)	72	43	2(1,3-3,2)	0,2·10 ⁻³
Trombosis múltiples	[0.21–0.34)	3	18	0,99 (0,2–3,49)	n.s
	[0.34–0.7)	69	335	1	-
	[0.70–1.60)	13	43	1,5 (0,71–3,14)	n.s

En aquest cas, les OR també s'han ajustat per les variables amb diferències entre casos i controls. Tot i que les trombosis no espontànies no mostren diferències significatives, la OR de 1,6 i l'IC entre 0,9-2,8 mostra una tendència similar que les trombosis espontànies.

5.3.2 Estudi de la relació de biomarcadors plasmàtics de NETs i trombosi venosa

“Els neutròfils són els leucòcits més abundants i el seu paper en la trombosi ha resultat més evident arran del descobriment de la seva capacitat per a formar NETs (104–107).

Hipòtesi 4: És possible mitjançant l'estudi RETROVE l'anàlisi de biomarcadors plasmàtics de NETs que reflecteixin la seva formació. Aquests biomarcadors poden tenir un paper com a fenotips intermediaris en l'estudi del risc de TEV.”

Els biomarcadors plasmàtics de NETs avaluats han estat quatre:

- La mieloperoxidasa (MPO)
- La neutròfil elastasa (NE)
- La histona H3 citrulinada (H3cit)
- L'ADN extracel·lular (cfDNA)

Els pacients tenen nivells més elevats dels biomarcadors de NETs que els controls. En tots els casos les diferències trobades han estat significatives: MPO $72,5 \pm 54,9$ ng/mL vs $67 \pm 52,6$ ng/mL ($p = 0,03$), per la NE $1653,7 \pm 1238$ ng/mL vs $1262,7 \pm 1196,4$ ng/mL ($p < 0,0001$), per la H3cit $7,2 \pm 48,9$ ng/mL vs $2,9 \pm 8,12$ ng/mL ($p = 0,004$) i per cfDNA $311,6 \pm 55,6$ ng/mL vs $284,9 \pm 41,5$ ng/mL ($p < 0,0001$).

A més de les diferències objectivades pel que fa als marcadors de NETs, també s'ha objectivat altres diferències amb paràmetres relacionats amb trombofília i generació de NETs (167–169). Els resultats més rellevants es poden veure a la taula 19.

Taula 19. Taula descriptiva dels biomarcadors de NETs i altres paràmetres de trombofília dels individus del projecte RETROVE.

	Casos		Controls		P valor
	N	Mitja ± DE	N	Mitja ± DE	
Biomarcadors de NETs					
MPO (ng/mL)	394	72,5 ± 54,9	396	67±52,6	0,03
NE (ng/mL)	389	1653,5±1238	393	1262,7±1196,4	<0,0001
H3cit (ng/mL)	394	7,2±48,5	399	2,9±8,2	0,004
cfDNA (ng/mL)	400	311,6±55,6	399	284,9±41,5	<0,0001
Paràmetres de trombofília					
Leucòcits (x10 ⁹ /L)	400	6,8±1,9	399	6,5±1,9	0,015
Neutròfils (x10 ⁹ /L)	400	4±1,5	399	3,8±1,6	0,004
TTPa (RATIO)	398	0,97±0,1	398	1±0,09	<0,001
Dimer-D (ng/mL)	313	1072±2954,3	345	342,6±2	<0,001
FVIII (%)	399	231,5±84	397	143,2±53,1	<0,001
FXII (%)	399	111,9±25,5	398	105,8±23,3	<0,001
Fibrinogen (g/L)	399	3,8±0,9	398	3,4±0,7	<0,001
vWF (%)	399	200,7±92,8	400	117±53,2	<0,001
ADAMTS-13 (µg/mL)	400	0,44±0,15	400	0,4±0,1	Ns
Lag Time (min)	396	3,2±1	400	2,92±1	<0,001
ETP (nM·min)	396	1531±527,6	400	1410±389	<0,001
TP (nM)	396	250±91,5	400	235,3±87,1	0,005
TTP (min)	396	6,8±1,62	400	6,5±1,7	0,01

ETP: Potencial endogen de trombina; TP: Pic de trombina; TTP: Temps fins al pic

La MPO, la NE, la H3cit i el cfDNA estan directament correlacionats entre ells. Hem trobat una correlació dèbil tot i que estadísticament significativa entre la MPO i la NE (rho de Spearman 0,32 $p < 0,001$), entre el cfDNA i la NE (rho de Spearman de 0,2 $p < 0,001$) i la MPO i la H3cit (rho de Spearman de -0,13 $p < 0,001$).

Per tal de valorar si hi havia una associació entre els biomarcadors de NETs i risc de TEV, i determinar si hi ha un valor a partir del qual s'ha de tenir en compte aquesta associació, hem estratificat la mostra entre el percentil 50 i el percentil 75 tenint com a referència de valors de normalitat dels individus control. Hem trobat diferències significatives a partir del percentil 50 que correspon als valors de 902ng/mL, 0,57ng/ml i 285,25ng/mL de NE, H3cit i cfDNA respectivament. Al situar-nos al percentil 75, només s'han observat diferències en la NE (1429ng/mL) i pel cfDNA (304,9ng/mL). Per la MPO no s'han trobat diferències en els percentils abans esmentats.

No hem trobat diferències en els paràmetres de NETs segons el sexe, antecedents de trombosi única o múltiple, espontània o provocada, antecedents de trombosi arterial prèvia o TO curts objectivats per PFA-100®.

5.3.2.1 Model de regressió logística entre NE i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofilia

S'han evidenciat nivells de correlació positius entre els nivells de NE circulants i diversos paràmetres de trombofilia: Leucòcits totals ($p < 0,001$), xifra de Dímer-D ($p < 0,12$), nivells de FVIII ($p < 0,012$), fibrinogen ($p < 0,001$), cofactor de la ristocetina ($p < 0,001$), factor de vW antigènic ($p < 0,001$) i amb els paràmetres de generació de trombina (*lag time* ($p < 0,001$), ETP ($p < 0,038$) i TTP ($p < 0,001$). Tot i aquestes correlacions, el model de regressió logística només ha mostrat una associació justa entre la NE i els recomptes de neutròfils per sobre del percentil 50 ($> 3.48 \times 10^9/L$). D'aquest anàlisi s'extreu una corba ROC (Receiver Operating Characteristic) de 0,68 (sense tenir en compte el recompte de neutròfils) i de 0,75 (amb el recompte de neutròfils) (Figura 8a).

5.3.2.2 Model de regressió logística entre H3cit i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofilia

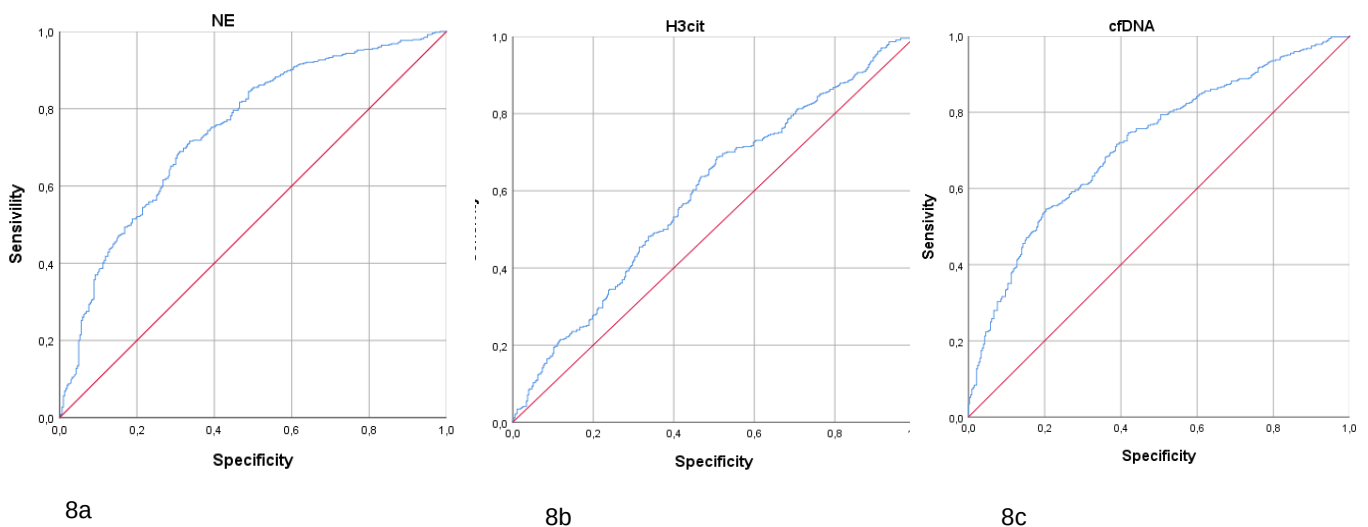
Els nivells de H3cit es van situar per sota del límits de detecció en 136 casos (46,6%) i en 188 controls (47%). Tot i la menor informació disponible, hem trobat que la H3cit es correlaciona amb l'edat per sobre de 65 anys ($p < 0,015$) i els nivells de FVIII ($p <$

0,001). La corba ROC es de 0,58 sense ajustar i de 0,6 ajustant-la per les variables amb les que es correlaciona (Figura 8b).

5.3.2.3 Model de regressió logística entre cfDNA i risc de TEV i correlació amb altres paràmetres de trombofilia

Hem objectivat múltiples correlacions positives entre els nivells de cfDNA i els paràmetres de trombofilia: Recòmptes de leucòcits totals ($p < 0,001$), xifra de neutròfils ($p < 0,001$), Dímer-D ($p < 0,001$), nivells de FVIII ($p < 0,001$), nivells de FXII ($p < 0,001$), fibrinogen ($p < 0,001$), cofactor de la ristocetina ($p < 0,001$), antigen del factor de vW ($p < 0,001$) i amb tots els paràmetres de generació de trombina (*lag time* ($p < 0,001$), ETP ($p < 0,001$), thrombin peak ($p < 0,013$) i TTP ($p < 0,001$). El model de regressió logística mostra una forta associació amb els nivells de fibrinogen, especialment amb els que se situen per sobre del percentil 75 ($> 3.9\text{g/L}$). La capacitat dels nivells de cfDNA per a discriminar els casos respecte els controls s'ha avaluat també amb una corba ROC que és del 0,68 sense ajustar i del 0,72 després d'ajustar-ho pel fibrinogen (Figura 8c).

Figura. 8. Model de regressió logística de NE (8a), H3cit (8b) i cfDNA (8c).



6 ■ Discussió

6. Discussió

A continuació es descriu en primer lloc la discussió per separat de cadascun dels resultats obtinguts i mostrats a l'apartat anterior. Finalment, es farà una discussió conjunta.

6.1. Genètica dels fenotips eritrocitaris i susceptibilitat a la trombosi

La h^2 és la proporció de la varianza fenotípica atribuïda a efectes genètics. El rang d' h^2 va de 0 a 1. En canvi, si en la varianza fenotípica no es detecta cap efecte dels gens, la h^2 és 0. El valor 1 implica que tota la variabilitat del fenotip està explicada per la variabilitat genètica. Un valor de h^2 (diferent a 0) significatiu, vol dir que els gens tenen efecte sobre el fenotip.

L' h^2 estimada és significativa per pràcticament tots els paràmetres relacionats amb la sèrie vermella. Segons el nostre coneixement, és el primer cop que s'estima l' h^2 de les fraccions reticulocitàries (LFR, MFR, HFR i IRF).

L' h^2 dels paràmetres fèrrics ja s'havia reportat prèviament en estudis de nutrició i de sobrecàrrega fèrrica (170–173). Hem observat una elevada heretabilitat sobretot en el paràmetre de la transferrina (TIBC, 0,45) fet que ja s'havia observat en estudis previs fets al nostre centre (GAIT-1) (174,175) i en altres poblacions diferents a la nostra (172).

Un dels objectius era investigar la correlació genètica entre aquests fenotips intermediaris i el risc de TEV donada l'elevada h^2 del TEV observada. S'han observat correlacions genètiques interessants, sobretot en el cas de l'hematòcrit (0.52), el RDW (0.28), l'IRF (0.45), el receptor soluble de la transferrina (0.4) i el ferro sèric (−0.70). Aquest fet indica que hi ha gens que actuen pleiotròpicament i influeixen en els nivells sanguinis d'aquests paràmetres i amb el risc de TEV.

Tal i com era d'esperar, la variabilitat deguda a les covariables és significativa en gairebé tots els paràmetres.

Històricament els hematies s'havien vist com un element inert i no relacionat amb la coagulació. Tanmateix, l'evidència clínica suggereix el contrari, observant-se una

relació entre sèrie vermella i trombosis tant en estudis poblacionals (70,83) com en estudis en pacients oncològics (83,176–178).

Hi ha diversos mecanismes que ho podrien explicar com per exemple l'expressió de la fosfatidilserina a la superfície dels hematies, que és capaç de generar trombina mitjançant l'activació de la via de contacte. La fosfatidilserina posseeix càrrega negativa fet que afavoreix la unió del residu Gla^+ dels factors vitamina K depenents. (141). Aquest fet però, només s'ha pogut demostrar *in vitro* i el seu paper *in vivo* encara resulta desconegut (142,143). Els reticulòcits, són els que expressen els nivells més elevats de fosfatidilserina, fet que podria explicar l'estat protrombòtic associat a les anèmies hemolítiques (84,179).

L'increment del RDW és una mesura d'anisocitosi, que prèviament ja s'ha relacionat amb la trombosi (125). Tenint en compte que són els reticulòcits les cèl·lules amb més contingut de fosfatidilserina a la seva membrana, la possible relació entre TEV, hematòcrit, RDW i IRF és consistent amb aquest mecanisme. El mateix mecanisme podria explicar la relació trobada entre el receptor soluble de la transferrina (STFR) i TEV. Aquest últim fenotip ja s'havia observat com a fenotip intermediari a l'estudi GAIT-1.

El receptor soluble de la transferrina és un fragment derivat del receptor cel·lular per la transferrina. La principal font de STFR són els precursors eritroides del moll d'ós. Quan aquests precursors s'hiperplasien, els nivells de STFR s'incrementen, fet que passaria en trastorns hemolítics, de la mateixa manera que variaria el RDW i l'IRF. A l'estudi GAIT-1 un anàlisi de GWAS del STFR va mostrar dues regions (quantitative trait locus o QTL) 2q23.14 i 3q21.2 amb una elevada puntuació LOD, és a dir, amb una probabilitat molt alta de contenir gens que regulin els nivells plasmàtics de STFR (180). Com que el fenotip STFR està correlacionat genèticament amb el risc de TEV (veure taula 10), aquests dos QTL podrien contenir gens candidats de risc trombòtic.

6.2 Estudi de la funció plaquetària i la seva susceptibilitat a la trombosi

Pel que respecta a les característiques dels pacients i de les trombosis incloses dins del projecte RETROVE (Veure característiques generals a l'apartat de Material i Mètodes) cal destacar que, en el nostre cas, hem observat una major prevalença d'espontànies (68,3%) que de no espontànies (31,8%). Al contrari d'alguns estudis (181,182) que havien observat en la seva població la mateixa freqüència de trombosis espontànies vs no espontànies. La localització dels episodis trombòtics és similar a les prèviament reportades (181).

Els nostres resultats mostren una clara associació entre els TO curts i risc de TEV pels agonistes usualment utilitzats per l'aparell PFA-100®: ADP i epinefrina. Tots dos agonistes mostren una forta associació amb el risc de TEV (figura 7, apartat de resultats). Curiosament, no s'ha trobat una associació entre agregació plaquetària global i risc de TEV.

Aquests anàlisis, dins el nostre coneixement, són la primera avaluació epidemiològica entre el risc de TEV i la funció plaquetària mesurada mitjançant l'aparell PFA-100®. Clàssicament, les plaquetes han estat considerades elements claus en la trombosi arterial, ara bé, tant trombosi arterial com venosa, comparteixen factors de risc comuns (183,184) i, en aquest aspecte, els nostres resultats suggereixen que l'increment de la funció plaquetària pot ser un altre factor de risc compartit.

Segons els resultats obtinguts, l'associació més significativa amb risc trombòtic és l'obtinguda amb els valors per sota del percentil 10 de PFA_{ADP} ≤ 66 segons i PFA_{epi} ≤ 93 segons. Quan s'ajusten per variables confusores potencials com l'edat i el sexe, s'observa una disminució del risc de TEV però sense que aquest desaparegui.

D'acord amb el disseny de l'estudi RETROVE, els casos i controls no estan emparellats per edat i sexe, per això els casos són majors en edat respecte els controls. Tot i aquesta diferència, les troballes obtingudes amb els paràmetres de PFA segueixen essent certes, doncs en estudis previs realitzats a la nostra unitat, el valor dels PFAs no es veu influenciat per l'edat o el sexe, almenys en la població espanyola (185). Per a minimitzar l'efecte d'altres covariables, com el factor de vW (factor ja conegut que intervé en l'adhesió plaquetària (186,187) s'han elaborats models de regressió logística incondicional. És interessant observar com, al ajustar pel factor de

vW hi ha un descens brusc de la OR tot i que l'associació amb TEV segueix essent significativa per tots dos paràmetres (PFAadp i PFAepi). Al ajustar per a totes les possibles variables confusores (FVIII i grup AB0), les OR obtingudes són similars a les observades després d'ajustar pel factor de vW. El paràmetre RPFA que representa el doble de risc (PFAadp i PFAepi tots dos curts) mostra l'associació més forta amb el risc de TEV. Aquest fet suggereix que el RPFA és un bon marcador de risc trombòtic i que probablement caldrà avaluar prospectivament.

El dispositiu PFA-100® és un aparell utilitzat habitualment per a l'avaluació de trastorns hemorràgics (188–190) i també en malaltia arterial, alguns estudis han observat hiperagregabilitat plaquetària (191,192). Els nostres resultats suggereixen fermament que aquesta metodologia pot ser útil en el camp de la trombosi venosa.

El fet de no haver trobat relació entre risc trombòtic i hiperagregabilitat plaquetària estudiada mitjançant l'aparell Multiplate™ pot ser degut a que, mentre que el test del PFA-100® es porta a terme sota condicions de flux elevat, l'agregometria no. D'acord amb els nostres resultats, Puurunen (96) tampoc va trobar relació entre risc trombòtic i hiperagregabilitat amb plasma ric en plaquetes utilitzant el mètode d'agregometria convencional (LTA). Per altra banda, altres estudis més petits (69,97,193) suggereixen una associació dèbil entre TEV i hiperagregabilitat a dosis baixes d'inductors. Per tant, sembla que l'agregació plaquetària no està relacionada amb el risc de TEV, almenys d'una forma significativa.

En suport als nostres resultats que impliquen la rellevància de l'estudi de la funció plaquetària en pacients amb TEV, alguns estudis han demostrat l'eficàcia del tractament antiagregant (AAS) per a la prevenció del TEV (21,22). Un assaig clínic comparant rivaroxaban amb AAS (194) també ha demostrat l'eficàcia del tractament antiplaquetari en la prevenció del risc trombòtic. En aquest cas, rivaroxaban va ser més efectiu que AAS en la prevenció d'episodis recurrents de TEV, però la incidència d'esdeveniments trombòtics en el grup tractat amb aspirina (4%) era inferior a la incidència de TEV recurrent prèviament descrita (8,1%) (181).

Totes aquestes evidències indiquen que hi ha una relació important entre la funció plaquetària global i el risc trombòtic. Tanmateix, aquesta relació no sembla que vingui donada pels mecanismes d'agregació sinó més aviat pels d'adhesió fet que es pot intuir perquè després de l'ajust pel factor de vW, la relació és manté.

6.3 Estudi dels fenotips de la sèrie leucocitària i susceptibilitat a la trombosi

6.3.1 Relació entre els recomptes leucocitaris i risc de TEV

En aquest estudi hem analitzat els efectes dels recomptes leucocitaris, concretament dels monòcits com a factors de risc de TEV. Els pacients i els controls mostren diferències significatives en els factors de risc. Aquestes diferències poden deure's al fet que els pacients són d'edat superior als controls donat al particular disseny del projecte RETROVE tal i com s'ha mencionat prèviament.

S'ha demostrat que el reclutament i l'activació dels neutròfils i els monòcits secundària a l'estasi (i no al dany endotelial) esdevé en fases precoces del TEV (104,106). Està clar que els leucòcits intervenen en la coagulació, ara bé, no queda tant clar el seu paper com a factors de risc del TEV (73). A la nostra mostra, els pacients tenen nivells superiors de neutròfils i monòcits. Les diferències significatives s'han observat en recomptes de monòcits superiors al percentil 90 ($>0,7 \times 10^9/L$) i en trombosis espontànies i úniques. No s'han trobat diferències entre pacients amb antecedents d'una o més d'una trombosi. Aquests resultats no són del tot inesperats doncs la inducció de l'expressió del FT als monòcits ha estat implicada en trastorns trombòtics. Els monòcits circulants expressen FT en resposta a un estímul inflamatori i alguns estudis han demostrat que la font de FT en TEV prové essencialment dels leucòcits, concretament dels monòcits i de les MP derivades d'ells (104). També s'ha vist que l'homocisteïna incrementa l'expressió del FT dels monòcits en pacients amb cirrosi, sèpsia, càncer i en pacients post-quirúrgics (195,196). I finalment, els monòcits també s'han vist implicats en la modulació del trombus venós (197–199).

Tanmateix, estem molt segurs que la nostra troballa de que els recomptes de monòcits per sobre de $0,7 \times 10^9/L$ (paràmetre que entra dins el rang de referència habitual) està associada amb TEV. Aquests resultats venen a confirmar les troballes descrites en estudis previs (73,101). És obvi que els nostres resultats no exclouen la possibilitat que hi ha una relació entre altres tipus de leucòcits i la trombosi. Tampoc podem establir si hi ha una relació causal per que la mostra s'ha obtingut després de l'episodi trombòtic, però les nostres troballes estan en línia amb els estudis TromsØ i MEGA (73,101) i recolzen el fet que recomptes elevats de monòcits tenen relació amb el risc trombòtic.

6.3.2 Estudi de la relació de biomarcadors plasmàtics de NETs i trombosi venosa

Hem trobat associació entre els marcadors plasmàtics de NETs i el risc de TEV. Aquesta associació és més evident en valors per sobre del percentil 50 per la NE, la H3cit i el cfDNA i és independent d'altres factors de risc trombòtic com el Dímer-D o els nivells de FVIII. En el cas de la MPO no hem trobat diferències entre casos i controls. Aquestes troballes poden ser explicades per que la NE però no la MPO és necessària per la decondensació nuclear (200) i perquè no tots els components de les NETs tenen la mateixa capacitat per activar la coagulació, per exemple, el cfDNA i la H3cit han demostrar *in vitro* que tenen més capacitat per generar trombina que els altres components de les NETs (166).

Els nostres resultats demostren la propensió dels neutròfils circulants, en pacients amb antecedent de TEV, de desenvolupar la NETosi la qual, està associada a una major expressió de NE, H3cit i cfDNA com s'ha demostrat en estudis fets en pacients amb trombosis agudes (168,201). Segons l'etiologia del trombus, l'expressió de les NETs pot ser diferent. Mangold va comparar la composició de les NETs de 30 trombus arterials d'origen coronari i 7 trombus procedents de venes profundes. Va observar que els trombus arterials contenen més NETs que els trombus venosos (202). Altres estudis que han examinat histològicament el trombus, han observat que en trombus organitzats hi ha menys NETs ja que a mesura que el trombus madura, les NETs són substituïdes per una matriu de col·lagen (203). Aquest fet podria ser una explicació per què els nivells de H3cit es troben sota el límit de detecció en aproximadament el 47% de pacients i controls. Altres articles, també han observat taxes baixes de detecció d'aquest paràmetre (168). La H3cit sis mesos després de l'episodi trombòtic no sembla ser un bon marcador de TEV. Tanmateix, tot i que l'anàlisi no s'ha fet en fase aguda, encara s'han trobat diferències en els nivells de H3cit en aquells individus en que s'ha pogut detectar, per lo que podria ser un bon marcador en fase aguda.

S'ha observat que fàrmacs comunament utilitzats per al tractament de la trombosi, així com antiagregants plaquetaris contribueixen a la degradació de les NETs (204,205). En el nostre cas, la determinació plasmàtica de les NETs es va dur a terme almenys sis mesos després de la trombosi i, durant aquest temps, els pacients van rebre tractament anticoagulant. La persistència d'elevades concentracions d'aquests paràmetres en pacients, tot i haver rebut tractament, indica que els biomarcadors de NETs tenen relació amb el TEV i encara romanen durant la fase crònica.

Dins el nostre coneixement, és el primer cop que s'estudien els marcadors plasmàtics de NETs en pacients que no es troben en la fase aguda de la trombosi. La detecció d'aquests paràmetres almenys sis mesos després de l'episodi està d'acord amb el fet que les NETs poden estimular la remodelació fibròtica promovent el desenvolupament d'un trombus estable el qual és més difícil de destruir pel sistema fibrinolític (204).

En un estudi prospectiu realitzat en pacients amb càncer, Mauracher (168) va trobar que els nivells de H3cit però no de cfDNA són significativament superiors en pacients que van patir un TEV al llarg dels dos anys de seguiment. No van avaluar altres paràmetres com la MPO i la NE. Tanmateix, el nostre estudi ha identificat la presència de NE i cfDNA circulant en pacients amb antecedent de TEV amb una corba ROC de 0,75 i 0,6 respectivament per predir el risc trombòtic. Cal dir, però, que l'àrea sota la corba no mostra una gran capacitat per la detecció de trombosi.

Amb l'objectiu d'investigar si existeix correlació entre els nivells de NETs i altres paràmetres que habitualment s'estudien en la trombosi, els models de regressió logística han demostrat una bona correlació entre la xifra de neutròfils i la NE, la qual cosa és coherent per que la NE és una proteasa produïda per aquestes cèl·lules (205). També hem trobat una correlació entre els nivells de H3cit i edat superior a 65 anys i cfDNA i nivells de fibrinogen per sobre del percentil 75 fets que són coherents amb troballes prèvies en que s'han observat nivells més elevats de fibrinogen en pacients amb TEV (206).

Cal adreçar algunes limitacions del nostre estudi. No hem quantificat les NETs directament, ho hem fet d'una forma indirecta mitjançant marcadors que en reflecteixen la seva formació. Vam escollir aquesta forma de determinació per que en la pràctica clínica és un mètode més aplicable i fàcil. El punt de tall al percentil 50 de la NE, H3cit i el cfDNA ha estat escollit empíricament agafant el punt en que s'observaven diferències significatives.

6.4 Discussió conjunta

Per explicar un episodi de TEV actualment disposem d'una relació de factors ambientals, genètics i plasmàtics (o fenotips intermediaris). Tot i que cada cop tenim més informació, aquesta segueix essent insuficient per explicar tots els episodis trombòtics. Queda clar que la susceptibilitat de trombosi, no és la mateixa per a cada individu i per tant, segurament, el que en un futur ens pot arribar a donar més informació és la confecció de models predictius. Ara bé, per a fer-los, cal disposar d'un elevat número de dades per a que els resultats s'aproximin, cada cop més, a la susceptibilitat trombòtica real.

Amb aquesta tesi s'ha intentat focalitzar l'anàlisi de la susceptibilitat trombòtica al paper que desenvolupen les cèl·lules sanguínies en l'hemostàsia. Amb el model cel·lular ja s'ha observat que les cèl·lules no només fan de superfície sinó que participen activament en la coagulació.

El paper de la sèrie vermella en la trombosi venosa no queda ben definit del tot. El fet d'haver evidenciat en famílies una elevada correlació genètica entre fenotips eritrocitaris (hematòcrit, RDW, IRF, receptor soluble de la transferrina i ferro sèric) i TEV, encamina cap a la recerca de factors genètics que contribuïrien a l'episodi trombòtic.

Un altre aspecte important a remarcar és el paper que juguen els paràmetres de PFA en l'avaluació de la funcionalitat plaquetària i el risc de trombosi. Una revisió prèvia havia mostrat l'associació entre TO curts i la malaltia cardiovascular (189). Per primer cop, el projecte RETROVE ha posat de manifest sistemàticament la relació existent entre els valors de TO i el risc de TEV. Això brinda un nou camp d'estudi en l'adhesió plaquetària, no només com a fenotip de risc, sinó com a possible focus de tractament.

Els leucòcits participen en la trombosi venosa mitjançant diferents mecanismes. Entre ells en destaquen l'expressió de FT i la formació de NETs. D'acord als mecanismes postulats, sembla coherent la troballa feta en els individus amb trombosi del projecte RETROVE de xifres de monòcits més elevades. Tal i com s'ha vist, els monòcits expressen a la seva superfície FT i tant els monòcits com les MP que se'n deriven, solen ser la font principal de FT en un episodi trombòtic (91).

Els neutròfils d'aquests individus també estan involucrats en aquest procés, paper que s'explica bé amb el procés de formació de NETs (91). En els individus del projecte RETROVE afectes de trombosi s'ha observat una elevació dels marcadors plasmàtics de NETs sis mesos després de l'episodi trombòtic i, fins i tot, després de rebre tractament anticoagulant. Aquesta troballa implica que els marcadors plasmàtics de NETs són fenotips intermediaris a considerar i, no només això, sinó que poden ser dianes terapèutiques per a prevenir trombosis i les seves recurrències.

Finalment cal emfatitzar que els nostres resultats estan subjectes a certes limitacions metodològiques. Els paràmetres de funció plaquetària i leucocitària han estat avaluats sis mesos després de l'esdeveniment trombòtic per tant, no podem saber si els nostres resultats serien diferents si s'haguessin avaluat en fase aguda. Una altra limitació ve donada pel disseny de casos i controls. L'associació trobada entre els paràmetres de PFA, monòcits, NETs i TEV podria no ser causal, doncs l'avaluació d'aquests s'ha dut a terme sempre després de l'esdeveniment trombòtic.

7 ■ Conclusions

7. Conclusions

1. Amb l'anàlisi de la població GAIT-2 s'han identificat 5 fenotips intermediaris (hematòcrit, RDW, IRF, receptor soluble de la transferrina i ferro sèric) amb elevada correlació genètica amb la trombosi que poden ser utilitzats per a la busca de gens relacionats amb la trombosi.
2. L'anàlisi dels paràmetres de funció plaquetària a l'estudi RETROVE, ha mostrat una forta associació entre risc de TEV i TO curts avaluats mitjançant el dispositiu PFA-100®. No s'ha trobat associació entre agregabilitat plaquetària estudiada per Multiplate™ i trombosi. L'avaluació de l'adhesió plaquetària és un nou fenotip intermediari que pot ser avaluat en l'estratificació del risc individual de patir trombosi.
3. L'anàlisi dels recomptes leucocitaris en els individus del projecte RETROVE confirma que els nivells elevats de monòcits ($>0,7 \times 10^9/L$) estan relacionats amb risc trombòtic. Pot ser un paràmetre útil per incloure en futurs models de predicció de risc trombòtic.
4. En l'anàlisi dels marcadors plasmàtics de NETs en els individus del projecte RETROVE hem observat que els nivells de MPO, NE, H3cit i cfDNA sis mesos després de l'episodi trombòtic i tot i haver rebut tractament anticoagulant, segueixen elevats. Els paràmetres que han demostrat una correlació major amb el risc trombòtic són la NE i el cfDNA. L'estudi i coneixement de la composició de les NETs en tots els seus estadis evolutius, pot proporcionar informació per a predir el risc de TEV i desenvolupar noves dianes terapèutiques.

8 ■ Línies de futur

8. Línies de futur

- L'evidència que l'adhesió plaquetària juga un paper important en la trombosi venosa, ha impulsat el desenvolupament del projecte RETROVE-3 projecte pel que s'ha concedit un ajut FIS (PI 18/00434 2019-2021) . Es tracta d'un projecte multicèntric en el que participa a més de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, l'Hospital Clínic i el Banc de Sang i teixits. S'estudiaran els paràmetres d'adhesió en 50 casos amb TO curts evidenciats durant el projecte RETROVE i 50 controls sans també del mateix projecte.
- Amb l'experiència adquirida amb la determinació de paràmetres plasmàtics de NETs, es va impulsar un projecte multidisciplinari entre els serveis d'Immunologia, Malalties infeccioses, Unitat de cures Intensives i la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau amb títol: NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS in SEPSIS: Discovery of prognostic markers and therapy targets. Aquest projecte ha estat premiat amb una ajuda econòmica procedent de la Fundació La Marató de TV3, 2017. El projecte té una durada de 3 anys amb inici al maig de 2019.

9 ■ Bibliografia

9. Bibliografia

1. Seegers WH, Warner ED, Brinkhous KM, Smith HP. The Use Of Purified Thrombin As An Hemostatic Agent. *Science*. 1939;89(2300):86.
2. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence For Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310–2.
3. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade In The Blood Clotting Mechanism, And Its Function As A Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964;202:498–9.
4. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001 J;85(6):958–65.
5. Zwaal RF. Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*. 1978;515(2):163–205.
6. Jackson CM. Models for reaction mechanisms in haemostasis--contributions from the study of prothrombin activation. *Thromb Haemost*. 2007;98(1):24–35.
7. Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(1):170–7.
8. Díaz-Ricart M, Estebanell E, Lozano M, Aznar-Salatti J, White JG, Ordinas A, et al. Thrombin facilitates primary platelet adhesion onto vascular surfaces in the absence of plasma adhesive proteins: studies under flow conditions. *Haematologica*. 2000;85(3):280–8.
9. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7(4):459–64.
10. Virchow R. Phlogose und thrombose im Gefäßsystem Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen medizin. Frankfurt:Staatsdruckerei. 1856.
11. Rosendaal FR. Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2005 J;2005(1):1–12.
12. Rocha E, Panizo C, Lecumberri R. Treatment of venous thromboembolism. *Med Clin*. 2000;115:224–35.
13. van Es N, van der Hulle T, van Es J, den Exter PL, Douma RA, Goekoop RJ, et al. Wells Rule and d -Dimer Testing to Rule Out Pulmonary Embolism. *Ann Intern Med*. 2016 Aug 16;165(4):253.
14. Kearon C. Diagnosis of suspected venous thromboembolism. *Hematology*. 2016 Dec 1;2016(1):397–403.
15. Takach Lapner S, Julian JA, Linkins L-A, Bates S, Kearon C. Questioning the use of an age-adjusted D-dimer threshold to exclude venous thromboembolism: analysis of individual patient data from two diagnostic studies: reply. *J Thromb Haemost*. 2016;14(12):2555–6.
16. Van Montfort ML, Stephan F, Lauw MN, Hutten BA, Van Mierlo GJ, Solati S, et al. Circulating nucleosomes and neutrophil activation as risk factors for deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):147–51.
17. Smeeth L, Cook C, Thomas S, Hall AJ, Hubbard R, Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet (London, England)*. 2006;367(9516):1075–9.
18. Vanschoonbeek K, Feijge MAH, Van Kampen RJW, Kenis H, Hemker HC, Giesen PLA, et al. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost*. 2004;2(3):476–84.
19. Bezemer ID. Gene Variants Associated With Deep Vein Thrombosis. *JAMA*. 2008;299(11):1306.
20. Watson HG, Chee YL. Aspirin and other antiplatelet drugs in the prevention of venous thromboembolism. *Blood Rev*. 2008;22(2):107–16.

21. Brighton TA, Eikelboom JW, Mann K, Mister R, Gallus A, Ockelford P, et al. Low-Dose Aspirin for Preventing Recurrent Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 2012 Nov 22;367(21):1979–87.
22. Becattini C, Agnelli G, Schenone A, Eichinger S, Bucherini E, Silingardi M, et al. Aspirin for Preventing the Recurrence of Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 2012;366(21):1959–67.
23. Ye R, Ye C, Huang Y, Liu L, Wang S. Circulating tissue factor positive microparticles in patients with acute recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Res*. 2012;130(2):253–8.
24. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost*. 1996 Nov;76(5):651–62.
25. Souto JC, Almasry L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia*. *Am J Hum Genet*. 2000;67(6):1452–9.
26. Heit JA, Phelps MA, Ward SA, Slusser JP, Petterson TM, De Andrade M. Familial segregation of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2004;2(5):731–6.
27. Larsen TB, Sørensen HT, Skytthe A, Johnsen SP, Vaupel JW, Christensen K. Major genetic susceptibility for venous thromboembolism in men: a study of Danish twins. *Epidemiology*. 2003;14(3):328–32.
28. Morange P-E, Trégouët D-A. Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2013;11 Suppl 1:111–21.
29. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med*. 2002;162(10):1182–9.
30. McRae S, Tran H, Schulman S, Ginsberg J, Kearon C. Effect of patient's sex on risk of recurrent venous thromboembolism: a meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2006;368(9533):371–8.
31. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular Risk Factors and Venous Thromboembolism. *Circulation*. 2008;117(1):93–102.
32. Hippisley-Cox J, Coupland C. Development and validation of risk prediction algorithm (QThrombosis) to estimate future risk of venous thromboembolism: prospective cohort study. *BMJ*. 2011;343(aug16 1):d4656–d4656.
33. Ocak G, Vossen CY, Verduijn M, Dekker FW, Rosendaal FR, Cannegieter SC, et al. Risk of venous thrombosis in patients with major illnesses: results from the MEGA study. *J Thromb Haemost*. 2013;11(1):116–23.
34. Tichelaar YIGV, Kluin-Nelemans HJC, Meijer K. Infections and inflammatory diseases as risk factors for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2012;107(05):827–37.
35. Zöller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of pulmonary embolism in patients with autoimmune disorders: a nationwide follow-up study from Sweden. *Lancet*. 2012;379(9812):244–9.
36. Schmidt M, Christiansen Cf, Horváth-Puhó E, Glynn Rj, Rothman Kj, Sørensen Ht. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2011;9(7):1326–33.
37. Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. NIH Public Access; 2015;12(8):464–74.
38. Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. *N Engl J Med*. 1994;331(24):1601–6.
39. Samama M. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. - PubMed - NCBI. *Arch Intern Med*. 2000;160(22):3415–20.
40. Chandra D, Parisini E, Mozaffarian D. Meta-analysis: travel and risk for venous

- thromboembolism. *Ann Intern Med.* 2009;151(3):180–90.
41. Dentali F, Ageno W, Rancan E, Donati A, Galli L, Squizzato A, et al. Seasonal and monthly variability in the incidence of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2011;106(09):439–47.
42. Franchini M, Mannucci PM. Thrombogenicity and cardiovascular effects of ambient air pollution. *Blood.* 2011;118(9):2405–12.
43. Roach REJ, Siegerink B, le Cessie S, Rosendaal FR, Cannegieter SC, Lijfering WM. Coffee consumption is associated with a reduced risk of venous thrombosis that is mediated through hemostatic factor levels. *J Thromb Haemost.* 2012;10(12):2519–25.
44. Gaborit F, Overvad K, Nørgaard M, Kristensen S, Tjønneland A, Severinsen M. Alcohol intake and risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2013;110(07):39–45.
45. Vilalta N, Souto JC. Investigación de la trombofilia venosa. Presente y futuro. *Angiología.* Elsevier; 2014;66(4):190–8.
46. Corral J, Hernandez-Espinosa D, Soria JM, Gonzalez-Conejero R, Ordonez A, Gonzalez-Porras JR, et al. Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 2007;109(10):4258–63.
47. Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306→Thr) associated with resistance to activated protein C. *Blood.* 1998;91(4):1140–4. A
48. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998;91(4):1135–9.
49. Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaria A, et al. Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C→T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004;91(5):899–904.
50. Wells PS, Anderson JL, Scarvelis DK, Doucette SP, Gagnon F. Factor XIII Val34Leu Variant Is Protective against Venous Thromboembolism: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol.* 2006 J;164(2):101–9.
51. Corral J, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, et al. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood.* 2006;108(1):177–83.
52. Navarro S, Medina P, Bonet E, Corral J, Martínez-Sales V, Martos L, et al. Association of the thrombomodulin gene c.1418C→T polymorphism with thrombomodulin levels and with venous thrombosis risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(6):1435–40.
53. Soria JM, Cárdenas A, Souto JC. Nuevos factores genéticos implicados en el riesgo de trombofilia. *Haematologica/edición española.* 2010;95((Extra1)):81–92.
54. de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJM, Le Cessie S, Reitsma PH, Arellano AR, et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood.* 2012;120(3):656–63.
55. Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries J-PPM, et al. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010;42(8):692–7.
56. Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, et al. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010;8(2):369–78.
57. Bucciarelli P, Passamonti Sm, Biguzzi E, Gianniello F, Franchi F, Mannucci Pm, et al. Low borderline plasma levels of antithrombin, protein C and protein S are risk factors for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2012;10(9):1783–

- 91.
58. Rosendaal FR. Etiology of venous thrombosis: the need for small original studies. *J Thromb Haemost.* 2012;10(10):2189–90.
59. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Tracy RP, Aleksic N, et al. Coagulation factors, inflammation markers, and venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Am J Med.* 2002;113(8):636–42.
60. Tans G, van Hylckama Vlieg A, Thomassen MCLGD, Curvers J, Bertina RM, Rosing J, et al. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *Br J Haematol.* 2003;122(3):465–70.
61. Flinterman LE, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Doggen CJM. Venous thrombosis of the upper extremity: effect of blood group and coagulation factor levels on risk. *Br J Haematol.* 2010;149(1):118–23.
62. Tripodi A, Chantarangkul V, Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. A shortened activated partial thromboplastin time is associated with the risk of venous thromboembolism. *Blood.* 2004;104(12):3631–4.
63. Sørensen B, Ingerslev J. Dynamic APTT parameters: applications in thrombophilia. *J Thromb Haemost.* 2012;10(2):244–50.
64. Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, Meijers JCM, le Cessie S, Doggen CJM, et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. *Blood.* 2010;116(1):113–21.
65. Lisman T, de Groot PG, Meijers JCM, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood.* 2004;105(3):1102–5.
66. Wichers IM, Tanck MWT, Meijers JCM, Lisman T, Reitsma PH, Rosendaal FR, et al. Assessment of coagulation and fibrinolysis in families with unexplained thrombophilia. *Thromb Haemost.* 2009;101(3):465–70.
67. O'Donnell J, Riddell A, Owens D, Handa A, Pasi J, Hamilton G, et al. Role of the Thrombelastograph as an adjunctive test in thrombophilia screening. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004;15(3):207–11.
68. Braekkan SK, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T, Størmer J, Hansen JB. Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study, Tromsø, Norway. *J Thromb Haemost.* 2010;8(1):157–62.
69. Weber M, Gerdtsen F, Gutensohn K, Schoder V, Eifrig B, Hossfeld DK. Enhanced platelet aggregation with TRAP-6 and collagen in platelet aggregometry in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2002;107(6):325–8.
70. Braekkan SK, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T, Hansen J-B. Hematocrit and risk of venous thromboembolism in a general population. The Tromsø study. *Haematologica.* 2010;95(2):270–5.
71. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini F, Broze G, Fedi S. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost.* 2010;103(04):749–56.
72. Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Lyman GH, Francis CW. Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood.* 2008;111(10):4902–7.
73. Rezende SM, Lijfering WM, Rosendaal FR, Cannegieter SC. Hematologic variables and venous thrombosis: Red cell distribution width and blood monocyte count are associated with an increased risk. *Haematologica.* 2014;99(1):194–200.
74. Zöller B, Melander O, Svensson P, Engström G. Red cell distribution width and risk for venous thromboembolism: A population-based cohort study. *Thromb Res.* 2014;133(3):334–9.
75. Eichinger S, Heinze G, Jandek LM, Kyrle PA. Risk assessment of recurrence in

- patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation*. 2010;121(14):1630–6.
76. Weiss N, Bernstein PS. Risk factor scoring for predicting venous thromboembolism in obstetric patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;182(5):1073–5.
77. Rogers SO, Kilaru RK, Hosokawa P, Henderson WG, Zinner MJ, Khuri SF. Multivariable predictors of postoperative venous thromboembolic events after general and vascular surgery: results from the patient safety in surgery study. *J Am Coll Surg*. 2007;204(6):1211–21.
78. Gearhart MM, Luchette FA, Proctor MC, Lutomski DM, Witsken C, James L, et al. The risk assessment profile score identifies trauma patients at risk for deep vein thrombosis. *Surgery*. 2000;128(4):631–40.
79. Zakai NA, Callas PW, Repp AB, Cushman M. Venous thrombosis risk assessment in medical inpatients: the medical inpatients and thrombosis (MITH) study. *J Thromb Haemost*. 2013;11(4):634–41.
80. Souto JC, Soria JM. Predicting individual risk of venous thrombosis. *Blood*. 2012;120(3):500–1.
81. Eichinger S, Heinze G, Jandeck LM, Kyrle PA. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation*. 2010;121(14):1630–6.
82. Heinemann LA, Dominh T, Assmann A, Schramm W, Schürmann R, Hilpert J, et al. VTE Risk assessment - a prognostic Model: BATER Cohort Study of young women. *Thromb J*. 2005;3(1):5.
83. Schreijer AJM, Reitsma PH, Cannegieter SC. High hematocrit as a risk factor for venous thrombosis. Cause or innocent bystander? *Haematologica*. 2010;95(2):182–4.
84. Mannucci PM. Red cells playing as activated platelets in thalassemia intermedia. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2149–51.
85. Whelihan MF, Mann KG. The role of the red cell membrane in thrombin generation. *Thromb Res*. 2013;131(5):377–82.
86. Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC, Balla G, Balla J, Jeney V. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. *Front Pharmacol*. 2014;5:94.
87. Zhou K, Zhao R, Geng Z, Jiang L, Cao Y, Xu D, et al. Association between B-group vitamins and venous thrombosis: systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Thromb Thrombolysis*. 2012;34(4):459–67.
88. Levy AP, Levy JE, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy NS, Asaf R, et al. Haptoglobin Genotype Is a Determinant of Iron, Lipid Peroxidation, and Macrophage Accumulation in the Atherosclerotic Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):134–40.
89. Vormittag R, Vukovich T, Mannhalter C, Minar E, Schönauer V, Bialonczyk C, et al. Haptoglobin phenotype 2-2 as a potentially new risk factor for spontaneous venous thromboembolism. *Haematologica*. 2005;1557–61.
90. Asleh R, Levy AP. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(1):19–28.
91. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819–35.
92. Herbert JM, Bernat A, Maffrand JP. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in the rat. *Blood*. 1992;80(9):2281–6.
93. Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, Yang JJ, De Meyer SF, Kollnberger M, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 2011;117(4):1400–7.
94. Dewilde WJM, Oirbans T, Verheugt FWA, Kelder JC, De Smet BJGL, Herrman

- J-P, et al. Use of clopidogrel with or without aspirin in patients taking oral anticoagulant therapy and undergoing percutaneous coronary intervention: an open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* (London, England). 2013;381(9872):1107–15.
95. Montoro-García S, Schindewolf M, Stanford S, Larsen OH, Thiele T. The Role of Platelets in Venous Thromboembolism. *Semin Thromb Hemost*. 2016;42(3):242–51.
96. Puurunen MK, Hwang S-J, O'Donnell CJ, Tofler G, Johnson AD. Platelet function as a risk factor for venous thromboembolism in the Framingham Heart Study. *Thromb Res*. 2017;151:57–62.
97. Hayes C, Kitahara S, Tcherniantchouk O. Decreased Threshold of Aggregation to Low-Dose Epinephrine is Evidence of Platelet Hyperaggregability in Patients with Thrombosis. *Hematol Rep*. 2014;6(3):5326.
98. Kushnir M, Cohen HW, Billett HH. Persistent neutrophilia is a marker for an increased risk of venous thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2016;42(4):545–51.
99. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: Is leukocytosis a causative factor? Vol. 114, *Blood*. 2009. p. 759–63.
100. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood*. 2012;120(10):2133–43.
101. Basavaraj MG, Brækkan SK, Brodin E, Østerud B, Hansen J-B. Monocyte count and procoagulant functions are associated with risk of venous thromboembolism: the Tromsø study. *J Thromb Haemost*. 2011;9(8):1673–6.
102. Gangat N, Strand J, Li CY, Wu W, Pardani A, Tefferi A. Leucocytosis in polycythemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *Br J Haematol*. 2007;138(3):354–8.
103. Palandri F, Polverelli N, Catani L, Ottaviani E, Baccarani M, Vianelli N. Impact of leukocytosis on thrombotic risk and survival in 532 patients with essential thrombocythemia: a retrospective study. *Ann Hematol*. 2011;90(8):933–8.
104. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819–35.
105. Dorsch CA. Binding of single-strand DNA to human platelets. *Thromb Res* . [cited 2019 Jan 5];24(1–2):119–29.
106. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, de Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136–44.
107. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. Vol. 32, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2012. p. 1777–83.
108. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting. *Int J Lab Hematol* . 2009 Jun [cited 2019 Mar 31];31(3):277–97.
109. Harrison P, Briggs C, Machin SJ. Platelet Counting. In: *Platelets and Megakaryocytes*. New Jersey: Humana Press; p. 029–46.
110. Mejor Opción S. XE-5000™ Sistema automatizado de hematología.. from: <https://www.sysmex.com/la/es/Products/Documents/XE-5000>
111. Horowitz GL, Zaman Z, Blanckaert NJC, Chan DW, Dubois JA, Golaz O, et al. Modular Analytics: A New Approach to Automation in the Clinical Laboratory. *J Autom Methods Manag Chem*. 2005;2005(1):8–25.
112. Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med*. 2001 Sep;138(3):152–63.
113. Johnston LR, Larsen PD, La Flamme AC, Harding SA. Methodological considerations for the assessment of ADP induced platelet aggregation using

- the Multiplate® analyser. *Platelets*. 2013;24(4):303–7.
114. Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W, Siess W. Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost. Schattauer Publishers*; 2006 Nov;96(6):781–8.
115. Souto JC, Almasy L, Muñoz-Díaz E, Soria JM, Borrell M, Bayén L, et al. Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII, and activated partial thromboplastin time. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(8):2024–8.
116. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood*. 2017;130(16):1795–9.
117. Eischer L, Tscholl V, Heinze G, Traby L, Kyrle PA, Eichinger S. Hematocrit and the Risk of Recurrent Venous Thrombosis: A Prospective Cohort Study. *Reitsma PH, editor. PLoS One*. 2012;7(6):e38705.
118. Dicato M. Venous thromboembolic events and erythropoiesis-stimulating agents: an update. *Oncologist* . 2008;13 Suppl 3(Supplement 3):11–5.
119. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet (London, England)* . 1978;2(8102):1219–22.
120. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moehr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* . 1998;91(1):288–94.
121. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Olson RE. Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in Hospitalized Patients with Sickle Cell Disease. *Am J Med*. 2006;119(10):897.e7-897.e11.
122. Novelli EM, Huynh C, Gladwin MT, Moore CG, Ragni M V. Pulmonary embolism in sickle cell disease: a case-control study. *J Thromb Haemost* . 2012;10(5):760–6.
123. Cappellini M, Robbiolo L, Bottasso B, Coppola R, Fiorelli G, Mannucci A. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. - PubMed - NCBI. *Br J Haematol*. 2000;111(2):467–73.
124. Schilling Rf, Gangnon Re, Traver Mi. Delayed adverse vascular events after splenectomy in hereditary spherocytosis. *J Thromb Haemost*. 2008;6(8):1289–95.
125. Lippi G, Buonocore R, Cervellin G. Value of Red Blood Cell Distribution Width on Emergency Department Admission in Patients With Venous Thrombosis. *Am J Cardiol*. 2016;117(4):670–5.
126. Khorana AA, Francis CW, Blumberg N, Culakova E, Refaai MA, Lyman GH. Blood transfusions, thrombosis, and mortality in hospitalized patients with cancer. *Arch Intern Med*. 2008;168(21):2377–81.
127. Kumar MA, Boland TA, Baiou M, Moussouttas M, Herman JH, Bell RD, et al. Red blood cell transfusion increases the risk of thrombotic events in patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2014;20(1):84–90.
128. Lowe GD, Lee AJ, Rumley A, Price JF, Fowkes FG. Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol*. 1997;96(1):168–73.
129. Holley L, Woodland N, Hung WT, Cordatos K, Reuben A. Influence of fibrinogen and haematocrit on erythrocyte sedimentation kinetics. *Biorheology*. 1999;36(4):287–97.
130. Rampling MW. The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. *Acta Biol Med Ger*. 1981;40(4–5):373–8.
131. Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1992;263(6):H1770–8.
132. Baskurt OK, Meiselman HJ. Iatrogenic hyperviscosity and thrombosis. *Semin*

- Thromb Hemost. 2012;38(8):854–64.
133. Errill EW. Rheology of blood. *Physiol Rev.* 1969 Oct;49(4):863–88.
134. Wandersee NJ, Olson SC, Holzhauser SL, Hoffmann RG, Barker JE, Hillery CA. Increased erythrocyte adhesion in mice and humans with hereditary spherocytosis and hereditary elliptocytosis. *Blood.* 2004;103(2):710–6.
135. Colin Y, Le Van Kim C, El Nemer W. Red cell adhesion in human diseases. *Curr Opin Hematol.* 2014 May;21(3):186–92.
136. Wautier JL, Pintigny D, Wautier MP, Paton RC, Galacteros F, Passa P, et al. Fibrinogen, a modulator of erythrocyte adhesion to vascular endothelium. *J Lab Clin Med.* 1983 J;101(6):911–20.
137. Hillery CA, Du MC, Montgomery RR, Scott JP. Increased adhesion of erythrocytes to components of the extracellular matrix: isolation and characterization of a red blood cell lipid that binds thrombospondin and laminin. *Blood.* 1996;87(11):4879–86.
138. Hermant P, Gane P, Huet M, Jallu V, Kaplan C, Sonneborn HH, et al. Red Cell ICAM-4 Is a Novel Ligand for Platelet-activated $\alpha_{IIb} \beta_3$ Integrin. *J Biol Chem.* 2003;278(7):4892–8.
139. Zennadi R, Hines PC, De Castro LM, Cartron J-P, Parise L V, Telen MJ. Epinephrine acts through erythroid signaling pathways to activate sickle cell adhesion to endothelium via LW-alpha β 3 interactions. *Blood.* 2004;104(12):3774–81.
140. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005;293(13):1653–62.
141. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood.* 1996;87(3):1179–87.
142. Walton BL, Lehmann M, Skorzewski T, Holle LA, Beckman JD, Cribb JA, et al. Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood.* 2017;129(18):2537–46.
143. Wandersee NJ, Tait JF, Barker JE. Erythroid phosphatidyl serine exposure is not predictive of thrombotic risk in mice with hemolytic anemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2000 Feb;26(1):75–83.
144. Cines DB, Lebedeva T, Nagaswami C, Hayes V, Massefski W, Litvinov RI, et al. Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin. *Blood.* 2014;123(10):1596–603.
145. Carr ME, Hardin CL. Fibrin has larger pores when formed in the presence of erythrocytes. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1987;253(5):H1069–73.
146. van Gelder JM, Nair CH, Dhall DP. The significance of red cell surface area to the permeability of fibrin network. *Biorheology.* 1994;31(3):259–75.
147. Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest.* 2012 J;122(7):2331–6.
148. Torisu T, Torisu K, Lee IH, Liu J, Malide D, Combs CA, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat Med.* 2013;19(10):1281–7.
149. Mehrabadi M, Casa LDC, Aidun CK, Ku DN. A Predictive Model of High Shear Thrombus Growth. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(8):2339–50.
150. Koupnova M, Kehrel BE, Corkrey HA, Freedman JE. Thrombosis and platelets: an update. *Eur Heart J.* 2016 ;ehw550.
151. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood.* 2015 Jul;126(5):582–8.
152. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell.* 1996;84(2):289–97.
153. Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of

- Neutrophils in Stroke. *J Immunol Res*. 2017;2017:5140679.
154. Faraday N, Schunke K, Saleem S, Fu J, Wang B, Zhang J, et al. Cathepsin G-Dependent Modulation of Platelet Thrombus Formation In Vivo by Blood Neutrophils. Zarbock A, editor. *PLoS One*. 2013;8(8):e71447.
155. Khan Mm, Motto Dg, Lentz Sr, Chauhan Ak. ADAMTS13 reduces VWF-mediated acute inflammation following focal cerebral ischemia in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(8):1665–71.
156. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
157. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007;176(2):231–41.
158. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):581–8.
159. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009;184(2):205–13.
160. Fuchs TA, Bhandari AA, Wagner DD. Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*. 2011;118(13):3708–14.
161. Brill A, Fuchs Ta, Savchenko As, Thomas Gm, Martinod K, De Meyer Sf, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136–44.
162. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6388–93.
163. Stavrou EX, Fang C, Bane KL, Long AT, Naudin C, Kucukal E, et al. Factor XII and uPAR upregulate neutrophil functions to influence wound healing. *J Clin Invest*. 2018;128(3):944–59.
164. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010;16(8):887–96.
165. de Los Reyes-García AM, Aroca A, Arroyo A, García-Barbera N, Vicente V, González-Conejero R, et al. Neutrophil extracellular trap components increase the expression of coagulation factors. *Biomed Reports*. 2019 J;10(3):195–201.
166. Noubouossie DF, Whelihan MF, Yu Y-B, Sparkenbaugh E, Pawlinski R, Monroe DM, et al. In vitro activation of coagulation by human neutrophil DNA and histone proteins but not neutrophil extracellular traps. *Blood*. 2017;129(8):1021–9.
167. Diaz JA, Fuchs TA, Jackson TO, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Henke PK, et al. Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2013;1(4):341–348.
168. Mauracher L-M, Posch F, Martinod K, Grilz E, Däullary T, Hell L, et al. Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *J Thromb Haemost*. 2018;16(3):508–18.
169. Kapoor S, Opneja A, Nayak L. The role of neutrophils in thrombosis. *Thromb Res*. 2018;170:87–96.
170. Chami N, Lettre G. Lessons and Implications from Genome-Wide Association Studies (GWAS) Findings of Blood Cell Phenotypes. *Genes (Basel)*. 2014;5(1):51–64.
171. Froguel P, Ndiaye NC, Bonnefond A, Bouatia-Naji N, Dechaume A, Siest G, et al. A Genome-Wide Association Study Identifies rs2000999 as a Strong Genetic Determinant of Circulating Haptoglobin Levels. Arking DE, editor. *PLoS One*. 2012;7(3):e32327.

172. McLaren CE, Barton JC, Eckfeldt JH, McLaren GD, Acton RT, Adams PC, et al. Heritability of serum iron measures in the hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) family study. *Am J Hematol.* 2010;85(2):101–5.
173. Njajou OT, Alizadeh BZ, Aulchenko Y, Zillikens MC, Pols HAP, Oostra BA, et al. Heritability of serum iron, ferritin and transferrin saturation in a genetically isolated population, the Erasmus Rucphen Family (ERF) Study. *Hum Hered* . 2006;61(4):222–8.
174. Souto JC, Remacha A, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of iron metabolism plasma phenotypes and their relationship with risk of thrombosis. *Haematologica.* 2003;88(12):1436–8.
175. Remacha AF, Souto JC, Rámila E, Perea G, Sarda MP, Fontcuberta J. Enhanced risk of thrombotic disease in patients with acquired vitamin B12 and/or folate deficiency: role of hyperhomocysteinemia. *Ann Hematol.* 2002;81(11):616–21.
176. Pabinger I, Thaler J, Ay C. Biomarkers for prediction of venous thromboembolism in cancer. *Blood.* 2013;122(12):2011–8.
177. Guillemot J, Canuel M, Essalmani R, Prat A, Seidah NG. Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: Proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology.* 2013;57(6):2514–24.
178. Fairweather-Tait SJ, Guile GR, Valdes AM, Wawer AA, Hurst R, Skinner J, et al. The contribution of diet and genotype to iron status in women: a classical twin study. Arez AP, editor. *PLoS One.* 2013;8(12):e83047.
179. Whelihan MF, Mooberry MJ, Zachary V, Bradford RL, Ataga KI, Mann KG, et al. The contribution of red blood cells to thrombin generation in sickle cell disease: meizothrombin generation on sickled red blood cells. *J Thromb Haemost.* 2013;11(12):2187–9.
180. Remacha AF, Souto JC, Soria JM, Buil A, Sardà MP, Lathrop M, et al. Genomewide linkage analysis of soluble transferrin receptor plasma levels. *Ann Hematol.* 2006;85(1):25–8.
181. Martinez C, Cohen AT, Bamber L, Rietbrock S. Epidemiology of first and recurrent venous thromboembolism: a population-based cohort study in patients without active cancer. *Thromb Haemost.* 2014 Aug;112(2):255–63.
182. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation.* 2003;107(23 Suppl 1):I4-8.
183. Prandoni P. Venous and arterial thrombosis: Two aspects of the same disease? Vol. 20, *European Journal of Internal Medicine.* 2009. p. 660–1.
184. Previtali E, Bucciarelli P, Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus. SIMTI Servizi;* 2011;9(2):120–38.
185. Vázquez-Santiago M, Ziyatdinov A, Pujol-Moix N, Brunel H, Morera A, Soria JM, et al. Age and gender effects on 15 platelet phenotypes in a Spanish population. *Comput Biol Med.* 2016;69:226–33.
186. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus. SIMTI Servizi;* 2011;9 Suppl 2(Suppl 2):s3-8.
187. Kamphuisen PW, Eikenboom JC, Bertina RM. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(5):731–8.
188. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133–48.
189. Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 2008 ;34(8):709–33.
190. Favaloro EJ. Utility of the PFA-100 for assessing bleeding disorders and monitoring therapy: a review of analytical variables, benefits and limitations. *Haemophilia.* 2001;7(2):170–9.
191. Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marcucci R, et al. Assessment of platelet function on whole blood by multiple electrode

- aggregometry in high-risk patients with coronary artery disease receiving antiplatelet therapy. *Am J Clin Pathol*. 2009;131(6):834–42.
192. Linden Md, Furman Mi, Frelinger Al, Fox MI, Barnard Mr, Li Y, et al. Indices of platelet activation and the stability of coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2007;5(4):761–5.
193. Tekgunduz E, Demir M, Akyol Erikci A, Akpinar S, Ozturk E, Kirkizlar O. Sticky platelet syndrome in patients with unexplained venous thrombosis. *Turkish J Hematol*. 2011;30(1):48–52.
194. Weitz JI, Lensing AWA, Prins MH, Bauersachs R, Beyer-Westendorf J, Bounameaux H, et al. Rivaroxaban or Aspirin for Extended Treatment of Venous Thromboembolism. *N Engl J Med*. 2017;1211–22.
195. Khajuria A, Houston DS. Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. *Blood*. 2000;96(3):966–72.
196. Go SI, Kim RB, Song HN, Kang MH, Lee US, Choi HJ, et al. Prognostic significance of the absolute monocyte counts in lung cancer patients with venous thromboembolism. *Tumor Biol*. 2015;36(10):7631–9.
197. Henke PK, Varga A, De S, Deatrick CB, Eliason J, Arenberg DA, et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):1130–7.
198. Henke PK, Pearce CG, Moaveni DM, Moore AJ, Lynch EM, Longo C, et al. Targeted deletion of CCR2 impairs deep vein thrombosis resolution in a mouse model. *J Immunol*. 2006;177(5):3388–97.
199. Ali T, Humphries J, Burnand K, Sawyer B, Bursill C, Channon K, et al. Monocyte recruitment in venous thrombus resolution. Vol. 43, *Journal of Vascular Surgery*. 2006. p. 601–8.
200. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2010;191(3):677–91.
201. Kimball AS, Obi AT, Diaz JA, Henke PK. The Emerging Role of NETs in Venous Thrombosis and Immunothrombosis. *Front Immunol*. 2016;7:236.
202. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, et al. Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. *Circ Re*. 2015;116(7):1182–92.
203. Seidman MA, Mitchell RN. Surgical Pathology of Small- and Medium-Sized Vessels. *Surg Pathol Clin*. 2012;5(2):435–51.
204. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. 2014;233(3):294–307.
205. Mikumo H, Yanagihara T, Hamada N, Harada E, Ogata-Suetsugu S, Ikeda-Harada C, et al. Neutrophil elastase inhibitor sivelestat ameliorates gefitinib-naphthalene-induced acute pneumonitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;486(1):205–9.
206. Aleman MM, Walton BL, Byrnes JR, Wolberg AS. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thromb Res*;133:S38–40.

10. ■ Annexos

10.1 Subvencions i ajuts rebuts:

Les investigacions realitzades en el projecte GAIT-2 i el projecte RETROVE s'han realitzat gràcies al recolzament de:

- FIS PI 11/0184
- FIS PI 12/00612
- FIS PI 15/0269
- Xarxa d'investigació cardiovascular RD12/0042/0032
- Premis AGAUR de la Generalitat de Catalunya: 2009 SGR/1147 i 2000 SGR/1240
- Col·laboració per part de Stago® Espanya.
- SAF 2008-08159 (2009-2011). Bases genéticas de la hemostasia primaria y su relación con la trombosis.

10.2 Articles publicats

Vilalta, N., & Souto, J. C. (2014). Investigación de la trombofilia venosa. Presente y futuro. *Angiología*, 66(4), 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.angio.2014.03.001>

Remacha, A. F., Vilalta, N., Sardà, M. P., Millón, J., Pujol-Moix, N., Ziyatdinov, A., ... Souto, J. C. (2016). Erythrocyte-related phenotypes and genetic susceptibility to thrombosis. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 59, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2016.04.006>

Vázquez-Santiago, M., Vilalta, N., Cuevas, B., Murillo, J., Llobet, D., Macho, R., ... Souto, J. C. (2018). Short closure time values in PFA-100® are related to venous thrombotic risk. Results from the RETROVE Study. *Thrombosis Research*, 169, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.07.012>

Vilalta N, Vázquez-Santiago M, Cuevas B, Macho R, Remacha A, Carrasco M, Mateo J, Millón J, Soria JM, S. J. (2017). The Relationship between Leukocyte Counts and Venous Thromboembolism: Results from RETROVE Study. *Biol Med (Aligarh)*, 9(400). <https://doi.org/doi:10.4172/0974-8369.1000400>

