



Universitat Autònoma de Barcelona

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>

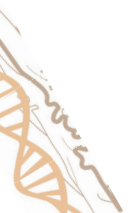


BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA

Tesis Doctoral

José María Romero Carro

Barcelona 2022





Universitat Autònoma
de Barcelona

TESIS DOCTORAL

"Bases genéticas de la enfermedad venosa crónica"

realizada por:
José María Romero Carro

Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas
Universitat Autònoma de Barcelona.

Directores de Tesis:

Dr. José Manuel Soria Fernández

Unitat de Genòmica de Malalties Complexes (UGMC).
Institut de Recerca Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, IIB-Sant
Pau.

Dr. Sergi Bellmunt Montoya

Cirurgia Vascolar, Cirurgia Endovascular i Angiologia
Hospital Universitari Vall d'Hebron
Professor Associat. Universitat Autònoma de Barcelona

Dr. Joan Carles Souto Andrés

Unitat de Trombosi i Hemostasia, Servei d'Hematologia -
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Tutor:

Dr. Vicenç Artigas Raventós
Profesor emèrit Departament Cirurgia UAB
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

CERTIFICADO



A mis abuelos por su cariño que siempre lo llevo en el corazón

A mi madre por estar siempre a mi lado cuidándome

A mi padre por darme la fuerza para llegar donde he llegado

A mi mujer por convertirme en el hombre que soy



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo nace en las montañas de Cataluña con el que ha sido y es mi amigo, director y compañero José Manuel Soria, sin él no estaría escribiendo estas líneas.

La ambición de Juan Carles Souto, que llevo a cabo el estudio GAIT-2, y el apoyo y las correcciones de Sergi Bellmunt han hecho posibles terminar esta tesis. Mi tutor Vicenç Artigas que me ha guiado en la tesis pero también en mi camino como cirujano, moltes gràcies Vicenç.

Doy gracias por tener la fortuna de trabajar con los mejores compañeros que puedo tener Jaume, Bego, Joan, Olga, Cris, Jordi ... siempre a mi lado y ayudándonos como una banda de moteros.

Gracias a ti José Roman Escudero ya que apostastes por mi desde el principio como persona y como profesional.

Siguiendo el ejemplo de Hipócrates agradezco a todos mis maestros el haberme guiado en mi camino, al "Jefe" Dr. Viver, a Josep Maria Mestres, a Jordi Latorre y como no a Tino Llagostera, una parte de vosotros siempre me acompañará.

A nivel personal agradecer a mi familia su apoyo incondicional. A mi hermano por ser mi alma gemela. A mi madre a quien cada día literalmente la quiero y valoro más. A mis hijos por mostrarme la felicidad verdadera. A ti Sebas por que sé que bajarías al infierno conmigo.

Y a ti Laura mi compañera, mi amante, mi amiga, ni némesis y mi vida.

Cierro una etapa de mi vida con vuestro apoyo

Gracias.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
DEFINICIONES	17
SUMARIO FIGURAS	21
SUMARIO TABLAS	23
RESUMEN	27
RESUM	29
SUMMARY	31
1. INTRODUCCIÓN	35
1.1 CONCEPTOS ANATÓMICOS	35
1.2 TERMINOLOGÍA FLEBOLÓGICA	36
1.3 CLASIFICACIÓN	38
1.4 CONCEPTOS FISIOPATOLÓGICOS	42
1.5 EPIDEMIOLOGÍA	43
1.5.1 <i>Epidemiología en España</i>	43
1.5.2 <i>Costes socio-sanitarios</i>	44
1.6 DIAGNÓSTICO	45
1.7 FACTORES DE RIESGO	46
1.7.1 <i>Edad</i>	46
1.7.2 <i>Sexo</i>	46
1.7.3 <i>Embarazo</i>	47
1.7.4 <i>Obesidad</i>	47
1.7.5 <i>Ortoestatismo</i>	48
1.7.6 <i>Enfermedad tromboembólica venosa y varices</i>	48
1.7.7 <i>Historia familiar</i>	50
1.8 ENFOQUE GENÉTICO EN EL ESTUDIO DE LA EVC	52
1.8.1 <i>Enfermedad Compleja</i>	53
1.8.2 <i>Heredabilidad</i>	54
1.8.3 <i>Fenotipos intermediarios</i>	54

1.8.4 Familias extensas (extended pedigrees)	55
1.8.5 Análisis de ligamiento	55
1.8.6 Estudio de asociación del genoma completo	56
1.9 EVOLUCION DEL CONCEPTO DE HERENCIA EN LA EVC	57
1.10 BASES GENÉTICAS DE LAS ALTERACIONES EN LA PARED VENOSA	58
1.11 GENES RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA	59
2. JUSTIFICACIÓN	63
3. HIPÓTESIS	67
4. OBJETIVOS	71
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL	71
4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	71
5. MATERIAL Y MÉTODOS	75
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	75
5.2 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSIÓN	77
5.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA	77
5.4 CONSENTIMIENTO INFORMADO	78
5.5 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS	78
5.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	79
5.7 ANÁLISIS GENÉTICOS	80
5.7.1 FENOTIPOS INTERMEDIARIOS	80
5.7.2 MEDICIÓN DE MARCADORES HEMOSTASIA	84
5.8 GENOTIPADO E IMPUTACIÓN	85
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
5.9.1 ESTUDIO DE COVARIABLES	86
5.9.2 HEREDABILIDAD	87
5.9.3 CORRELACIÓN GENÉTICA	87
6. RESULTADOS	91
6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	91
6.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A EVC	94
6.3 HEREDABILIDAD	95
6.4 CORRELACIÓN CON RASGOS FENOTÍPICOS HEMOSTÁSICOS	95

6.5 ASOCIACIÓN DE LA EVC CON GENES CANDIDATOS	98
6.6 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE TODO EL GENOMA (GWAS) CON LA EVC	103
6.7 CORRELACIÓN GENÉTICA CON OTRAS ENFERMEDADES	105
7. DISCUSIÓN	109
8. CONCLUSIONES	123
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS	127
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	127
PERSPECTIVAS DE FUTURO	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXOS	143



ABREVIATURAS

- CE:** Células Endoteliales
CML: Células Musculares Lisas
CEAP: Acrónimo de Clínica, Etiología, Anatomía y Patofisiología
DE: Desviación Estándar
EEII: Extremidades Inferiores
EP: Embolismo Pulmonar
ETV: Enfermedad Tromboembólica Venosa
EVC: Enfermedad Venosa Crónica
FvW: Factor de von Willebrand
GWAS: Siglas en inglés de Genome Wide Association Study (ver Definiciones)
h²: Heredabilidad
HRDC: Hoja de recogida de datos clínicos
IMC: Índice de Masa Corporal
IVC: Insuficiencia Venosa Crónica
SNP: Siglas en inglés de Single Nucleotide Polymorphism (ver Definiciones)
SVP: Sistema Venoso Profundo
SVS: Sistema Venoso Superficial
SPT: Síndrome Postrombótico
TVP: Trombosis Venosa Profunda
VSE: Vena Safena Externa
VSI: Vena Safena Interna
VVPP: Venas Perforantes



DEFINICIONES

Alelo: son las diferentes formas que puede tener un gen determinado (1). Estas diferencias pueden provocar modificaciones en la función del gen (por ejemplo tenemos alelos A, B y O, son los alelos del grupo sanguíneo). Los humanos somos diploides, tenemos un alelo del padre y otro de la madre (excepto los gametos), los *alelos* se ubican en el mismo *locus* del cromosoma.

Análisis Multilocus: El análisis de ligamiento se realiza con múltiples marcadores (análisis multilocus). Tenemos la posición cromosómica de los marcadores por lo que el score de la localización del locus que buscamos se analiza respecto a los marcadores que conocemos.

Curvas LOD score: Para diferentes fracciones de recombinación: Cuanta más alta sea la fracción de recombinación (es decir, cuanto más probable sea que dos loci se recombinen, lo cual significa que están muy alejados) más bajo será el LOD score (ya que si la fracción de recombinación es alta significa que están alejados y no se heredarán juntos por lo que el ligamiento será muy bajo).

Datos ómicos: es un neologismo proveniente del inglés (*Omics*) que en Biología Molecular se utiliza como sufijo para referirse al estudio de la totalidad o del conjunto de algo, como genes, proteínas, o incluso las relaciones entre ellos. Este sufijo deriva del griego *-oma* ωμα. que indica *conjunto* o *masa*. Las principales *ómicas* son la Genómica, Proteómica, Epigenómica y la Transcriptómica.

Epigenómica: Relación entre las influencias genéticas y ambientales que determinan un fenotipo. El epigenoma está formado por compuestos químicos y proteínas que pueden unirse al ADN y controlar la expresión genética según las necesidades celulares. El ADN no cambia y es el mismo en todas las células del organismo, la expresión diferencial de cada célula o de la misma célula según el ambiente es el epigenoma(2).

Fenotipo: Expresión del genotipo en función de un determinado ambiente (1). Un fenotipo es cualquier característica, rasgo observable o medible de un organismo. Algunos fenotipos están determinados por múltiples genes y además influenciados por el medio ambiente. La presencia o ausencia de una enfermedad puede considerarse un rasgo fenotípico.

Frecuencia alélica: también conocida como frecuencia génica es la proporción observada de un *alelo* específico respecto al total que puede ocupar un *locus* determinado en la población (1).



Gen: Conjunto de elementos del genoma que codifican para una proteína, junto con los elementos que regulan su transcripción a ARN mensajero

Genoma: Información genética que posee un organismo en particular. Es el conjunto de genes de cada organismo. Se estima que el número de genes codificantes de proteínas en la especie humana (*Homo Sapiens*) rondan los 20.000 (3)

Genotipo: Son los dos alelos de una posición concreta del genoma

GWAS: En genética, un estudio de asociación del genoma completo (en inglés, GWAS (*Genome-wide association study*) es un análisis de una variación genética (o millones de ellas) a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a un rasgo observable. Los GWAS suelen centrarse en asociaciones entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y rasgos como las principales enfermedades.

Haplotipos: *alelos* ubicados en *loci* muy próximos por lo que tienden a heredarse juntos (1). Combinación de *alelos* de diferentes *loci* de un cromosoma que son transmitidos juntos.

Locus: plural es *loci*. Posición fija en un cromosoma de un gen u otra secuencia de ADN donde reside la información para un rasgo determinado(1).

LOD score: (*Logarithm of the Odds*). Un ligamiento de dos *loci* se asume cuando la probabilidad a favor del ligamiento opuesta a la probabilidad en contra de ligamiento es igual o superior que la relación 1000 a 1 ($10^3:1$). El logaritmo de esta relación se llama LOD score. Cuanto más cerca se encuentren dos *loci* uno del otro más alto será el LOD score.

Modelo de umbral poligénico: Algunos rasgos que representan susceptibilidad para enfermedades tienen una distribución normal. Cuando la susceptibilidad excede el umbral se presenta la patología.

Polimorfismo genético: Un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población (1). Los polimorfismos pueden ser variaciones de varios nucleótidos con múltiples valores alternativos o un único nucleótido con dos valores distintos, en este último caso hablamos de *Single Nucleotide Polimorphism* (SNP)

Quantitative Trait Locus (QTL): Zona del genoma de dimensión indefinida en la que se sospecha la existencia de una o varias variantes que determinan la variación de un fenotipo en una escala cuantitativa continua.

Recombinación: La recombinación genética es el proceso por el cual una hebra de material genético (usualmente ADN, pero también puede ser ARN) se corta y luego se une a una molécula de material genético diferente (1). Las células sexuales contienen una copia del genoma, en lugar de las dos que contienen el resto de células del organismo. Esta copia se realiza durante la meiosis cuando se cortan y pegan juntos segmentos de ADN de gran tamaño, lo que provoca que loci que principio estaban alejados se copien juntos. La frecuencia de recombinación es mayor cuanto más distancia haya entre loci.

SNPs: *single nucleotide polymorphism*. Variación en la secuencia de ADN que afecta a una base (o algunos nucleótidos). Tiene que afectar por lo menos al 1% de la población. Constituyen el 90% de todas las variaciones genómicas humanas. Éstas variaciones pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, tóxicos, virus, tratamientos,...

Transcriptómica: La ciencia que estudia la expresión del ADN. Los mecanismos que actúan en su expresión constituyen la transcripción. Algunos genes contienen las instrucciones para la síntesis de proteínas, pero para que esto suceda estos genes deben leerse y transcribirse en forma de ARNm. Estas "lecturas" de genes codificantes se llaman transcritos y un transcriptoma es una colección de todas las lecturas de genes presentes en una célula (4).



SUMARIO FIGURAS

<i>Figura 1: Clasificación CEAP. Adaptado de Eklof ⁽¹²⁾</i>	38
<i>Figura 2. A) Modelo dicotómico. B) Modelo umbral de susceptibilidad para enfermedades complejas</i>	54
<i>Figura 3: Fases del estudio</i>	76
<i>Figura 4: Diseño del estudio</i>	76
<i>Figura 5: Distribución por sexos de la muestra</i>	91
<i>Figura 6: Distribución por sexo de los afectados por la enfermedad venosa crónica</i>	92
<i>Figura 7: Distribución de los casos de enfermedad venosa crónica en las familias analizadas. 0: sanos, 1: afectados</i>	93
<i>Figura 8: Distribución de edad según presencia de enfermedad venosa crónica. (0: sanos, 1: afectados, NA: no analizados)</i>	94
<i>Figura 9: Distribución de los niveles de antitrombina III según sexo entre casos y controles</i>	96
<i>Figura 10: Distribución de los niveles de vitamina 12 según sexo entre casos y controles</i>	96
<i>Figura 11: Distribución de los niveles de creatinina según sexo entre casos y controles</i>	97
<i>Figura 12: Manhattan plot</i>	104

SUMARIO TABLAS

<i>Tabla 1: Fenotipos plasmáticos de la hemostasia y la inflamación.</i>	80
<i>Tabla 2: SNPs relacionados con la trombosis.</i>	84
<i>Tabla 3: Distribución de la muestra según clasificación CEAP para la EVC.</i> ...	92
<i>Tabla 4: Factores de riesgo relacionados con la enfermedad venosa crónica.</i> ...	94
<i>Tabla 5: Relación entre enfermedad venosa crónica (EVC) y sexo</i>	95
<i>(siendo 0 ausencia de EVC y 1 presencia). F: femenino, M: masculino.</i>	95
<i>Tabla 6: Asociación de la enfermedad venosa crónica con 101 SNPs relacionados con la coagulación y el sistema ABO.</i>	98
<i>Tabla 7: Relación del alelo A del gen ABO con la enfermedad venosa crónica.</i>	102
<i>Tabla 8: Efecto del número de alelos A del ABO en la enfermedad venosa crónica.</i>	102
<i>Tabla 9: Relación del alelo O del gen ABO con la enfermedad venosa crónica.</i>	102
<i>Tabla 10: Efecto del número de alelos O del ABO en la enfermedad venosa crónica.</i>	103
<i>Tabla 11: Resultado del GWAS.</i>	103
<i>Tabla 12: Correlación genética entre la EVC y otras patologías recogidas en los sujetos estudiados.</i>	105
<i>Tabla 13: Principales single nucleotide polymorphisms (SNPs) relacionados con varices identificados en GWAs realizados en estudios previos. Se muestran los efectos biológicos de los genes localizados en las proximidades de los SNPs. “1 - 23andMe” results (119)/ 2 - Ellinghaus et al (133)/3 - Fukaya (120)</i>	119





RESUMEN

Título: Bases genéticas de la Enfermedad Venosa Crónica

Doctorando: José María Romero Carro

RESUMEN

Introducción:

La enfermedad venosa crónica (EVC) es una de las patologías más prevalentes en nuestra sociedad, ocasionando importantes costes socioeconómicos y sanitarios. Su etiología es desconocida, proponiéndose factores de riesgo como la edad, sexo, obesidad o antecedentes familiares. Clásicamente se ha dado como cierto el componente familiar, pero su relación con la enfermedad tromboembólica venosa (EDEV) es controvertida. Pretendemos demostrar que existe suficiente evidencia para confirmar el origen genético de la EVC y su relación con la EDEV.

Justificación Científica:

No existe hasta la fecha ningún estudio realizado en familias extensas donde se demuestre origen genético de la EVC. No se ha podido demostrar la relación genética entre EVC y EDEV. Estos resultados pueden ofrecer un nuevo enfoque a ambas patologías y nuevas vías de investigación.

Hipótesis:

- La EVC es una enfermedad multifactorial y compleja cuyo desarrollo y progresión depende de factores ambientales y genéticos, siendo los factores genéticos el elemento preponderante.
- Existen variantes genéticas concretas asociadas a un aumento del riesgo de EVC.
- Existe una relación entre la EVC y la EDEV con una base genética común que influye en la predisposición a padecer ambas patologías.

Objetivos:

- Estimar la heredabilidad de la EVC en un estudio de familias extensas.

- Identificar genes que participen en la variabilidad de fenotipos, asociados a la predisposición a presentar EVC, mediante el análisis del genoma completo.
- Realizar un análisis de asociación de todo el genoma, determinando el mecanismo de acción de las variantes genéticas identificadas.
- Analizar las correlaciones genéticas y ambientales entre la EVC y la ETEV utilizando fenotipos intermediarios relacionados.

Diseño del estudio:

Estudio de cohortes en familias extensas prospectivo, observacional, analítico y unicéntrico. Para los estudios genéticos en familias extensas no se puede calcular el tamaño muestral ya que no podemos prever los efectos ni los genes implicados en la patología estudiada.

Resultados:

La muestra consistió en 895 individuos. Fueron diagnosticados de EVC 60, 39 mujeres (65%) y 21 hombres (35%). Entre las variables poblacionales analizadas mostraron una relación estadísticamente significativa con la EVC la edad ($p=2,3 \times 10^{-6}$), y el sexo ($p=0,008$). La heredabilidad (h^2) de la EVC fue del 78% ($p=2,75 \times 10^{-8}$). En los fenotipos de la hemostasia se correlacionaron genéticamente la antitrombina III (ATIII_f) ($R_{hog} = -0,444$; $p = 0,0045$), la creatinina ($R_{hog} = 0,29$; $p = 0,04$) y la vitamina B12 ($R_{hog} = 0,16$; $p = 0,048$). Se encontró una significación estadística con los SNPs relacionados con la coagulación y el sistema ABO: rs5985 ($p = 0,016$), rs657152 ($p=0.009$), rs11925694 ($p=0.016$), rs10965243 ($p=0.016$), rs932206 ($p=0.03$), rs7901695 ($p=0.03$), rs2036914 ($p=0.03$). La presencia del alelo A del gen ABO se relaciona con EVC (9.42% vs 3.48%, $p=0.002$), si son dos alelos A aumenta la prevalencia (12.15% vs 8.67%, $p=0.012$). Los portadores de un alelo O tuvieron menos EVC que los que no tienen ninguno (5.76% vs 11.8%, $p=0.0032$), el efecto es aditivo, la presencia de dos alelos O tenía un efecto protector mayor (3.83% vs 7.06%, $p=0.00042$). En el Estudio de Asociación de todo el Genoma (GWAS) se analizaron 10.333.120 SNPs, de ellos 16 mostraron una significación estadística con una $p=10^{-7}$. Se encontró una clara correlación genética entre la EVC y la ETEV ($\rho_g = 0.80$, con una $p = 0.0069$).

Conclusiones:

Los resultados obtenidos confirman una heredabilidad de la EVC del 78%, una de las más altas conocidas, demostrando la importancia del componente genético en su etiología.

La ausencia de genes directamente relacionados con la aparición de la EVC parece indicar la presencia de interacciones de múltiples factores genéticos a pequeña escala. La gran correlación genética hallada entre EVC y ETEV indica la existencia de un sustrato genético común entre ambas patologías.

Títol: Bases genètiques de la Malaltia Venosa Crònica

Doctorant: Josep Maria Romero Carro

RESUM

Introducció:

La malaltia venosa crònica (EVC) és una de les patologies més prevalents a la nostra societat, ocasionant importants costos socioeconòmics i sanitaris. La seva etiologia és desconeguda, i es proposa factors de risc com l'edat, el sexe, l'obesitat o els antecedents familiars. Clàsicament s'ha donat com a cert el component familiar, però la seva relació amb la malaltia tromboembòlica venosa (EDEV) és controvertida. Pretenem demostrar que hi ha prou evidència per confirmar l'origen genètic de l'EVC i la relació amb l'EDEV.

Justificació Científica:

No hi ha fins ara cap estudi realitzat en famílies extenses on es demostrï origen genètic de l'EVC. No hem pogut demostrar la relació genètica entre EVC i EDEV. Aquests resultats poden oferir un nou enfocament a les dues patologies i noves vies de recerca.

Hipòtesi:

- L'EVC és una malaltia multifactorial i complexa el desenvolupament i la progressió de la qual depèn de factors ambientals i genètics, i els factors genètics són l'element preponderant.
- Hi ha variants genètiques concretes associades a un augment del risc d'EVC.
- Hi ha una relació entre l'EVC i l'EDEV amb una base genètica comuna que influeix en la predisposició a patir les dues patologies.

Objectius:

- Estimar l'heretabilitat de l'EVC a un estudi de famílies extenses.
- Identificar gens que participin a la variabilitat de fenotips, associats a la predisposició a presentar EVC, mitjançant l'anàlisi del genoma complet.

- Realitzar una anàlisi d'associació de tot el genoma, determinant el mecanisme d'acció de les variants genètiques identificades.
- Analitzar les correlacions genètiques i ambientals entre l'EVC i l'ETEV utilitzant fenotips intermediaris relacionats.

Disseny de l'estudi:

Estudi de cohorts en famílies extenses prospectiu, observacional, analític i unicèntric. Per als estudis genètics en famílies extenses no es pot calcular la mida mostral, ja que no podem preveure els efectes ni els gens implicats en la patologia estudiada.

Resultats:

La mostra va consistir en 895 individus. Van ser diagnosticats de EVC 60, 39 dones (65%) i 21 homes (35%). Entre les variables poblacionals analitzades van mostrar una relació estadísticament significativa amb l'EVC l'edat ($p=2,3 \times 10^{-06}$), i el sexe ($p=0,008$). L'heretabilitat (h^2) de l'EVC va ser del 78% ($p=2,75 \times 10^{-8}$). En els fenotips de l'hemostàsia es van correlacionar genèticament l'antitrombina III (ATIII_f) (Rhog = -0,444; $p = 0,0045$), la creatinina (Rhog = 0,29; $p = 0,04$) i la vitamina B12 (Rhog = 0,16; $p = 0,048$). Es va trobar una significació estadística amb els SNPs relacionats amb la coagulació i el sistema ABO: rs5985 ($p = 0,016$), rs657152 ($p=0.009$), rs11925694 ($p=0.016$), rs10965243 ($p=0$), rs7901695 ($p=0.03$), rs2036914 ($p=0.03$). La presència de l'al·lel A del gen ABO es relaciona amb EVC (9.42% vs 3.48%, $p=0.002$), si són dos al·lells A augmenta la prevalença (12.15% vs 8.67%, $p=0.012$). Els portadors d'un al·lel O van tenir menys EVC que els que no en tenen cap (5.76% vs 11.8%, $p=0.0032$), l'efecte és additiu, la presència de dos al·lells O tenia un efecte protector més gran (3.83% vs 7.06%, $p=0.00042$). A l'Estudi d'Associació de tot el Genoma (GWAS) es van analitzar 10.333.120 SNPs, dels quals 16 van mostrar una significació estadística amb una $p=10^{-7}$. Es va trobar una correlació genètica clara entre l'EVC i l'ETEV ($\rho_g = 0.80$, amb una $p = 0.0069$).

Conclusions:

Els resultats obtinguts confirmen una heretabilitat de l'EVC del 78%, una de les més altes conegudes, demostrant la importància del component genètic a la seva etiologia.

L'absència de gens directament relacionats amb l'aparició de l'EVC sembla indicar la presència d'interaccions de múltiples factors genètics a petita escala. La gran correlació genètica trobada entre EVC i ETEV indica que hi ha un substrat genètic comú entre les dues patologies.

Title: Genetic bases of Chronic Venous Disease

Doctorant: Josep Maria Romero Carro

SUMMARY

Introduction:

Chronic venous disease (CVD) is one of the most prevalent pathologies in our society, causing significant socioeconomic and health costs. Its etiology is unknown, proposing risk factors such as age, sex, obesity or family history. Classically, the familial component has been considered true, but its relationship with venous thromboembolic disease (VTE) is controversial. We intend to demonstrate that there is sufficient evidence to confirm the genetic origin of CVD and its relationship with VTE.

Scientific Justification:

To date, there is no study carried out in extended families that demonstrates the genetic origin of CVD. The genetic relationship between CVD and TEEV has not been demonstrated. These results may offer a new approach to both pathologies and new avenues of research.

Hypothesis:

- CVD is a multifactorial and complex disease whose development and progression depend on environmental and genetic factors, with genetic factors being the predominant element.
- There are specific genetic variants associated with an increased risk of CVD.
- There is a relationship between CVD and VTE with a common genetic basis that influences the predisposition to suffer from both pathologies.

Goals:

- Estimate the heritability of CVD in a study of extended families.
- Identify genes that participate in the variability of phenotypes, associated with the predisposition to present CVD, through the analysis of the complete genome.

- Perform an association analysis of the entire genome, determining the mechanism of action of the identified genetic variants.
- Analyze the genetic and environmental correlations between CVD and VTE using related intermediate phenotypes.

Study design:

Cohort study in extended families prospective, observational, analytical and single center. For genetic studies in extended families, the sample size cannot be calculated since we cannot predict the effects or the genes involved in the pathology studied.

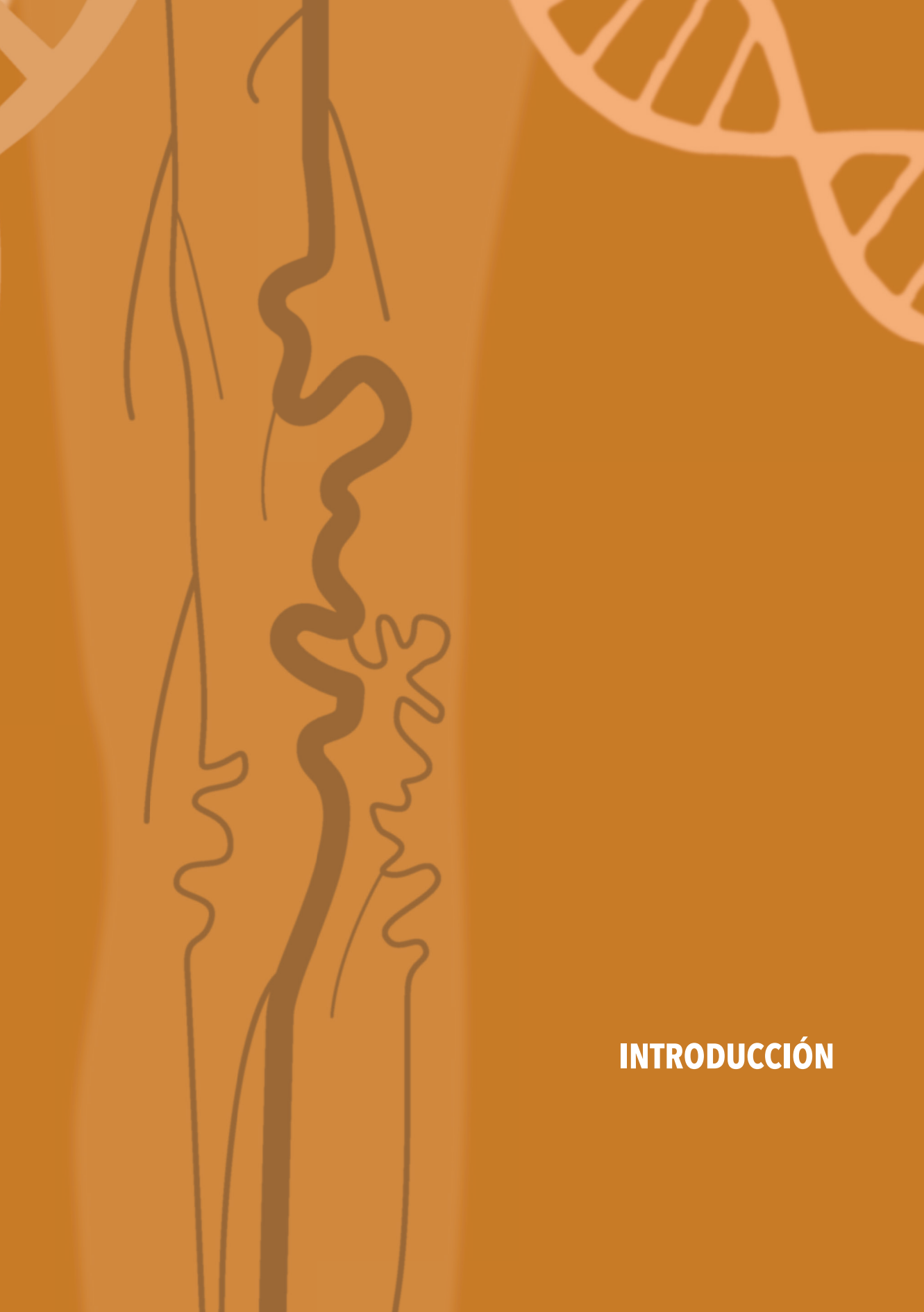
Results:

The sample consisted of 895 individuals. 60 were diagnosed with CVD, 39 women (65%) and 21 men (35%). Among the population variables analyzed, age ($p=2.3 \times 10^{-06}$), and sex ($p=0.008$) showed a statistically significant relationship with CVD. The heritability (h^2) of CVD was 78% ($p=2.75 \times 10^{-8}$). Antithrombin III (fATIII) ($R_{hog} = -0.444$; $p = 0.0045$), creatinine ($R_{hog} = 0.29$; $p = 0.04$), and vitamin B12 ($R_{hog} = 0.16$, $p = 0.048$). Statistical significance was found with the SNPs related to coagulation and the ABO system: rs5985 ($p = 0.016$), rs657152 ($p = 0.009$), rs11925694 ($p = 0.016$), rs10965243 ($p = 0.016$), rs932206 ($p = 0.03$).), rs7901695 ($p=0.03$), rs2036914 ($p=0.03$). The presence of the A allele of the ABO gene is related to CVD (9.42% vs 3.48%, $p=0.002$), if there are two A alleles the prevalence increases (12.15% vs 8.67%, $p=0.012$). Carriers of one O allele had fewer CVDs than those without (5.76% vs 11.8%, $p=0.0032$), the effect is additive, the presence of two O alleles had a greater protective effect (3.83% vs 7.06%, $p=0.00042$). In the Genome-Wide Association Study (GWAS), 10,333,120 SNPs were analyzed, of which 16 showed statistical significance with $p=10^{-7}$. A clear genetic correlation was found between CVD and VTE ($\rho_g = 0.80$, $p = 0.0069$).

Conclusions:

The results obtained confirm a heritability of CVD of 78%, one of the highest known, demonstrating the importance of the genetic component in its aetiology.

The absence of genes directly related to the appearance of CVD seems to indicate the presence of interactions of multiple genetic factors on a small scale. The great genetic correlation found between CVD and VTE indicates the existence of a common genetic substrate between both pathologies.



INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

Dos características anatómicas del ser humano han sido muy importantes en la evolución de nuestra especie. La primera ha sido la anatomía de la mano que nos permite usar la pinza con el pulgar, haciendo posible el desarrollo de tecnologías que han ayudado a nuestra evolución como especie. La segunda es la bipedestación. Así la posición erecta permitió a los homínidos una relación diferente con su entorno, liberando sus extremidades superiores para poder usarlas en la fabricación de herramientas ayudándoles a adaptarse al medio. No obstante, la posición erecta trajo consigo la aparición de una patología nueva, la enfermedad venosa crónica (EVC) por el efecto de la gravedad sobre la columna de presión hidrostática en el sistema venoso.

La EVC agrupa una serie de manifestaciones clínicas que van desde problemas puramente estéticos, varices y edema hasta lesiones tisulares con importante repercusión en la calidad de vida del paciente.

1.1 CONCEPTOS ANATÓMICOS

El sistema venoso es el encargado de retornar la sangre desde los tejidos hasta las cavidades derechas del corazón. En las extremidades inferiores existen dos circuitos venosos en paralelo: el sistema venoso profundo (SVP) y el sistema venoso superficial (SVS), ambos interconectados por un tercer sistema, el de las venas perforantes (VVPP)(5, 6).

El sistema venoso profundo es la vía principal de retorno del sistema venoso y en condiciones normales es el responsable del retorno del 90% de la sangre al corazón. Sus venas están incluidas entre la musculatura (intraaponeuróticas) y siguen el trayecto del sistema arterial con el que comparten denominación. En la pierna solemos encontrar dos venas acompañando a la arteria mientras que en el muslo suele haber una única vena (5, 6).

El sistema venoso superficial siempre discurre en un plano superficial respecto a la aponeurosis y drenan el 10% de la sangre venosa de la extremidad inferior. Existen tres sistemas principales.

1. El sistema de la vena safena interna (7) o *safena magna* que nace en las venas de la planta del pie, formando un tronco único a nivel de la parte anterior del maléolo interno. Es la vena más larga del cuerpo humano, siendo su diámetro normal de unos 6 mm a nivel del cayado, y posee entre 6 y 14 válvulas, situadas a intervalos de unos 10 cm. En este largo trayecto recibe numerosas colaterales

tanto del sistema safeno externo como de venas perforantes. Se extiende hasta la ingle, donde se une a la vena femoral a través de la fosa oval, 2-3 cm por debajo del ligamento inguinal, a esta estructura se le conoce como cayado safeno-femoral (5, 6).

2. El sistema de la vena safena externa (VSE) o *safena parva* se origina en las venas del pie, formándose un tronco único en la zona posterior del maléolo externo. Se extiende por la parte posterior de la pierna, recibiendo perforantes y colaterales, hasta drenar en la vena poplítea a nivel del hueco poplíteo formando el cayado safeno-poplíteo. (5, 6).
3. El sistema comunicante o de la *venas perforantes* es el encargado de conducir la sangre del sistema superficial al profundo, perforando la aponeurosis. Existe una gran variación anatómica en su número y su localización, excepto para los dos sistemas perforantes más importantes que son el cayado de la safena interna a nivel inguinal y el cayado de la vena safena externa a nivel retrogenicular ya que estas perforantes tienen una anatomía muy constante.

Las válvulas venosas son una de las características de las venas de las extremidades inferiores (EEII), facilitando el retorno venoso al asegurar la correcta dirección y sentido del flujo venoso. Desde el punto de vista anatómico-patológico las válvulas son las principales responsables de los trastornos venosos. Aparecen hacia el tercer mes de gestación y suelen ser bicúspides. Tienen forma cóncava y están tapizadas de endotelio. El flujo venoso en sístole muscular se dirige hacia la parte convexa de la válvula, abriéndola y permitiendo el paso del flujo. Cuando se produce el reflujo venoso en diástole muscular, el flujo venoso incide en la parte cóncava de la válvula cerrándola. Encontramos válvulas de primer orden, con paredes muy resistentes, y las de segundo orden, con paredes más débiles. También las clasificamos en parietales (en el trayecto del vaso) u ostiales (en los confluentes) (5, 6).

1.2 TERMINOLOGÍA FLEBOLÓGICA

Es indispensable el uso de una terminología uniforme para hablar de la patología venosa, para permitir el desarrollo de vías de investigación que puedan intercambiar y comparar resultados, así como un lenguaje común libre de interpretaciones subjetivas.

Es la aparición del VEIN-TERM (8) redactado con la colaboración del *American Venous Forum*, el *European Venous Forum*, la *International Union of Phlebology*, el *American College of Phlebology* y la *International Union of Angiology*, en febrero del 2009, el que pone las bases para el uso uniforme de los términos venosos. Las definiciones y conceptos más importantes y que se repetirán durante este trabajo son:

- *Trastorno venoso crónico*. Este término incluye todo el espectro de alteraciones del sistema venoso, tanto morfológicas como funcionales.
- *Enfermedad venosa crónica (EVC)*. Cualquier alteración morfológica o funcional del sistema venoso de larga duración y manifestada por cualquiera de sus signos y/o síntomas, indicando la necesidad de estudios y/o tratamiento.
- *Insuficiencia venosa crónica (IVC)*. Este término se reserva para estadios avanzados de la EVC. Esto correspondería a alteraciones funcionales del sistema venoso que cursan con edema, cambios cutáneos o úlceras venosas. Este término se reserva para los casos de mayor gravedad.
- *Síntomas venosos*. Molestias relacionadas con la enfermedad venosa, que pueden incluir hormigueo, dolor, ardor, calambres musculares, hinchazón, sensación de pulsatilidad o pesadez, prurito cutáneo, piernas inquietas o cansadas. Aunque no son patognómicos, estos pueden ser sugestivos de EVC, en particular si se ven agravados por el calor o la bipedestación a lo largo del día, y se alivia con el reposo de la pierna y / o elevación. Dado que estos síntomas pueden ser muy subjetivos, es importante realizar estudios diagnósticos objetivos para poder atribuirlos a problemas venosos.
- *Signos venosos*. manifestaciones visibles de trastornos venosos, que incluyen venas dilatadas (telangiectasias, venas reticulares, venas varicosas), edema de la pierna, cambios en la piel, úlceras.
- *Síndrome postrombótico (SPT)*. Conjunto de signos y/o síntomas venosos crónicos como consecuencia de una trombosis venosa profunda (TVP) y sus secuelas.
- *Incompetencia valvular venosa*. Disfunción de la válvula venosa que provoca el flujo venoso retrógrado de duración anormal.
- *Reflujo venoso*. Flujo venoso retrógrado con un tiempo de reflujo mayor de 500 milisegundos (0,5 segundos) en safenas, tibiales, femoral profunda y perforantes y un tiempo de 1 segundo en femoral común y poplítea, según los criterios publicados por la American Venous Forum (9)
 - *Primario*: Causado por disfunción valvular idiopática.
 - *Secundario*: Causada por trombosis, traumatismos, o por etiología térmica, química o mecánica.
 - *Congénito*: causada por la ausencia o desarrollo anormal de las válvulas venosas.

1.3 CLASIFICACIÓN

La EVC comprende una gran cantidad de signos y síntomas, los cuales provocan una multitud de cuadros clínicos que difieren tanto en el origen como en la gravedad de la afectación.

La clasificación CEAP, acrónimo de clínica (C), etiología (E), anatomía (A) y patofisiología (P) permite clasificar la EVC, ofrece un estándar para realizar el diagnóstico, permitiendo el estadiaje de la afectación ofreciendo una escala de gravedad (Figura 1). Es además una herramienta que permite mejorar el intercambio científico al ofrecer un lenguaje común a los investigadores (10-13). Publicada por Porter et al. en el año 1995 (10), esta clasificación ha sufrido diversas modificaciones y mejoras. En el año 2003 se recogieron las conclusiones de la reunión del consenso realizado en Roma en el año 2001(11, 13). La última revisión oficial fue publicada por B. Eklof en el año 2004 (12).

La clasificación CEAP incluye todos los grados de la patología venosa, tanto morfológicos como funcionales según el esquema siguiente:

La letra C evalúa los hallazgos clínicos	
C0	no hay signos visibles o palpables de lesión venosa
C1	presencia de telangiectasias o venas reticulares
C2	varices
C3	edema
C4	cambios cutáneos relacionados con la patología venosa (p.Ej: pigmentación, lipodermatosclerosis...) sin ulceración
4a	Pigmentación o eccema
4b	Lipodermatosclerosis o atrofia blanca: mayor predisposición para el desarrollo de úlceras venosas
C5	cambios cutáneos con úlcera cicatrizada
C6	cambios cutáneos con úlcera activa
Después del número se escribe la letra "A" si el paciente está asintomático y "S" si presenta síntomas	
La letra E se refiere a la etiología	
Ec	enfermedad congénita
Ep	enfermedad primaria o sin causa conocida
Es	enfermedad secundaria o con causa conocida (p. Ej: postraumatismo, Síndrome Postrombótico...)
La A describe los hallazgos anatómicos encontrados con el Eco-Doppler.	
Venas superficiales (As)*	
Venas profundas (Ap)*	
Venas perforantes*	
* Se añade un número en función de la vena afectada	
La P hace referencia a la fisiopatología	
PR	reflujo
PO	obstrucción
PR,O	ambos

Figura 1: Clasificación CEAP. Adaptado de Eklof⁽¹²⁾



En la clasificación CEAP, la “C” de clínica es la más utilizada, llegando a ser utilizada en la práctica clínica habitual como el único apartado, sin tener en cuenta los demás. La definición de la clase clínica es el primer paso para llegar a un plan de tratamiento. Determina la necesidad de realizar más estudios, ya que en los casos leves se podría optar por un tratamiento conservador mientras que en estadios avanzados obliga a realizar pruebas diagnósticas encaminadas a su reparación quirúrgica.

Según la última revisión de la clasificación del año 2004(12) se define como:

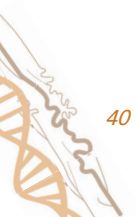
- **C0.** La ausencia de signos visibles o palpables de enfermedad venosa.
- **C1.** La presencia de:
 - *Teleangiectasia o araña vascular.* “Vena intradérmica dilatada de menos de 1 mm”.
 - *Vena reticular.* “Vena subdérmica azulada y tortuosa , de 1 a 3 mm”.
 - *Corona flebotásica o “corona Phlebectatica”.* “Se refiere a la aparición, en forma de “abanico” o “corona” de numerosos venas de pequeño calibre, intradérmicas, en la cara medial o caras laterales de tobillo y pie. Se cree que se trata de un signo temprano de enfermedad venosa”.
- **C2.** La presencia de:
 - *Vena varicosa.* “Vena subcutánea dilatada de 3 mm de diámetro o más, con el paciente en bipedestación. Puede afectar a las venas safenas o a sus colaterales”.
- **C3.** La presencia de:
 - *Edema.* “Acumulación de líquido a nivel subcutáneo intersticial. El nivel de afectación es de distal a proximal, empezando por el tobillo y puede afectar a toda la extremidad”.
- **C4.** La presencia de cambios en la piel y/o en el tejido celular subcutáneo secundarios a la enfermedad venosa crónica. Se subdivide en dos grupos como consecuencia de la diferencia de gravedad que suponen las dos categorías:
 - C4a:
 - *Pigmentación.* “Coloración ocre del tejido cutáneo y subcutáneo secundaria a la extravasación de elementos formes sanguíneos con depósitos de hemosiderina”.
 - *Eccema.* “Lesión roja, descamativa y pruriginosa que se localiza en los trayectos varicosos y sobretudo en los tercios inferiores de la piernas, sobre las zonas maleolares internas”.

- C4b:
 - *Lipodermatoesclerosis*: “Inflamación con fibrosis de la piel y del tejido celular subcutáneo de la pierna que se puede acompañar de degeneración o contractura de los tejidos profundos, con pigmentación pardusca y oscurecimiento de la piel”.
 - *Atrofia blanca*: “Lesión cutánea dermoepidérmica caracterizada por la presencia de tejido atrófico cicatricial de color blanquecino rodeado de halo hiperpigmentado y acompañado de algunas teleangiectasias, que suele aparecer en las zonas maleolares. No debe confundirse con la úlcera cicatrizada”.
- **C5**. La presencia de:
 - *Úlcera venosa curada*: cuando el paciente presentó una solución de continuidad en la piel de causa venosa (úlceras venosas) pero que en la actualidad está curada.
- **C6**. La presencia de :
 - *Úlcera venosa activa*: Es la lesión más grave de la patología venosa. “Existe una solución de continuidad de los tejidos, más frecuentemente en región supramaleolar interna, de bordes irregulares y fondo mamelonado, y que acostumbra a estar rodeada de hiperpigmentación y/o eccema. Es dolorosa, irregular, con tendencia a la infección, la persistencia y la recidiva”.

Después de definir la clasificación clínica, subclasifica el estado clínico como sintomático (S) o asintomático (A). Esta sintomatología suele empeorar con el calor, con la bipedestación prolongada y a medida que avanza el día. El definir el estado sintomático del individuo es un punto de extrema importancia en la práctica clínica habitual ya que es una herramienta para priorizar la atención de los pacientes.

El apartado “**E**” se refiere a la “Etiología”

- **Ep**: Nos referimos a primaria cuando no existe desencadenante conocido.
- **Es**: Nos referimos a secundaria cuando la causa es conocida, como por ejemplo una malformación venosa o por una TVP.
- **En**: Cuando no encontramos una causa venosa que justifique el cuadro.



La “**A**” define la “Anatomía”, describiendo las venas que están afectadas a lo largo de la extremidad.

- Venas Superficiales:
 - 1.- telangiectasias o venas reticulares
 - 2.- vena safena interna por encima de la rodilla
 - 3.- vena safena interna por debajo de la rodilla
 - 4.- vena safena externa
 - 5.- sistema no safeno

- Venas profundas (Deep)
 - 6.-vena cava inferior
 - 7.-vena iliaca común
 - 8.-vena iliaca interna
 - 9.-vena iliaca externa
 - 10.-venas pélvicas y gonadales
 - 11.- vena femoral común
 - 12 vena femoral profunda
 - 13.- vena femoral superficial
 - 14.- vena poplítea
 - 15.- venas crurales
 - 16.- venas del soleo

- Venas Perforares
 - 17.- muslo
 - 18.- pantorrilla

Finalmente, la “**P**” define la fisiopatología (en inglés *Pathophysiology*), la causa de la hipertensión venosa:

- Reflujo (**Pr**),
- Obstrucción (**Po**)
- Reflujo y obstrucción (**Pr,o**)

A pesar de las ventajas ya comentadas del uso de la clasificación CEAP, existen una serie de inconvenientes que dificultan su uso diario. Estamos ante una clasificación compleja con 7 clases clínicas, 18 segmentos anatómicos, con la necesidad de descartar por ecodoppler la presencia de reflujo u obstrucción, con 4 tipos de etiología y la necesidad de realizar ecodoppler por personal especializado.

Como ejemplo, si tenemos un paciente con varices, edema, lipodermatosclerosis y dolor, con un ecodoppler con reflujo del cayado de la vena safena interna con perforantes incompetentes a nivel de la pantorrilla, sin antecedentes de TVP, su clasificación CEAP sería: C2,3,4b,S, Ep,As,p, Pr2,3,18. Otro inconveniente es que es estática en el tiempo, es decir, un paciente con una úlcera curada siempre será

C5, y un paciente operado y asintomático será C0 a pesar de haber tenido varices. La escasa reproducibilidad de la clasificación es así mismo otro problema ya que, según Uhl (14), la variación intraobservador en la clase C2 mostró una discrepancia del 25% y en la clase C5 del 12%. En la variación interobservador en la clase C0-C1 y C1-C2 se encontró una discrepancia del 24% y en la clase C5 una discrepancia del 7%. Es por estas cuestiones que en 2004 (12) se revisó la clasificación mejorándola y simplificándola con su versión resumida "BASIC CEAP", en donde se limita la clase clínica C al grado más severo y la anatomía la divide en S para afectación del sistema superficial, D para el profundo y P para el perforante.

1.4 CONCEPTOS FISIOPATOLÓGICOS

Las varices primarias son el resultado de la dilatación venosa en ausencia de antecedentes de trombosis venosa profunda (TVP) o cualquier otra etiología. Se relacionan con el 90% de las varices. Las varices secundarias suelen ser el resultado de una TVP previa, donde la recanalización del trombo lesiona las válvulas venosas o de una malformación venosa congénita.(15)

Existen varias teorías para explicar la EVC pero la más aceptada y extendida es la afectación de las válvulas venosas(16). La disfunción valvular primaria puede causar reflujo venoso, aumento de la presión hidrostática venosa, hipertensión venosa crónica y dilatación de la pared venosa. Es esta hipertensión la responsable de la EVC (17).

Podemos hallar tres tipos de células predominantes en las principales capas de la pared de la vena. Las células endoteliales (CE), que recubren la túnica íntima, las células musculares lisas (CML), en la túnica media, y los fibroblastos que se hallan dentro de la adventicia. Estas células tienen la capacidad de responder a diferentes estímulos. Uno de los más importantes es la distensión mecánica provocada por la hipertensión, lo que en condiciones fisiológicas permite almacenar importantes volúmenes de sangre, en condiciones patológicas provoca un cambio en las características funcionales y fisiológicas de la pared de la vena. A este fenómeno se le conoce como remodelado vascular. Esta remodelación comprende alteraciones en la migración, la proliferación y la apoptosis de las CE y CML, así como cambios en la síntesis y degradación de la matriz extracelular (ECM) (18). La hipertensión venosa mantenida provoca el aumento de la expresión y/o actividad de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Los miembros de la familia MMP incluyen colagenasas, gelatinasas, estromalinas, matrilisinas, MMP de tipo membrana y otros. Las MMPs son conocidas por degradar varios componentes de la matriz extracelular (ECM) y también pueden afectar al endotelio y el músculo liso vascular, causando cambios en los mecanismos de relajación y contracción de la vena. La lesión de las CE también desencadena la infiltración de leucocitos y la activación de factores de la inflamación, lo que conduce al daño de la pared venosa.

1.5 EPIDEMIOLOGÍA

Una revisión sistemática publicada en 2021 con más de 300.000 adultos en 6 continentes estima la prevalencia de EVC según la clasificación CEAP en: C2 19%, C3: 8%, C4: 4%, C5: 1% y C6: 0.4%. Casi un tercio de la población presenta signos de EVC (19).

Conocer con exactitud el impacto epidemiológico de la EVC es muy complejo debido a las dificultades que se pueden plantear durante su estudio, como por ejemplo, la heterogeneidad de las poblaciones, el diseño del estudio, los métodos diagnósticos o las definiciones terminológicas. Otro factor que puede provocar una infraestimación de la prevalencia es la falta de solicitud de atención médica por parte del afectado, ya que en muchos casos las molestias no son invalidantes y la presencia de varices es percibida como un problema de índole estética. Otro factor es la metodología que se utilice para realizar los estudios. No será lo mismo utilizar encuestas telefónicas, valoración en atención primaria o la valoración por un especialista en Angiología y Cirugía Vasculuar, ya que dependiendo del sistema que utilicemos para recoger la información, ésta será más o menos rigurosa como veremos más adelante. A pesar de estos inconvenientes, veremos a continuación diferentes estudios que confirman la importancia de la prevalencia de la EVC en nuestra sociedad.

1.5.1 Epidemiología en España

Los primeros estudios realizados en España sobre EVC en extremidades inferiores fueron realizados por el Dr. Jiménez Cossio (1977), el Dr. Varela Irijoa (1985) y el Dr. Peñafiel (1990)(20-22).

El estudio RELIEF (23), realizado en el ámbito de la atención primaria entre los años 1997 y 1998, incluyó a 624 pacientes con clínica compatible de EVC, de los cuales se seleccionaron a 482. Se realizó anamnesis, exploración física y exploración hemodinámica con doppler continuo. El 35,7% presentaron varices, siendo el 87,8% de los casos mujeres. Destaca que el 66,2% de los pacientes no habían recibido ningún tratamiento previo.

En año 2001 se publicó el estudio DETECT-IVC (24), un estudio epidemiológico transversal en el que se incluyeron 21.566 pacientes seleccionados por 1068 médicos de atención primaria y que fueron supervisados por 20 angiólogos. Se les realizó una anamnesis clínica, clasificando a los sujetos según los grados clínicos de la CEAP. El 44% de los pacientes presentaron varices tronculares, edema el 20,5%, cambios tróficos el 18,5% y úlcera venosa el 2,6%. El 57,3% de los pacientes reclutados (y un 79,3% de los que había referido algún síntoma o signo) presentaba algún signo de enfermedad venosa crónica. En el año 2008 se publicó la continuación de este estudio, el DETECT-IVC 2 (25), donde el principal objetivo era comparar los datos

con el estudio publicado en el 2001. Siguiendo la misma metodología, se reclutaron 16.770 individuos.

En el año 2013 se publicó en nuestro país el Estudio C-VIVES (26), en el que se investigaron a 1.650 pacientes de atención primaria, a los que se aplicaron los cuestionarios CEAP y *Venous Clinical Severity Score*. Los pacientes incluidos tenían que presentar algún signo o síntoma de insuficiencia venosa en el momento de la encuesta. Los grados clínicos detectados fueron C0 de la CEAP 3,3%, C1 15,6%, C2 21,0%, C3 22,9%, C4 23,6%, C5 8,7% y C6 4,5%.

En el estudio VEIN CONSULT llevado a cabo por el Dr. Escudero y el Dr. Bellmunt (27) colaboraron 999 médicos de Atención Primaria, que reclutaron 20 pacientes consecutivos cada uno de ellos, independientemente del motivo de consulta, y finalmente se estudiaron 19.800 pacientes. Se detectó una prevalencia de EVC del 48,5%.

1.5.2 Costes socio-sanitarios

Tal como plantea en su investigación Marinello (28), la realización de un estudio de costes en una patología como la EVC plantea varias dificultades. Así pues, estamos ante una patología con un amplio espectro clínico, donde coexisten desde problemas puramente estéticos hasta patología con una grave afectación de la calidad de vida. Además, resulta difícil valorar los costes teniendo en cuenta los diferentes modelos de gestión sanitaria, tanto públicos como privados. A pesar de las limitaciones comentadas, existen datos contrastados que confirman el alto coste económico de esta patología, presentando cifras que pueden parecer incluso exageradas.

En EE.UU. los costes que provoca la EVC ascienden a un billón de dólares al año. En Inglaterra el 2% del presupuesto anual de sanidad se gasta únicamente en tratar la úlcera de etiología venosa, estimándose entre 1.488 y 2.289 euros el coste anual de cada úlcera venosa (29, 30). En un estudio realizado en Francia en 2001, concluye que el coste de un úlcera de 6 meses de evolución es de 888 euros, siendo el 64% por el tratamiento hospitalario, el 33% tratamiento extrahospitalario y el 3% en conceptos laborales (31). En el 2003 Simka publica sus resultados, estimando el coste de la EVC y de la úlcera venosa entre el 1.5% y el 2% del presupuesto anual de los sistemas de salud en Europa (32).

Estos costes pueden estar infraestimados por diferentes motivos. La diversidad de sistemas sanitarios en una misma sociedad, como el público o el privado, puede dificultar conocer el gasto atribuible a la EVC. La dificultad para obtener los registros de actividad en la práctica privada afecta especialmente a la EVC por ser una patología muy susceptible de ser atendida en ese sistema sanitario. Otro aspecto es el gasto en el componente estético que muchas veces no se atribuye a la EVC.

Tal como indica el concepto de enfermedad crónica, estamos ante una enfermedad que no tiene tratamiento curativo. Actualmente la medicina ofrece dos tipos de tratamientos, el conservador y el quirúrgico. El tratamiento conservador consistente en el uso de medias elásticas, vendajes, apósitos, medicamentos flebotónicos y medidas higiénico dietéticas. Todos ellos cuentan con una moderada evidencia científica (33, 34), que ha llevado a nuestro gobierno, con el Real Decreto-Ley 16/2012, a retirar los flebotónicos de la cartera de medicamentos con subvención.

El tratamiento quirúrgico comprende multitud de técnicas, desde el arrancamiento de la vena safena interna, pasando por la ablación térmica con LASER o radiofrecuencia o incluso con vapor de agua, la ablación química y otros métodos quirúrgicos (35). Todos estos tratamientos tienen una tasa de recidiva muy alta. El 20% de las intervenciones por varices son reintervenciones. Las tasas de recidiva son del 6.6% al 37% a los 2 años y más del 51% a los 5 años, pero se han publicado tasas de recidiva del 70% a los 10 años (9). Lo que tienen en común estos dos tipos de tratamiento es que se centran en las consecuencias de la EVC, ya sean varices o úlceras, pero no se centran en las causas de esta patología. Si nos fijamos en las publicaciones sobre EVC la gran mayoría investigan en su tratamiento y no en buscar su origen.

1.6 DIAGNÓSTICO

Podemos diagnosticar la EVC mediante una anamnesis y una exploración física cuidadosas. Seguir esta metodología para el diagnóstico de la EVC está sujeto a la subjetividad del profesional que la realiza y puede dar lugar a una gran variabilidad en los criterios diagnósticos. Los estudios que siguen esta metodología pueden tener problemas metodológicos a la hora de diagnosticar y clasificar esta patología. Una de las ventajas de utilizar la clasificación CEAP, es que obliga a realizar una prueba objetiva como es el *ecodoppler venoso* y a seguir la misma nomenclatura.

El *American Venous Forum* aconseja, con un grado 1A de recomendación, la realización de un *ecodoppler venoso* como primera prueba diagnóstica en pacientes con patología venosa (9).

Estamos ante una técnica no invasiva, barata, efectiva y eficiente, que depende únicamente de la pericia del explorador. Para llevar a cabo la exploración ecográfica del paciente es importante establecer una metodología a seguir y disminuir este tipo de sesgo.

1.7 FACTORES DE RIESGO

Diferentes factores se han relacionado con la propensión a presentar EVC. Los más importantes son la edad, sexo, embarazo, obesidad, ortostatismo, tratamientos hormonales, historia familiar y los antecedentes de TVP (19, 36-42).

1.7.1 Edad

Más del 30% de los pacientes con EVC son mayores de 65 años (19). El estudio de Carpentier(38) realizado sobre 2.000 pacientes en Francia, mostró que la edad era uno de los factores de riesgo más importantes, sin importar el sexo de los individuos. Existe un aumento progresivo del riesgo de presentar varices al aumentar la edad, OR (por año): 1,04 (IC 95% 1.02 -1.05) $p < 0.001$ en mujeres y OR: 1,05 (IC 95% 1.02-1.07) en hombres. A la misma conclusión se llega en estudio de Edimburgo (37) donde la prevalencia de varices aumenta con la edad, de 11,5% en el grupo de 18 a 24 años pasamos al 55,7% en el de 55 a 64 años. Este aumento se continúa viendo en otros trabajos, como en el estudio de Framingham (36), donde la prevalencia en varones menores de 30 años fue menor al 1% aumentando al 57% a partir de los 70 años, y en mujeres del 10% subió al 77% en los mismos grupos de edad. La misma comparación la llevo a cabo Criqui en su estudio *The San Diego Population Study* (43) observando una prevalencia de varices del 19,9% en menores de 50 años frente a al 29,9% en mayores de 70 años. Centrándonos en la población española, los estudios DETECT-IVC(24) y el *Vein Consult* (27) señalaron la edad como el factor de riesgo más importante para presentar EVC, indicando que la enfermedad venosa es más prevalente y más grave cuanto más avanzada es la edad de los pacientes.

1.7.2 Sexo

La relación entre EVC y el sexo es más controvertida, podemos encontrar artículos que aseguran una mayor prevalencia en hombres (37, 44) y otros en mujeres (36, 38, 43).

Un estudio transversal de una muestra aleatoria de 1566 sujetos de 18 a 64 años de edad de la población general en Edimburgo, Escocia (37), encontró telangiectasias y venas reticulares en aproximadamente el 80 % de los hombres y el 85% de las mujeres. Las varices, grado C2 de la CEAP, estaban presentes en el 40% de los hombres y 16% de las mujeres, mientras que el edema de tobillo estaba presente en 7% de los hombres y 16% de mujeres. A diferencia del Estudio de Edimburgo, en el estudio de Framingham (36) la incidencia anual de varices fue mayor en mujeres que en hombres (2,6 vs 1,9). Carpentier (38) encontró una prevalencia de varices del 50.5% en las mujeres mientras que en varones fue de 30,1% ($P < .001$), pero en su mismo trabajo detecta una prevalencia de varices dependientes de los ejes safenos

similar en hombres y mujeres. Por el contrario las varices no safeno dependientes eran 3 veces más frecuentes en mujeres. Criqui (43) concluye que las varices son más frecuentes en mujeres con una OR=2,2. En cuanto a la severidad de los síntomas según Fiebig (44), el sexo masculino es un factor de riesgo para presentar una clínica de mayor severidad (C4-C6).

En nuestro país el estudio Detect-IVC (24) detectó que el sexo femenino fue el tercer factor de riesgo de EVC con una OR de 3,2. En el estudio Vein Consult (27) había un predominio de mujeres, con el 63% de los afectados.

Podemos concluir que, por lo publicado hasta la actualidad, parece existir una mayor prevalencia en el sexo femenino pero si nos fijamos únicamente en las varices tronculares del eje safeno esta diferencia puede no ser significativa.

1.7.3 Embarazo

Los cambios fisiológicos que se producen durante el embarazo pueden favorecer la aparición de varices ya que existe un aumento de hormonas femeninas, un aumento de la presión intraabdominal y un aumento del volumen plasmático (42). Se ha publicado un OR en embarazadas de 1,98 (1,20-3,25) respecto a nulíparas (38).

Durante el embarazo, el aumento de peso, el aumento de líquido corporal total y la presión intra-abdominal elevada puede predisponer a una mujer a la formación de varices(19). Además, la regulación positiva de ciertas hormonas, tales como la relaxina, estrógeno y progesterona, causa la relajación venosa y aumenta la capacitancia venosa (45). El número de embarazos también parece afectar al riesgo de presentar varices. Encontramos un estudio donde se informa de un aumento del riesgo según la multiparidad, siendo del 32% en mujeres nulíparas, del 38% con un embarazo, del 43% con dos, del 48% para tres y del 59% para cuatro o más embarazos (46).

1.7.4 Obesidad

La relación entre EVC y obesidad ha sido reconocida en numerosos estudios. Dicha relación parece deberse al aumento del reflujo venoso, mayores presiones venosas y a la disminución del efecto de la bomba muscular (19). Pero en el estudio RELIEF (23) el peso y la talla no fue un factor de riesgo para presentar EVC, tampoco Carpentier (38) detectó relación con el peso. El índice de masa corporal (IMC) en pacientes con varices fue de 26,6 en hombres y 26 en mujeres. Fiebig (44) tampoco halló relación con la aparición de EVC, con un IMC medio de 26, sin diferencias significativas entre hombres y mujeres, pero si que describió relación con el grado de severidad, siendo mayor para pacientes obesos.

La mayoría de los estudios donde parece existir relación entre sobrepeso y EVC se da en el grupo de mujeres (24, 42, 43).

1.7.5 Ortoestatismo

El ortoestatismo (bipedestación prolongada sin deambulación) está en relación con la actividad laboral como factor de riesgo. Sería lógico pensar que la falta de activación de la bomba muscular y la presión hidrostática de la columna de presión de forma mantenida afectan al sistema venoso. Clásicamente se ha considerado que las profesiones que deben estar mucho tiempo de pie tienen más riesgo de sufrir varices. Los estudios que relacionan estilos de vida y varices son antiguos y presentan importantes sesgos como son los autocuestionarios (47). Curiosamente en el estudio de Edimburgo, las mujeres que permanecían sentadas durante su jornada laboral estaban protegidas frente a la EVC, lo que llevo a considerar el sedentarismo una manera de evitar su aparición (10). Por el contrario según Carpentier (38) en los varones la falta de ejercicio se asoció a un aumento del riesgo, con una OR de 1,97 (1,08-3,61) $p=0.028$, apoyando la teoría de la falta de activación de la bomba muscular. Esta conclusión es apoyada en el estudio de Kroeger que describe que la sedestación prolongada es un factor de riesgo significativo en ambos sexos, con una OR de 2.2 (1.2-3.9) (39)

En nuestro país el estudio RELIEF (23) no detectó ninguna relación entre la ocupación laboral y la EVC. El Vein Consult (27) tampoco mostró ninguna relación significativa con el 39% de los afectados de EVC que hacía ejercicio de forma regular, ni con el número de horas que pasaban de pie (6,8 horas) ni sentados (6,1 horas).

1.7.6 Enfermedad tromboembólica venosa y varices

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es una entidad formada por la trombosis venosa profunda (TVP) y el embolismo pulmonar (EP). La formación de un trombo en el sistema venoso profundo (TVP) puede desprenderse y convertirse en un émbolo que si llega al pulmón provocará una embolia pulmonar (EP). Por lo tanto se considera que ambas entidades conforman la misma patología (48).

Esta es una patología grave, siendo la tercera causa de muerte cardiovascular, tras la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular (49, 50). En el estudio publicado por KK Sogaard el riesgo de mortalidad en los pacientes con TVP (3%) y EP (31%) resultaron más altos que para el grupo control durante el primer año y especialmente dentro de los primeros 30 días (0,4%), pero lo sorprendente es que este exceso de mortalidad se mantiene hasta 30 años después (51).

La incidencia de la ETV depende de la población que estudiemos y de los medios que se utilizan para documentarla. Las tasas reales publicadas infraestiman el impacto

de esta patología ya que en estudios de autopsias se apreció que hasta un 50% de eventos tromboticos venosos no eran reconocidos antes del fallecimiento (52). La incidencia anual de la ETV en la población general es aproximadamente de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes, correspondiendo aproximadamente un 37% de los casos a pacientes hospitalizados, institucionalizados o con un ingreso reciente en un hospital o en un centro socio-sanitario (53). Los costes provocados por la ETV son elevados, se cifra entre 13.000 y 31.300 dólares/año el coste por paciente para un primer evento de TEP, mientras que para TVP fue de 7.590 a 33.200 dólares (54).

El desarrollo de la ETV depende de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. Han sido descritas varias alteraciones genéticas que determinan la susceptibilidad a la trombosis. Sin embargo, en más de 50% de las familias, no se ha hallado ninguna de estas alteraciones (55). A pesar de este hecho, y mediante el uso de un enfoque basado en el estudio de familias extensas, se ha demostrado que la heredabilidad de la susceptibilidad de sufrir ETV en la población general española es superior al 60% (56). Estamos por tanto ante una de las patologías más importantes de nuestra sociedad, tanto por incidencia, por complicaciones y por costes. Por suerte contamos con la posibilidad de realizar tratamientos profilácticos en aquellos individuos en riesgo y tratamientos terapéuticos en los que ya hayan padecido la enfermedad. Esta posibilidad terapéutica nos obliga a realizar una búsqueda activa de los pacientes en riesgo y estudiar mejor la etiología de esta enfermedad.

El papel de las EVC como factor de riesgo de la ETV es controvertido (57). Podemos encontrar trabajos a favor y en contra de esta relación. En la última guía de la Sociedad Europea de Cirugía Vasculat se ha considerado la presencia de varices como un factor de riesgo menor en la aparición de TVP(58). En muchas ocasiones se ha considerado una relación de causa-efecto el hecho de tener una TVP, ya que provoca la destrucción valvular y esto provoca el reflujo, la hipertensión venosa y la aparición de varices y/o alteraciones cutáneas. Se trata del conocido síndrome postrombótico (SPT).

Si nos fijamos en nuestra población, el estudio DETEC-IVC (24) reconoce la TVP como el segundo factor de riesgo más importante de EVC, con una OR de 6,4.

En los trabajos de Gaber (59), y los de Hafner (60) asocian la mutaciones del FV Leiden a la presencia de úlceras venosas de causa postrombótica. Lo mismo sucede en el trabajo de Emmerich (61) donde las personas con deficiencia de proteína C tenían un riesgo relativo de 9 de sufrir EVC.

Según Cushman (41), el principal hallazgo de su estudio fue que las cifras elevadas del FVIII, factor de von Willebrand (FvW) y dímero D se asociaron con EVC entre aquellos sin antecedentes de trombosis venosa. Además, los niveles elevados de estos factores se relacionaban con la gravedad de la EVC. Según la autora, estos datos se deberían a la posibilidad de tener una TVP asintomática que genera un SPT. Esta posibilidad es altamente improbable ya que sólo en menos del 20% de los SPT

no hay episodio previo de TVP. En la práctica clínica habitual es muy improbable observar SPT en pacientes sin antecedentes claros de TVP, sumado a las dificultades para establecer el diagnóstico correcto del SPT (62).

El trabajo de Darvall publicado en el 2009 (63) detectó una mayor prevalencia de trombofilia en pacientes con EVC primaria (sin antecedentes de TVP) comparada con sus controles. Esto significa que la presencia de varices (C2) o EVC con cambios cutáneos (C3-C6) se relaciona de forma significativa con mayor prevalencia de ETV. Define la trombofilia como una alteración, congénita o adquirida, del sistema de la coagulación o de la fibrinólisis dando como resultado un estado de hipercoagulabilidad. Munkvad (64) publicó una serie en que la cuarta parte de los pacientes con úlceras venosas tenían mutación en el FV Leiden y la mayoría sin antecedentes de TVP. Según Wiszniewski (65), pese al tratamiento y cumplimiento similares, la incidencia de trombofilia hereditaria (diagnosticada tras episodios de EP, tromboflebitis o TVP) es mayor en pacientes con EVC, así como su recurrencia y la duración de la trombosis. Estos trabajos ponen de manifiesto que existe una relación entre la EVC y la ETV, y existen suficientes indicios para pensar que la relación puede deberse a factores genéticos comunes aún desconocidos.

1.7.7 Historia familiar

Investigar la Historia Familiar como factor de riesgo es asumir que puede existir un factor heredable que predispone a presentar una determinada característica fenotípica. La heredabilidad es “la proporción de la varianza fenotípica total de una población que se debe a la varianza genética”(1), es decir, el peso que tiene el componente genético en la presentación de un rasgo fenotípico, con independencia de los factores ambientales. Este concepto lo desarrollaremos posteriormente en la sección de genética y en este apartado nos centraremos en los trabajos publicados que remarcan la importancia del componente hereditario en esta patología.

Desde la visión puramente clínica se da por seguro el componente hereditario de las varices, siendo esta visión compartida por la población general que la considera claramente hereditaria. De hecho, ya en los años 60 se publicaron los primeros estudios (66, 67) que hablaban del componente hereditario de las varices, describiendo antecedentes familiares desde el 70% al 80%. Desde entonces han sido muchos los estudios que han abordado este tema, con resultados contradictorios, tanto a favor de una componente hereditaria clara (24, 25, 36-40, 43, 44, 68), como en contra de ella, o que la consideran menos importante (23, 69, 70). Ahti (47) en su artículo publicado en 2010, expone que la información en los trabajos que tratan el componente familiar de las varices, generalmente se obtiene a partir de entrevistas o autocuestionarios, por lo tanto, el sesgo de memoria es un problema importante e incluso puede llevar a un diagnóstico erróneo de la enfermedad. En su estudio evalúan

el error en la clasificación de los antecedentes familiares de varices recogiendo la información en forma de autocuestionarios, después comparaban la consistencia de los mismos contestados por el sujeto en dos fechas distintas. Describieron que la información fue parcial, sugiriendo que una parte sustancial del riesgo atribuido a la herencia de las varices probable esté sobreestimado. Concluyen que el único medio válido para realizar este tipo de estudios, es la evaluación de los antecedentes familiares de varices con el examen clínico de los pacientes y sus familiares. Otros sesgos metodológicos que presentan este tipo de estudios son el tamaño muestral y la no utilización de una nomenclatura estandarizada, este último punto de especial importancia en una patología con manifestaciones tan diferentes como es la EVC.

A pesar de los posibles sesgos que se puedan presentar, parece existir un importante componente familiar como veremos en los siguientes trabajos. En un estudio realizado en gemelos se encontró mayor concordancia entre gemelos monocigóticos (75%) que entre los gemelos dicigóticos (52%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa debido al pequeño tamaño muestral (71). En el estudio publicado por Cornu-Thénard (72) en una muestra de 134 familias, se estudiaron a 67 pacientes y a sus padres y a 67 controles y a sus padres. Se examinaron un total de 402 sujetos. Los resultados demostraron un papel importante de la herencia en el desarrollo de las varices ($P < 0,001$). El riesgo de desarrollar varices en niños fue del 90% cuando ambos padres presentaban esta enfermedad, y cuando sólo uno de los padres estaba afectado el riesgo fue del 25% para los varones y 62% para las mujeres. Cuando ninguno de los padres presentaba EVC sólo del 20%.

En el trabajo publicado por Carpentier (38) se valoraron 835 individuos, 289 mujeres con varices y 269 sin varices, con una OR para la historia familiar de 3.47 (2.38-5.07; $p < .001$). Por otra parte también se evaluaron 88 varones con varices y 189 sin varices, con una OR de 3.53 (1.91-6.54; $p < .001$). Concluyó que los antecedentes de varices en familiares de primer grado es el factor de riesgo más importante en ambos sexos.

Kroeger y cols. describieron que los antecedentes de varices por parte de madre son más frecuentes que por parte de padre o de ambos. Después de ajustar por edad y sexo la historia familiar pasa a ser el factor de riesgo más importante con una OR de 5.2 en los casos que ambos progenitores presentasen varices (39). Ahti en su trabajo epidemiológico realizado en Finlandia sobre 6874 sujetos halló que los antecedentes familiares suponían un factor de riesgo tanto en varones (OR 6.6) como en mujeres (OR 4.9). Otro estudio epidemiológico realizado en San Diego, California (41) constata un aumento del riesgo de presentar úlcera venosa (OR de 5.0) en caso de tener antecedentes familiares de EVC.

En los trabajos realizados en nuestro país, el estudio Detect-IVC (6) publicó que el 44.5% de las mujeres y el 28.5% de los hombres tenían antecedentes familiares. En estos pacientes se observó una asociación entre la existencia de antecedentes

familiares y estadios avanzados (C4-C6) de la enfermedad y una mayor afectación de la escala de severidad clínica. En el estudio Vein Consult el 40% de los pacientes tenían antecedentes familiares de EVC.

Como podemos ver, existen claros indicios de que existe un importante componente hereditario en la EVC. La cuestión es que las limitaciones metodológicas de los trabajos realizados y la disparidad de resultados justifican la realización de una investigación rigurosa para establecer el peso de los antecedentes familiares, es decir, de la heredabilidad de esta patología.

1.8 ENFOQUE GENÉTICO EN EL ESTUDIO DE LA EVC

La genética se define como la disciplina de la biología que estudia la herencia de caracteres y la variación de los mismos en los seres vivos (1). La heredabilidad de caracteres físicos observables o cuantificables entre seres vivos ha sido siempre conocida e incluso aplicada para controlar la aparición de rasgos fenotípicos con diversos objetivos, como en la agricultura. Sin embargo no es hasta mediados del siglo XIX que, a partir de los estudios de Gregor Mendel, aparece la genética como concepto y objeto de estudio sistemático. En 1928 Frederick Griffith, definió el "principio de transformación", donde se habla por primera vez de un medio físico para la transmisión de características. En 1944 Avery, McLeod y McCarthy aíslan y describen la molécula de ADN como molécula responsable de la herencia de los caracteres, nace la genética molecular. Basándose en los análisis de Rosalind Franklin los investigadores Watson y Crick publican en 1953 la estructura de doble hélice del ADN lo que les valió el premio Nobel de Medicina en 1962. En 1975, Frederick Sanger desarrolló método que lleva su nombre, el cual permitió secuenciar el genoma del bacteriófago Phi-X174, el primer organismo del que se secuenció totalmente su genoma, por lo que se le concedió el Premio Nobel en 1980. Otro avance esencial fue la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificar secuencias de ADN inventada por Kary Banks, galardonado con el premio Nobel de Química de 1993. La culminación de todas las investigación llegó con en el proyecto Genoma Humano que llevó a la primera secuenciación completa del genoma realizada en 2003 para fines biomédicos.

El gran reto de la genética moderna es conseguir que todos los avances científicos cristalicen en avances con aplicabilidad clínica, donde exista una transferencia real en el tratamiento de las enfermedades. La cirugía vascular no es ajena a estos retos. En este contexto es donde debemos abordar la EVC desde una vertiente genética para conocer el peso específico del componente genético en el riesgo de aparición de la enfermedad y los factores y mecanismos que facilitan su progresión. Para llegar a este conocimiento deberemos desarrollar una serie de conceptos que explicaremos a continuación

1.8.1 Enfermedad Compleja

En contraposición a una Enfermedad Mendeliana o monogénica, donde una alteración en un gen concreto causa la aparición de una patología, la *Enfermedad Compleja* la podemos definir como aquella que precisamente no sigue un patrón de herencia mendeliano clásico. Así, la *Enfermedad Compleja* es el resultado de alteraciones en diferentes genes y su interacción con el ambiente. Cada uno de estos factores (genéticos o ambientales) tendrá un peso diferente en la aparición de la enfermedad creando lo que se conoce como susceptibilidad (o riesgo). En otras palabras, los factores genéticos son necesarios pero no suficientes para la aparición (o progresión) de la enfermedad y será la interacción con factores ambientales los desencadenante de que esto ocurra.

El 95% de las enfermedades humanas responden a este modelo complejo de herencia, entre ellas: la diabetes mellitus tipo II, la epilepsia, la hipertensión arterial esencial, la obesidad, la cardiopatía isquemia, la enfermedad arterial periférica, algunas neoplasias o la esquizofrenia, y también la IVC o la trombosis venosa(73, 74).

Clásicamente el estudio de las enfermedades se ha enfocado de forma dicotómica donde se definían dos estados, sano o enfermo (Figura 2A). Pero el estudio de la *enfermedad compleja* nos proporciona otro modelo (que podemos desarrollar matemáticamente como veremos en el apartado de Material y Métodos) que nos aporta muchas más información sobre el rasgo bajo estudio. Concretamente, como la mayoría de rasgos biológicos, podemos considerar que una enfermedad compleja concreta sigue una distribución normal en sus valores poblacionales (Figura 2B). Sería un Modelo Umbral donde cada individuo de la población se posiciona en la distribución Normal en base a sus factores genéticos y ambientales que le confieren un riesgo (también conocido por el término en inglés *liability*). Este modelo define que ese riesgo tiene un umbral (también conocido por el término en inglés *threshold*) a partir del cual el individuo presentará la enfermedad (el área bajo la curva por encima del umbral). En este caso, definimos el estado de sano o enfermo como dos fenotipos distintos sobre la base de una variación continua que sigue una curva normal, con un punto umbral que separa los dos estados (74) (Figura 2)

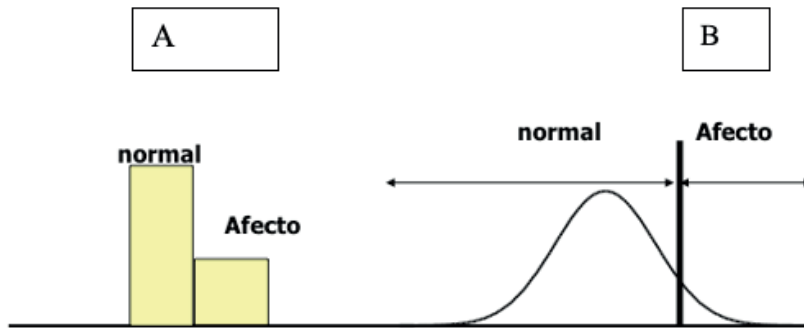


Figura 2. A) Modelo dicotómico. B) Modelo umbral de susceptibilidad para enfermedades complejas

1.8.2 Heredabilidad

A la hora de abordar las bases genéticas de una enfermedad compleja es importante entender el concepto de *Heredabilidad* (expresado como h^2). Matemáticamente, h^2 es la proporción de la varianza fenotípica total de una población que se debe a la varianza genética. Dicho de otra manera, es el grado en el que los genes de un organismo contribuyen a un carácter y se mide en porcentaje de la variancia total (1, 56, 73). En este sentido, cuanto más alta es la h^2 más depende el rasgo estudiado de la carga genética y menos del ambiente o de otras covariables. En el apartado Material y Métodos desarrollaremos los aspectos más técnicos.

1.8.3 Fenotipos intermedarios

Otro concepto importante para entender el análisis genético de las enfermedades complejas es el de *fenotipo intermedario*. Hemos definido como fenotipo cualquier característica, rasgo observable o medible de un organismo. Si un fenotipo se asocia a una patología concreta decimos que es un *fenotipo intermedario* con dicha patología. Tal como exponen Souto et al en su trabajo (73), puede resultar más eficiente abordar el estudio de fenotipos intermedarios relacionados con una enfermedad compleja que el estudio de la enfermedad en sí misma. Esto se debe a que los fenotipos intermedarios cumplen una serie de características que los hacen útiles para este objetivo dado que cumplen los siguientes parámetros:

- Son fenotipos previamente valorados con alta sospecha de relación con la patología a estudio. De hecho son también complejos y por tanto resultado de la acción conjunta de los genes y el ambiente.
- Pueden medirse objetivamente tanto en sujetos sintomáticos como en asintomáticos y al seguir una escala cuantitativa continua permiten realizar mejores estudios estadísticos que variables dicotómicas como sano o enfermo.

- Estos fenotipos intermediarios están determinados por menos factores que la enfermedad en sí, que suele ser mucho más compleja. Por lo tanto, podemos identificar más fácilmente factores genéticos asociados a estos fenotipos que serán candidatos a estar implicados en la propia enfermedad.

1.8.4 Familias extensas (*extended pedigrees*)

Cuando hablamos de enfermedades con una importante base genética, tenemos que tener en cuenta que las variantes genéticas que influyen en el riesgo de desarrollar esta enfermedad (o que influyen en los fenotipos intermediarios implicados en la patología, como hemos visto en el apartado anterior) se encuentran de forma más frecuente entre familiares, ofreciendo mayor poder estadístico que los estudios basados en individuos no relacionados genéticamente entre ellos. Este hecho es especialmente relevante cuando se analizan variantes genéticas con una frecuencia alélica muy baja (variantes raras o de muy baja frecuencia alélica) (75).

Por lo tanto, cuanto más grande sea la familia analizada mayor será el número de sujetos portadores de estas variantes alélicas y de ahí el concepto de *Familia Extensa*, definido como más de 10 individuos en 3 o más generaciones. Es importante destacar que los estudios familiares permiten realizar análisis tanto de ligamiento genético como de asociación (ver apartado Análisis de Ligamiento genético y apartado Material y Métodos) mientras que los estudios poblacionales con individuos no relacionados entre sí sólo permiten estudios de asociación (75).

1.8.5 Análisis de ligamiento

Entendemos por *Ligamiento* cuando dos o más genes son heredados juntos como resultado de su localización en un mismo cromosoma. Por lo tanto depende de la distancia entre los *loci*. Hablamos de haplotipos cuando alelos ubicados en *loci* muy próximos se heredan juntos. (1, 76). Por lo tanto, el análisis de ligamiento aprovecha la recombinación que se produce durante la meiosis (que elimina el ligamiento) para realizar inferencias estadísticas.

Es un método indirecto que permite establecer la relación de una enfermedad entre distintos miembros de una familia mediante el uso de marcadores genéticos localizados en regiones cromosómicas de interés, para asociar así ciertos *loci* a la enfermedad en estudio. Concretamente, se analiza la probabilidad de la transmisión asociada de dos marcadores genéticos (uno de ellos conocido) y el *locus* de la enfermedad estudiada (caracterizado por el fenotipo de la enfermedad). La *probabilidad de ligamiento* (que se hereden juntos) es mayor cuanto más cerca están los marcadores entre sí. En estudios de familias (siempre que la familia sea suficientemente grande), el análisis de la probabilidad de ligamiento entre el fenotipo (sanos o enfermos) y un marcador polimórfico conocido, permite conocer la posición en el genoma (región cromosómica)

donde estará del gen asociado al fenotipo estudiado. Matemáticamente, se obtiene con el *LOD Score* que es el cociente de probabilidades entre la probabilidad a favor del ligamiento *versus* la probabilidad de no ligamiento. Asumimos que este valor es estadísticamente significativo cuando el *LOD Score* es igual o superior a 3, o lo que es lo mismo una relación de 1000 a 1 de que los marcadores estén ligados, que correspondería a una $p=0.001$.

1.8.6 Estudio de asociación del genoma completo

Definimos “*Genome-wide association*” (**GWAS**) como el análisis de miles o millones de variantes genéticas a lo largo de todo el genoma humano con el objetivo de identificar su asociación a un fenotipo (enfermedad o fenotipo intermediario) (77). Las variaciones genéticas utilizadas en los *GWAS* son los polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*), de los cuales tenemos más de 10 millones distribuidos por todo el genoma. Por definición, estos estudios precisan de una gran cantidad de individuos no emparentados para poder detectar diferencias significativas entre las variantes genéticas que son muy frecuentes en la población. Esta limitación puede reducirse considerablemente si utilizamos familias extensas.

Otro problema importante de estos estudios es la dimensionalidad: miles de individuos y millones de variantes genéticas analizadas suponen un gran número de test realizados lo que nos exigirá unos p valores mucho más bajos (del orden de 10^{-8}) que los utilizados en los análisis de asociación convencionales. Los test de corrección por el número de test realizados es un campo muy activo dentro de la estadística de análisis genéticos. Por otro lado, incluso con los factores de corrección necesarios para eliminar los falsos positivos, un problema generado frecuentemente con este tipo de análisis es que la identificación de un *SNP* con asociación significativa puede no corresponder con la variante causal, sino estar en una región cercana que se hereda conjuntamente con la variante analizada o que la variante significativa esté localizada en un zona del genoma no codificante (75). En ambos casos no dispondremos de información sobre posibles genes candidatos que expliquen la asociación identificada.

Una alternativa para superar las limitaciones anteriormente planteadas es la posibilidad de aplicar técnicas de imputación. Con estas técnicas podemos obtener información muy valiosa que nos permiten determinar haplotipos (variantes que se heredan juntas), aumentando así el poder estadístico al incorporar a los análisis de asociación variantes genéticas no genotipadas, incluso algunas de ellas con una frecuencia alélica muy baja. Para ello se utilizan paneles de referencia de haplotipos, como puede ser el *HapMap Project*.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>) y el 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org>).

1.9 EVOLUCION DEL CONCEPTO DE HERENCIA EN LA EVC

Tal como señala la guía del 2022 sobre EVC, parece existir una causa genética en la aparición de esta enfermedad (19). Se han propuesto distintos modelos de herencia en las varices. Los primeros modelos abogaban por una herencia autosómica dominante por la afectación de mucha descendencia de un solo progenitor y afectación de generaciones sucesivas (66, 78, 79). Posteriormente otros estudios empezaron a proponer una herencia recesiva debida a la discontinuidad en la herencia observada en estudios con más pacientes y familias más grandes (80-82). Estos estudios son muy antiguos, anteriores a la definición de enfermedad compleja. Se ha descrito en gemelos univitelinos una concordancia del 84% en el desarrollo de varices o insuficiencia venosa, frente a sólo un 39% en gemelos bivitelinos (71). Lo que parece claro es que el tipo de herencia no está ligada al sexo, dado que se observa tanto en hombre como en mujeres (68). En un estudio descriptivo realizado en 1998 en China analizaron familias nucleares (únicamente padres e hijos) donde la mayoría presentaban herencia autosómica dominante con una penetrancia de hasta un 92% y un 37% de casos esporádicos (83). Esta heterogeneidad en la literatura y los resultados indica posiblemente la presencia de distintas variantes genéticas para un mismo fenotipo intermediario con distintos patrones de herencia en cada caso.

Todo ello nos lleva a 1969 donde por primera vez Hauge (84) en su trabajo sobre genética en varices, define la etiología de la EVC como multifactorial y compleja, donde la interacción entre factores ambientales y genéticos genera una predisposición al desarrollo y progresión de la enfermedad. En estas enfermedades no se habla de herencia en conceptos mendelianos de dominancia, sino de heredabilidad (h^2). Cuanto más alta sea la heredabilidad de un rasgo, mayor importancia tendrá el componente genético en la susceptibilidad de presentar dicho rasgo. Sin embargo Pistorius et al (68) postulan que la intervención de un único gen dominante en algunas familias no se puede excluir.

1.10 BASES GENÉTICAS DE LAS ALTERACIONES EN LA PARED VENOSA

El engrosamiento mural de las venas varicosas ha sido estudiado a nivel molecular y se ha detectado una alteración en la agregación y ordenación del colágeno mural, pero poco sabemos de su etiología y de los factores que influyen en estos cambios (18, 85). A nivel molecular se han realizado ensayos de expresión génica a partir de mRNA aislado en venas sanas y varicosas, permitiendo ver las diferencias en la expresión genética entre ellas y localizar posibles genes implicados en la etiopatogenia de la enfermedad (18, 85-88).

En la pared de la vena varicosa se ha descrito la sobreexpresión de más de 80 genes, la mayoría pertenecientes a moléculas de la matriz extracelular, del citoesqueleto y de la regulación de los miofibroblastos. Entre los genes sobre-expresados en las varices se han descrito de forma especial el BIGH3, la tubulina, el lumican, la actinina, el colágeno tipo I del endotelio vascular, la actina y la tropomiosina, así como el factor de crecimiento tumoral beta (TGFB) y distintas metaloproteasas (MMPs) (18, 87). Aunque todavía se desconoce el detalle molecular y las interrelaciones de estas vías de señalización celular, es clara la relación entre las vías de la inflamación y el desarrollo de venas varicosas. Algunos de estos componentes moleculares no se sabe si son factores primarios en el desarrollo de la EVC o son factores secundarios desencadenados por los cambios hemodinámicos en la pared venosa, lo que provocaría alteraciones en la expresión de ciertos genes que predispondrían al desarrollo de la enfermedad.

Respecto al efecto de la hipertensión del sistema venoso como desencadenante o precipitante de los cambios de la EVC y el desarrollo de varices, los estudios realizados son fundamentalmente extrapolaciones de la información de estudios realizados del estrés de pared y los cambios asociados a la hipertensión arterial. Esto se debe a que se han realizado más estudios en arterias, fundamentalmente coronarias (18). En presencia de hipertensión venosa o de un flujo retrógrado se produce: daño endotelial con disrupción del glicocálix de las células, formación neointimal, activación de vías de la inflamación y desarrollo de fibrosis tisular. Estos fenómenos alteran los patrones de proliferación de miofibroblastos y leiomiocitos, aumentando la migración de células inflamatorias hacia la pared vascular y produciendo cambios en los patrones de expresión proteica de las células de pared venosa. A pesar de que en un principio esto lograría compensar con éxito este aumento de presión, a medio plazo estos cambios provocan la insuficiencia de la vena (18, 85, 89).

Se han identificado mecanismos moleculares mecano-sensitivos que detectan estos cambios de presión y activan la cascada molecular de señalización intracelular, iniciándose en las uniones intercelulares, integrinas, receptores tirosincinasa y distintos componentes de la membrana celular. Estos sensores activan cascadas

moleculares que culminan en una expresión genética diferencial por cambios en sus patrones de expresión. Estas vías de señalización son complejas, como las vías de la proteincinasa C, la fosfatidilinositol-3-cinasa o las cinasas activadas por fosfato de la mitosis (MAPKs). Los eslabones finales de estas vías moleculares culminan en formación de complejos de promoción de la transcripción o transcriptomas que a través de proteínas como c-fos o c-Jun sobreexpresan distintos genes (18, 85, 86, 90).

Estudios *in vitro* han demostrado que el estrés de pared circunferencial influye en las vías de proliferación y apoptosis celular (39). En general se considera al aumento del estrés de pared el responsable de la sobreexpresión de HIF1a, TGFB1 y otros factores de crecimiento favorecedores de la proliferación de células musculares lisas y fibroblastos, los cuales provocan la esclerosis de la pared venosa y arterial y su fracaso hemodinámico.

La influencia a nivel molecular del estrés de pared se ha estudiado *in vivo* en injertos venosos arterializados en ratones, encontrando alteraciones en la expresión y regulación de MMPs (sobre todo la 2 y la 9), en la proliferación y migración de células musculares lisas, en la respuesta inflamatoria local y en la respuesta vasomotora (91). Se sugiere un rol fundamental de los radicales libres y la hipoxia local en células endoteliales más allá de la presión del flujo como factor que regula la expresión de MPAK y provoca una modulación de la transcripción en el endotelio vascular.

1.11 GENES RELACIONADOS CON LA ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA

En los últimos años la búsqueda de genes específicos relacionados con la EVC ha generado resultados dispares, posiblemente por la complejidad del estudio de esta patología, donde idealmente se necesitan un gran número de *familias extensas*, información detallada de los familiares con exploración física y muestras de todos los sujetos y un entorno geográfico homogéneo para todos los miembros para evitar diferencias ambientales y familias con afectación clínica importante.

Un estudio interesante lo publicó Le Flem donde identificó la asociación entre, la variante -1208/-1209 TT de la trombomodulina y la presencia de varices (92). Otros estudios identifican asociación de la clínica de varices con el marcador genético D16S520 en el cromosoma 16q24, asociado al gen FOXC2. En el estudio de Serra et al (93), las familias con la variante de riesgo de este marcador presentaban varices ostiales de safena interna sugiriendo que en su desarrollo participa un gen o combinación de genes de la región FOXC2 o genes vecinos. De hecho, otro estudio realizado en hermanos gemelos y mellizos mostró una alta heredabilidad tanto de varices superficiales como de hemorroides ligada a la región FOXC2 (88). A nivel molecular, FOXC2 se ha descrito como un locus implicado en el desarrollo linfático

y vascular al producir un factor de transcripción cuya acción se relaciona con el producto de otros genes como FOXL1, FOXF1 o IRF8. Se sabe que una mutación de este gen se asocia a limfedemas sindrómicos bilaterales por alteración en la función tanto de fibroblastos como de leiomiocitos. Esta mutación se traduce histológicamente en la disfunción valvular venosa tanto superficial como profunda (85, 87, 88). Del mismo modo, en pacientes con varices se ha descrito una sobreexpresión de VEGF tanto endotelial como epidérmico, por lo que una alteración en los genes encargados de regular su expresión intervendrían en la aparición de las varices (89). También se ha reportado en pacientes con EVC una sobreexpresión de los niveles de mRNA de MMP2 en células endoteliales, aunque en el estudio comparativo entre los variantes genéticas (polimorfismos) conocidos del gen no se hallaron diferencias, por lo que queda por descubrir que variante genética concreta induce la sobreexpresión asociada a las varices (90). Los estudios de ligamiento genético, aportan nuevos *locus* susceptibles de relacionarse con la aparición de varices, como en el estudio de Jin et al. (86), donde identifican el locus COL1A2 como asociado al desarrollo de varices.



JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Por todo lo expuesto hasta ahora podemos asegurar que la EVC es una patología muy prevalente y con un alto impacto socioeconómico en nuestra sociedad. Como hemos visto, los factores de riesgo como el sexo, la obesidad o el ortoestatismo no tienen un peso bien definido en la presentación de esta patología. Así, podemos encontrar en la práctica clínica habitual pacientes jóvenes, deportistas sin embarazos previos, que presentan varices importantes. La pregunta que surge ante este escenario es clara. ¿La enfermedad venosa crónica es una enfermedad hereditaria o bien es el ambiente el principal predisponente?

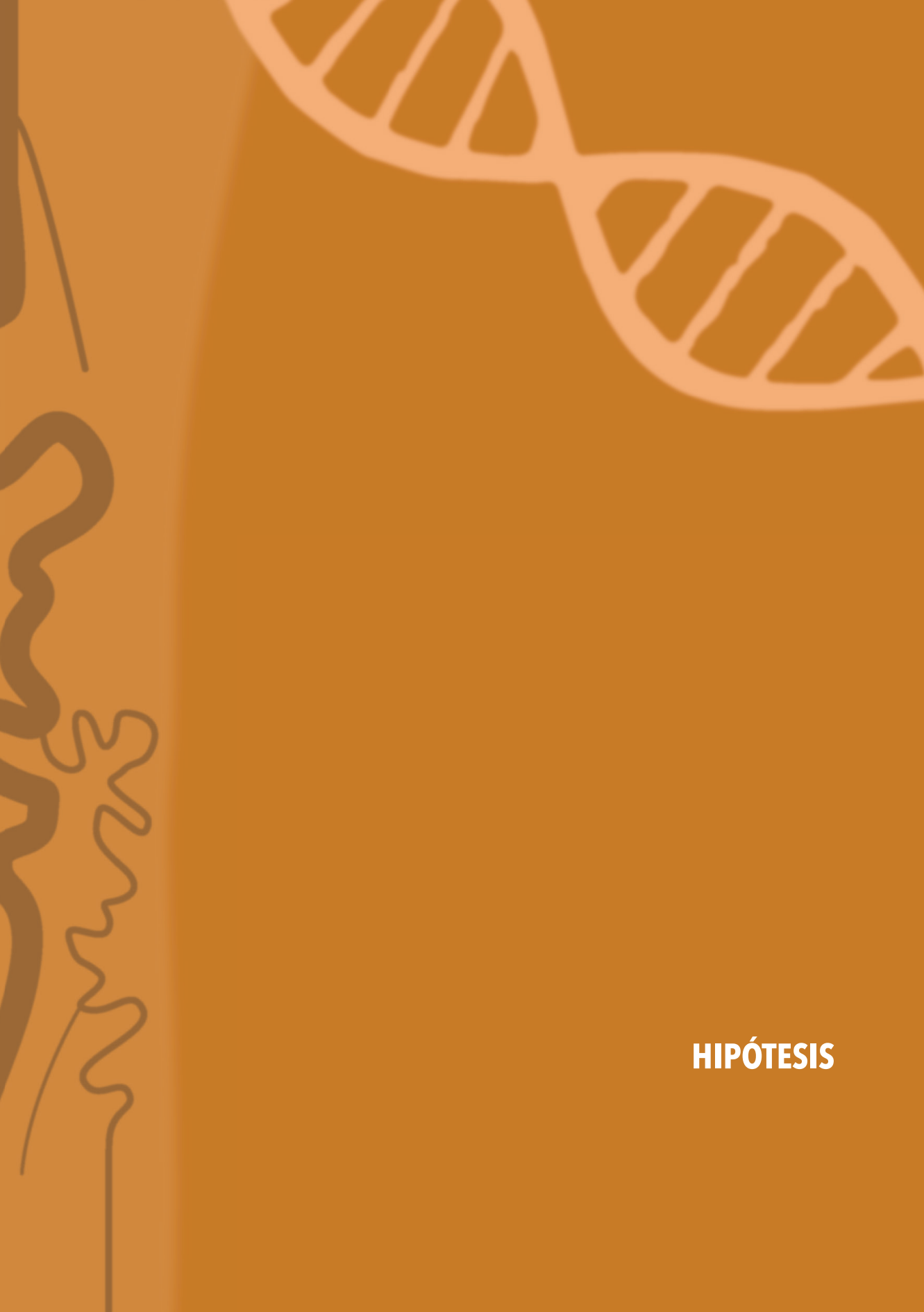
La necesidad de investigar el peso de la genética y de la herencia en el origen y desarrollo de la EVC justifica el planteamiento del presente trabajo. El planteamiento requiere de una metodología rigurosa tanto en lo que se refiere al diseño del estudio como a la obtención de los datos. Encontrar una mayor heredabilidad implicaría una mayor importancia de la genética y por tanto una mayor probabilidad de encontrar genes específicos relacionados con esta patología, dándonos la oportunidad de conocer la función de estos genes, sus vías de desarrollo y plantear nuevas posibilidades terapéuticas.

Paralelamente este conocimiento permitiría poder identificar aquellos individuos con mayor riesgo de presentar EVC o de sufrir complicaciones mayores y, a su vez, establecer mecanismos de prevención y tratamiento más adecuados. Si por el contrario, la heredabilidad fuera baja y los factores ambientales fueran los principales responsables del riesgo de aparición de EVC, deberíamos en el futuro buscar otras vías de investigación para solucionar esta enfermedad. Estas vías investigacionales deberían centrarse en el control de factores de riesgo ambientales como la mejoría de la función de bomba muscular, el control del peso, la mejoría de las técnicas quirúrgicas y en definitiva en la modificación de los factores de riesgo ambientales bien estudiados.

La bibliografía revisada sobre el tema ha reportado una relación estrecha entre Enfermedad Tromboembólica Venosa (ETV) y EVC, pero esta relación no ha sido estudiada en profundidad y nos planteamos las siguientes cuestiones: ¿Comparten genes en común? ¿Es una relación simplemente epidemiológica? ¿Podemos predecir que individuos con varices van a desarrollar una TVP?. Como hemos expuesto anteriormente la ETV es una patología grave con una alta mortalidad. Desde el punto de vista ético tiene además la connotación de que se puede prevenir, tanto su aparición como su recurrencia, por lo que el objetivo sería poder evitarla. La ETV tiene un componente genético muy importante, con una heredabilidad estudiada

en nuestro país del 60% (74). Además, el hecho de que la trombofilia pueda estar relacionada de alguna manera con la EVC (63), supondría un importante avance para la prevención y el tratamiento de ambas patologías.

En el presente trabajo de tesis doctoral se intentará dilucidar si la relación entre estas dos patologías comparte una base genética común o simplemente es una relación epidemiológica.



HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La enfermedad venosa crónica es una enfermedad multifactorial y compleja cuyo desarrollo y progresión depende de factores ambientales y genéticos. Probablemente los factores genéticos son el elemento preponderante en el desarrollo de ésta enfermedad.

En base a este planteamiento, es importante conocer si existen variantes genéticas concretas asociadas a un aumento en el riesgo de presentar enfermedad venosa crónica y si podemos inferir en ellas.

Finalmente, evaluar si la estrecha relación entre la enfermedad venosa crónica y la enfermedad tromboembólica venosa tiene una base genética común que influye en la variabilidad de fenotipos intermediarios de predisposición a padecer ambas patologías. Los resultados esperados pueden contribuir a una mejora en el campo diagnóstico, preventivo y terapéutico de la enfermedad venosa crónica.





OBJETIVOS



4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Identificar las bases genéticas y ambientales asociadas a la predisposición de la aparición y desarrollo de la enfermedad venosa crónica. Para ello se pretende aplicar una estrategia global, integradora e innovadora basada en el estudio extensivo de familias, fenotipos intermediarios (clínicos y biológicos) con la patología y una exploración global del genoma.

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estimar la heredabilidad de la enfermedad venosa crónica en un estudio de familias extensas.
- Identificar genes que participen en la variabilidad de fenotipos asociados a la predisposición a presentar enfermedad venosa crónica como factores potenciales de riesgo mediante el análisis de genoma completo.
- Realizar un análisis de asociación de todo el genoma, determinando el mecanismo de acción de las variantes genéticas identificadas.
- Analizar las correlaciones genéticas y ambientales entre la enfermedad venosa crónica y la enfermedad tromboembólica venosa y entre fenotipos intermediarios relacionados, con especial atención a los parámetros de la hemostasia.





MATERIAL Y MÉTODOS



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio forma parte del proyecto *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia 2* (GAIT-2) (94), que a su vez sigue los mismos criterios de inclusión y reclutamiento descritos en el Proyecto GAIT-1(74). Se adjunta el protocolo del Proyecto GAIT-2 completo en el **ANEXO1**.

Estudio de cohortes en familias extensas prospectivo, observacional, analítico y unicéntrico.

El estudio se ha planteado siguiendo diferentes fases (Fig. 3):

- Primera fase: Reclutamiento de las familias extensas, recogiéndose los datos y muestras según el protocolo desde el 2006 al 2012.
- Segunda fase: Estudió del fenotipo varices y cálculo de su heredabilidad. Se estudió la existencia de correlaciones (genéticas y ambientales) con 16 enfermedades recogidas en el cuestionario (56, 73, 74) y con parámetros de la coagulación y la fibrinólisis.
- Tercera fase: Aplicación de métodos para la localización de genes y sus variantes genéticas. Se realizó un primer abordaje con la estrategia de genes candidatos de fenotipos de la coagulación y fibrinólisis. Posteriormente se realizó el GWAs donde se genotiparon aproximadamente 1 millón de SNPs que permitieron la imputación de más de 10 millones de SNPs
- Cuarta fase: se realizaron estudios de epigenética donde se consiguieron datos de expresión génica y de microRNA.

Con este diseño se consigue estudiar una enfermedad compleja desde todos los ángulos posibles (Fig. 4).

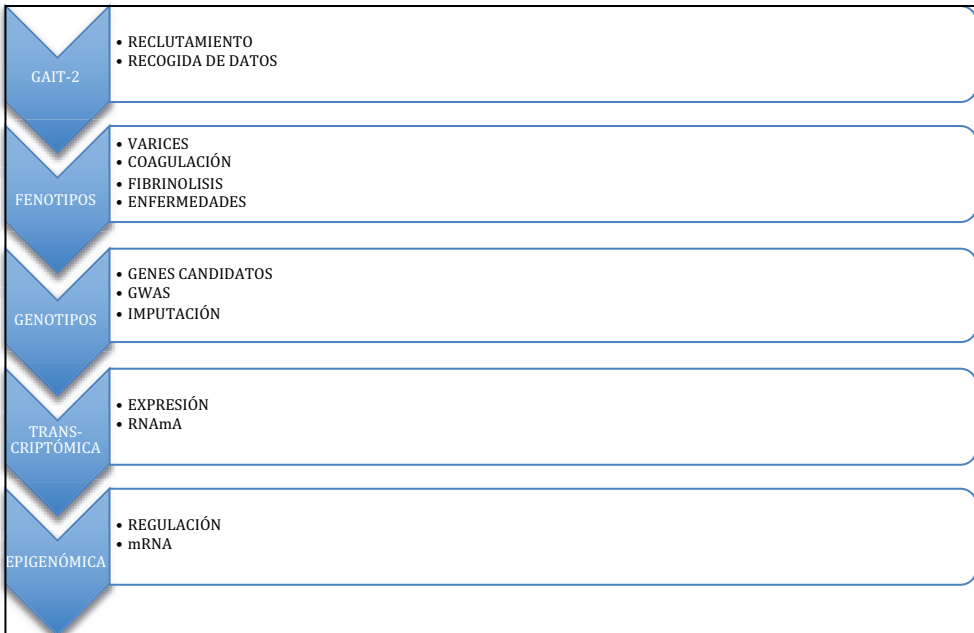


Figura 3: Fases del estudio

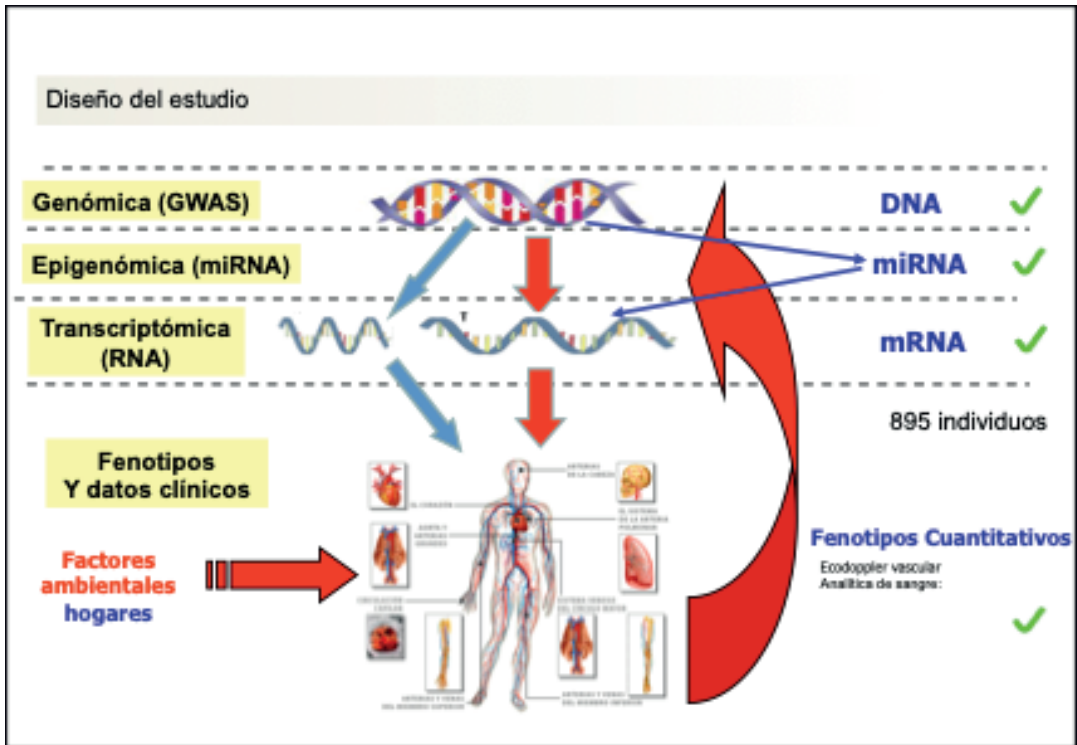


Figura 4: Diseño del estudio

5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se reclutaron de forma prospectiva familias de propositus con trombofilia idiopática que acudieron al Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona durante el período comprendido entre el 2006-2012. Se consideró el propositus como aquel paciente mayor de edad diagnosticado de ETEV sin causa conocida.

Definimos la trombofilia si cumplía uno de los siguientes criterios:

- múltiples eventos trombóticos (al menos uno de los cuales fue espontáneo)
- un solo evento espontáneo con un familiar de primer grado afectado también.
- aparición de trombosis antes de los 45 años de edad.

La trombofilia se definió como idiopática cuando todas las causas biológicas conocidas de trombosis fueron excluidas.

En cuanto a la EVC sólo se incluyeron pacientes con varices primarias, excluyéndose aquellos pacientes con varices secundarias o síndrome posttrombótico.

Las familias estudiadas tuvieron que cumplir los requisitos de estructura y tamaño de familias extensas (56)(extended pedigrees):

- Un mínimo de 10 individuos disponibles, incluyendo al propositus y a los parientes políticos.
- Un mínimo de 3 generaciones, o bien 2 generaciones si alguna de ellas tenía 8 o más hermanos.

5.3 TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se estipuló que idealmente en tamaño muestral sería de 1000 individuos. Para los estudios genéticos en familias extensas no se puede calcular el tamaño muestral ya que no podemos prever los efectos ni los genes implicados en la patología estudiada. No se definió a priori un límite superior para cerrar la inclusión de familias. La potencia estadística para detectar efectos genéticos aumenta (aunque no de forma lineal) con el número de individuos incluidos.

Las limitaciones finales del tamaño se establecieron por criterios presupuestarios y temporales, teniendo en cuenta la dificultad que implica el trabajar con familias extensas.

5.4 CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Junta de Revisión Institucional del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau aprobó todos los protocolos y todos los participantes dieron su consentimiento informado, de conformidad con el Código de Ética de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki) para los experimentos con seres humanos.

A todos los individuos incluidos (en caso de los menores de edad, a sus padres o representantes legales) se les informó de modo comprensible de los objetivos del estudio y de la importancia de su colaboración. También se les ofreció un documento explicativo llamado “El Proyecto GAIT 2. Argumentos para otorgar el consentimiento informado” (ver anexo3) r Anexo 2) Antes de la obtención de datos clínicos y de la extracción de muestras biológicas se les requirió la firma del documento de consentimiento (ver anexo 3) .

5.5 RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Durante la visita médica se procedió a recoger los datos de filiación y epidemiológicos, así como la cumplimentación de la de hoja de recogida de datos clínicos (HRDC) donde se reflejaron los antecedentes de trombosis venosa o arterial, la presencia de enfermedad venosa crónica, los factores de riesgo cardiovascular, los antecedentes de enfermedades autoinmunes o inflamatorias y el tratamiento farmacológico habitual (ver anexo 4)).

Todos los eventos clínicos que se recogieron fueron debidamente documentados y objetivados con las pruebas diagnósticas pertinentes, reflejándolas en la recogida de datos. Aquellos individuos con EVC actual o con antecedentes de la misma (ya intervenidos quirúrgicamente) fueron referidos a la consulta de angiología y cirugía vascular, donde se cumplimentó el protocolo establecido para la valoración de la EVC siguiendo la clasificación CEAP (ver anexo 5)

Se procedió a la realización de un *ecodoppler venoso*, realizado por un profesional con la acreditación del Capítulo de Diagnóstico Vascular no Invasivo de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular. La sala de diagnóstico vascular no invasivo se dotó de la acreditación necesaria emitida por el mismo estamento. El aparato ecodoppler utilizado fue un Siemens Acuson Antares utilizándose un transductor de 7,5 MHz.

La exploración ecográfica se realizó sistemáticamente con el paciente en bipedestación siguiendo la metodología recomendada por la Society for Vascular

Surgery y el American Venous Forum (9), mediante las siguientes maniobras:

- Maniobra de Valsalva: Con objetivo de provocar un aumento brusco de la presión intratorácica y un paro circulatorio proximal, forzando la aparición de reflujo venoso.
- Maniobra de compresión-relajación muscular: Con el objetivo de emular la compresión muscular que se provoca al caminar. No se trata de una maniobra fisiológica ya que la mano del explorador también comprime el sistema venoso superficial, no solo el profundo.
- Maniobra de Paraná: Con la pretensión de conseguir la compresión isométrica de la musculatura de la pantorrilla al cargar el peso del paciente sobre la pierna explorada.

Se valoró el reflujo venoso, tanto en reposo como con las maniobras descritas, considerando patológico un tiempo de reflujo mayor de 500 milisegundos (0,5 segundos) en safenas, tibiales, femoral profunda y perforantes y un tiempo de 1 segundo en femoral común y poplítea.

5.6 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se obtuvieron muestras de sangre total, tras 12 horas de ayuno, entre las 9:00 y 9:30 am, para disminuir las variaciones provocadas por el ritmo circadiano.

Para evitar alteraciones en los parámetros inflamatorios y de la coagulación, el individuo tuvo que suspender previamente las siguientes medicaciones:

- Al menos 15 días, los anticoagulantes orales
- Al menos 24 horas las heparinas
- Al menos 15 días los antiagregantes plaquetarios
- Si es posible, al menos 15 días los antiinflamatorios
- El individuo no tenía que haber presentado ningún episodio tromboembólico (arterial o venoso) en los últimos 3 meses. Tampoco haber presentado ningún proceso inflamatorio agudo en el último mes.

Toda la información relacionada con la obtención de la muestra biológica y su procesamiento se recoge en un formulario denominado “Circunstancias asociadas a la obtención de la muestra” (ver anexo 9).

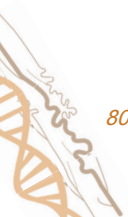
5.7 ANÁLISIS GENÉTICOS

5.7.1 FENOTIPOS INTERMEDIARIOS

Se calculó la correlación genética y fenotípica entre la EVC y 86 fenotipos plasmáticos relacionados con la hemostasia y la inflamación recogidos en la tabla 1.

Tabla 1: Fenotipos plasmáticos de la hemostasia y la inflamación.

Fenotipos	N	Descripción
ADAMTS13	932	Porcentaje ADAMTS-13 actividad
ALBUM	892	Albumina
ALT	903	ALT
APCR	900	Resistencia a la proteína c activada
APTT	903	Tiempo de cefalina
AST	903	AST
ATIIIif	902	Antitrombina III
B12	935	Vitamina B12
BA	935	Número de basófilos absolutos, unidad x10e9/L (0.00 - 0.10). Autoanalizador Sysmex XE-2100.
BAS	903	% basofilos
CAP	931	Capacidad total transporte
CCMH	935	Concentración de hemoglobina corpuscular media, unidades/L (320- 360). Autoanalizador Sysmex XE-2100
COX1	914	<i>cyclooxygenase type 1, beta-actin relative expression, 2e-DCt.</i>
COX2	914	<i>cyclooxygenase type 2, beta-actin relative expression, 2e-DCt.</i>
CREAT	903	Creatinina
e5LOX	902	enzyme 5-lipoxygenase,unit 2e-DCt,
EO	935	Número eosinófilos absolutos, unidades x10e9/litre (0,0 - 0,5). Autoanalizador Sysmex XE-2100,
EOS	903	% eosinofilos
FERRIT	935	Ferritina en suero
FIBc	908	Fibrinogeno funcional
FIXc	903	Factor IX funcional



Fenotipos	N	Descripción
FLAP	902	<i>protein associated with lipoxigenase</i> , unit 2e-DCT,
FOE	932	Folato eritrocitario B
FosAl	935	Fosfatasa alcalina
FOser	935	Folato Sérico
FVIIc	935	Factor VII funcional
FVIIIc	904	Factor VIII funcional
FvWAg	932	Porcentaje <i>Factor von Willebrand</i> ELISA
FXIc	935	Factor XI funcional
FXIIc	935	Factor XII funcional
GGT	903	GGT
GLUC	903	Glucosa
HAPTO	903	Haptoglobina
HB	935	Hemoblogina absoluta, unidades g/litre (120 - 155). Autoanalizador Sysmex XE-2100
HCM	935	Hemoglobina corpuscular media, unidades pg (26,9 - 33,0). Autoanalizador Sysmex XE-2100
HE	935	Hematíes absolutos, unidades x10e12/litre (3,90 - 5,80). Autoanalizador Sysmex XE-2100
HFRAB	934	Número de reticulocitos con RNA alt, absolutos, unidades x10e12/L (0,0003 - 0,0025)
HFRCT	935	Reticulocitos, fracción con RNA alt, per 100 reticulocitos (2 decimales). Units %. Autoanalizador Sysmex XE-2100,
HT	935	Hematocrito, unidades L/L (0,39 - 0,54). Autoanalizador Sysmex XE-2100
Lclisis	920	Tiempo de lisis del coágulo (minutos); maquina: Versa max microplate reader
LclisisTM	920	Tiempo de lisis del coágulo con trombomodulina (minutos); maquina: Versa max microplate reader
LE	935	Número de leucocitos absolutos, unidades x10e9/litre, (3,80 - 10,50). Autoanalizador Sysmex XE-2100
LFRAB	935	Número de reticulocitos con RNA bajo, absolutos, unidadesx10e12/L (0,0200 - 0,0800)



Fenotipos	N	Descripción
LFRCT	935	Reticulocitos, fracción con RNA bajo, por 100 reticulocitos (2 decimales). Unidades %. Autoanalizador Sysmex XE-2100
LI	935	Número de linfocitos absolutos, unidades x10e9/litre, (1,0-6,0). Autoanalizador Sysmex XE-2100
LIMF	903	% linfocitos
LTA4H	902	<i>Leukotriene A4 hydrolase</i> , unit 2e-DCT,
LTB4	913	<i>Leukotriene B4 heparin</i> , unidades pg/ml,
LTB4ion	913	<i>Leukotriene B4 heparin ionophore induced</i> , unidades pg/ml,
LTC4S	902	<i>Leukotriene C4 Synthase</i> , unidades 2e-DCT,
MFRAB	934	Número de reticulocitos con RNA medio, unidades absolutas, x10e12/L (0,0015 - 0,0075)
MFRCT	935	Reticulocitos, fracción con RNA media, per 100 reticulocitos (2 decimales). Unidades %. Autoanalizador Sysmex XE-2100
MON	903	% monocitos
MOT	935	Número de monocitos absolutos, unidades x10e9/litre, (0,0 - 0,8). Autoanalizador Sysmex XE-2100
mPGES1	912	<i>microsomal prostaglandine E-synthase 1. beta-actin relative expression</i> , 2e-DCT
NE	935	Número de neutrófilos absolutos, unidades x10e9/L, (1,80 - 7,00). Autoanalizador Sysmex XE-2100
NEU	903	% neutrofilos
Pcam	902	Proteina C amidasica
PCT40	893	Plaquetocrito, Umbral de volumenes a 40 fL, unidades % (0,150 - 0,850). Autoanalizador Sysmex
PCTES	931	Plaquetocrito, Estandard, units % (0,100 -0,450). Autoanalitzador Sysmex XE-2100
PLA2G4A	914	Fosfolipasas. "2 elevado a menos delta Ct". Nivel de expresión relativo respecto a la beta actina.
PSfree	934	Proteina S libre
PSfunc	923	Proteina S funcional
PSt	934	Proteina S total
PT	935	Tiempo de protrombina
PT40	893	Número de plaquetas absolutas, Umbral de volúmenes a 40 fL, units x10e9/litre (140 - 450). Autoanalitzador Sysmex



Fenotipos	N	Descripción
PTES	934	Número de plaquetas absolutas, Analizador Estandar, units x10e9/litre (140 - 450). Autoanalizador Sysmex XE-2100
RDW	934	Coefficiente de variación de los volúmenes corpusculares, units % (< 15). Autoanalizador Sysmex XE-2100
RETAB	935	Número de reticulocitos absolutos, units x10e12/litre (0,0200 - 0,0900). Autoanalizador Sysmex XE-2100
RETCT	935	Reticulocitos per 100 hematies (2 decimales). Units %. Autoanalizador Sysmex XE-2100
RETIS	903	% reticulocitos
RTMTH	933	(R3) R1/R2
SAT	931	Índice de saturación de la transferrina
SID	931	Hierro en suero
STFR	935	Receptor TF en suero
TGTETP	919	Test de Generación de Trombina; Potencial Endogeno de Trombina (nanomolar per minute); maquina: Fluoroscan Ascen
TGTlagtime	919	Test de Generación de Trombina; tiempo de latencia (minutes); maquina: Fluoroscan Ascen
TGTPeak	919	Test de Generación de Trombina; Pico máximo (nanomolar); maquina: Fluoroscan Ascen
THRGEN	933	(R2) PT sin trombomodulina ratio paciente/control
TMTHG	933	(R1) PT con trombomodulina ratio paciente/control
TT	935	<i>Tiempo de trombina</i>
TXAS	914	<i>Thomboxane A-sinthese, beta-actin relative expression, 2e-DCt.</i>
URAT	903	Urato
VCM	935	Volumen corpuscular medio, units fL (78,0 - 98,0). Autoanalizador Sysmex XE-2100
VPM40	893	Volumen plaquetario medio, Umbral de volumen a 40 fL, units fL, (6,0 - 18,0). Autoanalizador Sysmex KX-21N,
VPMES	931	Volumen plaquetario medio, Estandar, units fL, (6,0 - 10,5). Autoanalizador Sysmex XE-2100



5.7.2 MEDICIÓN DE MARCADORES HEMOSTASIA

La medición de la concentración plasmática de todos los marcadores estudiados se realizó con un kit comercial basado en ELISA (Diagnostica Stago ®). Se extrajo el ADN a partir de células blancas de sangre periférica, utilizando el procedimiento descrito por Miller (6). Se realizó un análisis de asociación entre la EVC y 101 SNPs (Single Nucleotic Polimorfisms) independientes de regiones genómicas que se asociaron previamente con trombosis en los trabajos publicados por Souto (56, 73, 74). Estos SNPs se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: SNPs relacionados con la trombosis

SNP		SNP		SNP	
1	rs657152	25	rs10811647	49	rs1093310
2	rs5985	26	rs7034675	50	rs2289252
3	rs11925694	27	rs4470720	51	rs2719736
4	rs10965243	28	rs824580	52	ATCambri
5	rs7901695	29	rs17116778	53	rs121909548
6	rs932206	30	rs7107663	54	rs9489143
7	rs2036914	31	rs7930056	55	rs10008492
8	PT	32	ss99307036	56	rs6839415
9	rs13387847	33	rs6808430	57	rs17756311
10	rs7903146	34	rs763507	58	rs4459877
11	rs7202185	35	HC677T	59	rs2553658
12	rs302320	36	rs1593806	60	rs4977756
13	rs12598	37	rs1026628	61	rs710446
14	rs510290	38	rs3798220	62	rs4703872
15	D10S276	39	rs4686799	63	rs10757283
16	rs8181047	40	rs8119351	64	rs2017237
17	rs2228243	41	rs10965250	65	rs2078289
18	rs8178851	42	rs7028570	66	rs9347258
19	rs4253399	43	rs2071481	67	rs2338216
20	rs8178847	44	rs7486001	68	F12C46T
21	rs2232698	45	rs2798111	69	rs12955640
22	rs1759417	46	rs2238243	70	rs1785205
23	FVLeiden	47	rs7485577	71	rs3123108
24	rs2027683	48	rs1276123	72	rs11048667



SNP		SNP		SNP	
73	rs10965241	83	rs750753	93	rs941374
74	rs16946674	84	ss99307928	94	rs1484685
75	rs764129	85	rs45454293	95	DXS406
76	rs867186	86	rs2066861	96	rs1470579
77	rs4676875	87	rs6801848	97	rs636258
78	rs902320	88	rs7974779	98	rs5030062
79	rs3748400	89	rs3958	99	rs10229457
80	rs764528	90	rs4737921	100	rs10757272
81	rs1881893	91	rs4402960	101	rs2891168
82	rs10455872	92	rs2395269		

5.8 GENOTIPADO E IMPUTACIÓN

Se realizó en colaboración con el Karolinska Institutet (Estocolmo, Suecia), un estudio de asociación del genoma completo (GWAs) utilizando una combinación de (seguido) HumanOmniExpressExome-8v1.2[®] (324 individuos y cobertura de 964,193 variantes) y HumanCoreExome-12v1.1[®] (610 individuos y cobertura de 542.585 variantes). Después de filtrar los conjuntos de datos por *call rate* (> 98%), HWE ($p > 1e-6$) y MAF (> 1%), también se eliminaron los errores mendelianos detectados. Una vez aplicados los filtros anteriores obtuvimos 395,556 SNPs en todas las muestras. Entonces estimamos los haplotipos utilizando SHAPEIT v2[®] (95) e imputamos genotipos utilizando el panel de la fase 1 de 1000 genomas usando IMPUTE2[®] (96). Imputamos 37,985,264 SNPs, una vez filtrados de nuevo por MAF(>0.005) quedaron 10,844,567 SNPs.

Esto significa que se han descartado aquellos SNPs que tienen una MAF menor de 0.005. El tamaño muestral, implica asegurar que al menos hay 10 variaciones en ese SNP con respecto al alelo de referencia entre todos los individuos.



5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todo el análisis estadístico realizado en este estudio tiene en cuenta que la muestra es dependiente, al estar reclutados en familias, por lo tanto relacionados genéticamente. Este es un factor de confusión en los estudios genéticos que puede disminuir la potencia y aumentar la tasa de falsos positivos de las pruebas, si no se corrige. Para superar esto, se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados, que incluyen la matriz de parentesco real en el modelo (teniendo en cuenta el parentesco entre todos los individuos).

Debido a que las familias fueron reclutadas a partir de una sola persona, se aplicó una corrección condicionando la verosimilitud del rasgo en cuestión dentro de la familia, al valor del individuo que sirvió para reclutar a la familia. Una corrección estadística de los hogares permitió minimizar los efectos ambientales comunes (como por ejemplo, la dieta compartida) en las estimaciones de los parámetros. (seguido) Los p-valores reportados se calcularon por el test de razón de verosimilitud. El software utilizado, R v.3.2.2 ® (97) Eclipse solar versión 7.6.6 ® (98) y Solarius ® (99).

Para realizar el análisis estadístico se clasificaron a los individuos en dos grupos:

- Grupo I: los grados C0 y C1 de la clasificación CEAP (no EVC)
- Grupo II: los grado C2 a C6 de la clasificación CEAP. En este grupo también entraron aquellos individuos que habían sido intervenidos de varices en el pasado (EVC).

5.9.1 ESTUDIO DE COVARIABLES

Se estudiaron factores relacionados clásicamente con el riesgo de desarrollar EVC, según el modelo poligénico implementado en el programa SOLAR®.

Las variables valoradas fueron:

- Edad
- $Edad^2$: Permite estudiar los efectos de la edad que no son lineales (por ejemplo, de 0 a 30 años se modifica poco el riesgo de EVC, pero sin embargo en los 30 años siguientes, de 30 a 60 el riesgo se incrementa de forma no lineal).
- Sexo
- Índice de Masa Corporal (IMC)
- Tabaquismo
- Toma de anticoagulantes orales
- Perímetro abdominal

- Actividad física: Según dos cuestionarios (uno categórico y otro continuo) recogiendo la intensidad de la actividad física, según la versión corta de un cuestionario clínico estandarizado y validado (IPAQ) que permite separar a la población en 3 categorías: inactivos, mínimamente activos o saludablemente activos y también expresar la actividad física como una variable continua medida en MET-min/semana (www.ipaq.ki.se)(100).

Se calculó la varianza, el error estándar y el valor de la p considerándose significativos valores menores de 0.05.

5.9.2 HEREDABILIDAD

Se realizó el análisis de la heredabilidad (h^2 , la proporción relativa de la varianza fenotípica del fenotipo atribuible a los efectos aditivos de los genes) usando el método de componentes de varianza (*variance component method*), este tipo de análisis ya ha sido descrito en otros estudios(2-5).

El poder de este enfoque de componentes de varianza de partición de efectos genéticos y ambientales, permite descomponer la varianza en sus componentes genéticos y ambientales y así poder valorar la variabilidad que explica cada factor. El hecho de trabajar con familias extensas aumenta la calidad de los datos, ya que la misma familia comparte múltiples hogares(5). Para un carácter dado la fórmula sería:

$$h^2 = \mu + \sum B_j + g_i + h_i + e_i$$

μ corresponde a la media poblacional del carácter estudiado

$\sum B_j$ corresponde a las Covariables que afectan al carácter estudiado

g_i es el efecto atribuible a los genes

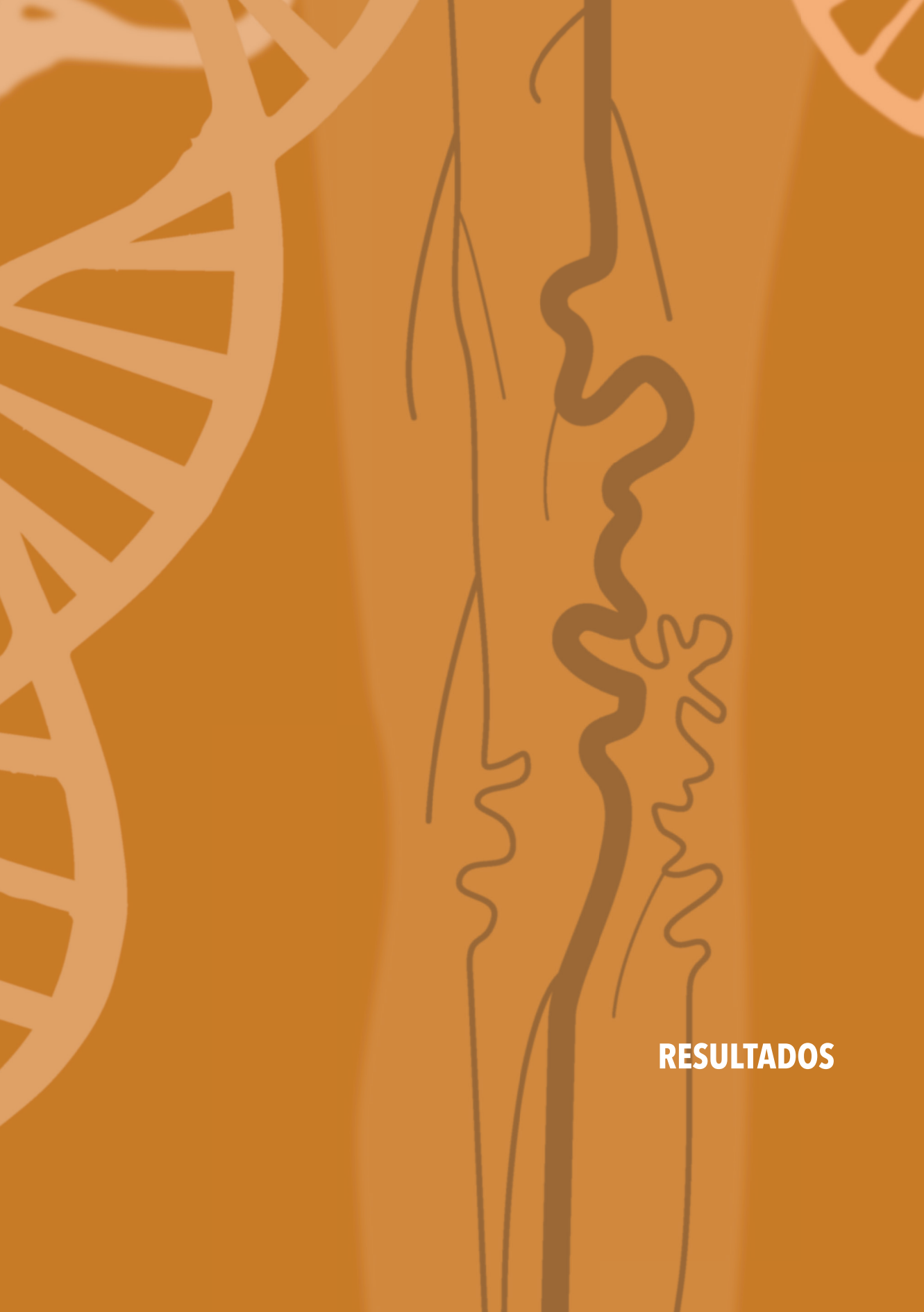
$h_i + e_i$ es el efecto atribuible a los efectos ambientales. h_i : efecto domiciliario compartido; e_i : efecto ambiental individual.

5.9.3 CORRELACIÓN GENÉTICA

Las correlaciones entre 2 rasgos se analizaron mediante modelos de componentes de varianza multivariados (*multivariate variance component models*), que son una extensión del univariate model. De manera similar al modelo univariado para la estimación de la heredabilidad de un rasgo único, el modelo bivariado dividió las covarianzas fenotípicas entre los rasgos en componentes genéticos y ambientales. El parámetro derivado del coeficiente de correlación genética cuantifica los efectos genéticos pleiotrópicos (es decir, un gen puede tener efectos en varios rasgos).

Esta partición es potencialmente valiosa, ya que se pueden revelar relaciones ocultas entre rasgos(101). Al estudiar estos rasgos en familias extensas, podemos estimar de manera segura las correlaciones genéticas (ρ_g) y ambientales(ρ_e) entre rasgos. La siguiente fórmula vincula las correlaciones fenotípicas, genéticas y ambientales entre dos rasgos y tiene en cuenta la heredabilidad para cada rasgo:

$$\rho_p = \sqrt{(h_1^2 + h_2^2)} \rho_g + \sqrt{(1 - h_1^2)} \sqrt{(1 - h_2^2)} \rho_e$$



RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

Durante el periodo del estudio (año 2006-2012), se incluyeron 1163 individuos, de un total de 35 familias extensas. De ellos se consiguieron datos clínicos y poblacionales; y muestras biológicas (ADN y plasma) de 934 individuos. De otros 229 individuos solo se consiguieron datos poblacionales y clínicos, pero no muestras biológicas, principalmente porque se trata de individuos fallecidos o que no pudieron acudir a la recogida de muestras. De los 934 individuos con muestras biológicas para los análisis de fenotipos intermediarios y de genotipación de variantes genéticas, 34 individuos no acudieron para el estudio de las pruebas de EVC, por lo que fueron excluidos. La muestra final para el estudio de EVC consistió en 895 individuos.

El rango de edades fue de los 3 años a los 101 años, con una mediana de 39 años y una media de 38.5 años. 437 individuos fueron mujeres y 458 hombres (Figura 5).

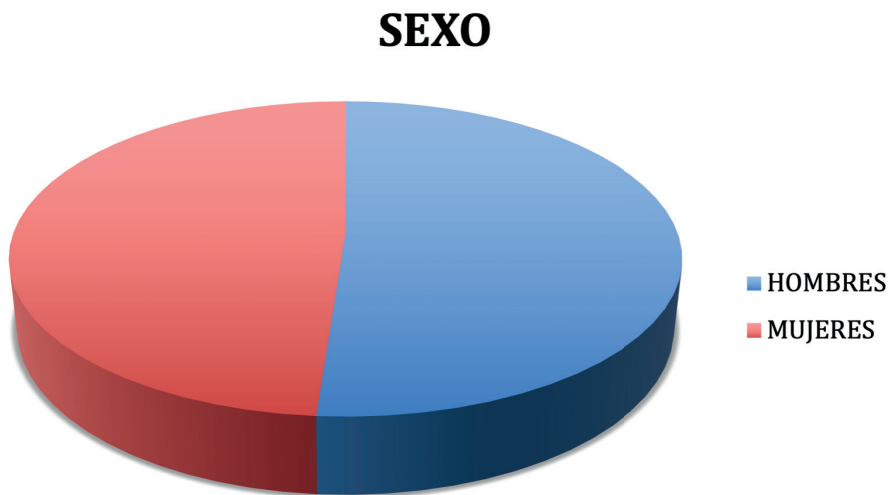


Figura 5: Distribución por sexos de la muestra.

En el estudio 60 individuos, 39 mujeres (65%) y 21 hombres (35%), fueron clasificados como afectados de EVC según los criterios de la CEAP, lo que supone el 6.7% de la muestra. En este grupo se incluyeron las clases C2 a C6 y a los 13 individuos que fueron operados de varices y estaban asintomáticos en el momento de la exploración (Figura 6).

ENFERMEDAD VENOSA CRÓNICA

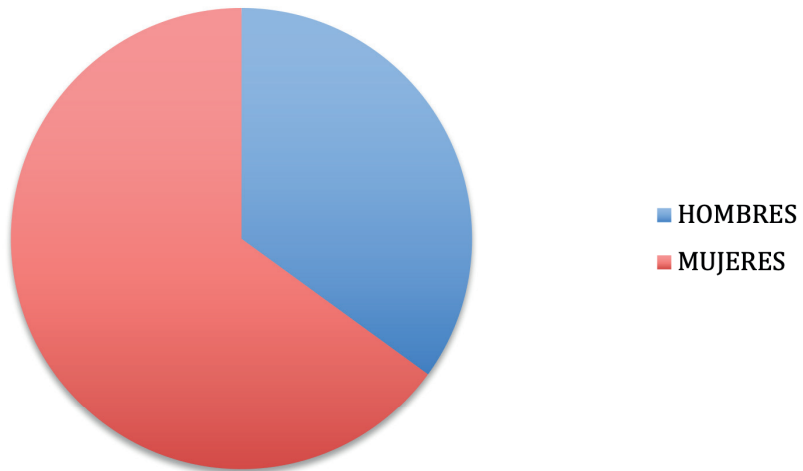


Figura 6: Distribución por sexo de los afectados por la enfermedad venosa crónica.

En la tabla 3 se muestran la distribución de los individuos en base a las categorías CEAP correspondientes:

Tabla 3: Distribución de la muestra según clasificación CEAP para la EVC.

CEAP	Total	Mujeres	Hombres
C0 + C1	835	389	437
C2	17	11	6
C3	2	2	0
C4a + C4	6	3	3
C5	3	0	3
C6 + PREVI	32	23	9
	895	437	458
EVC	60	39	21

La Figura 7 muestra la distribución de EVC entre las familias analizadas, donde 14 no presentaron ningún caso y 21 presentaron algún afectado, concentrándose la mayoría de los casos en 3 familias.

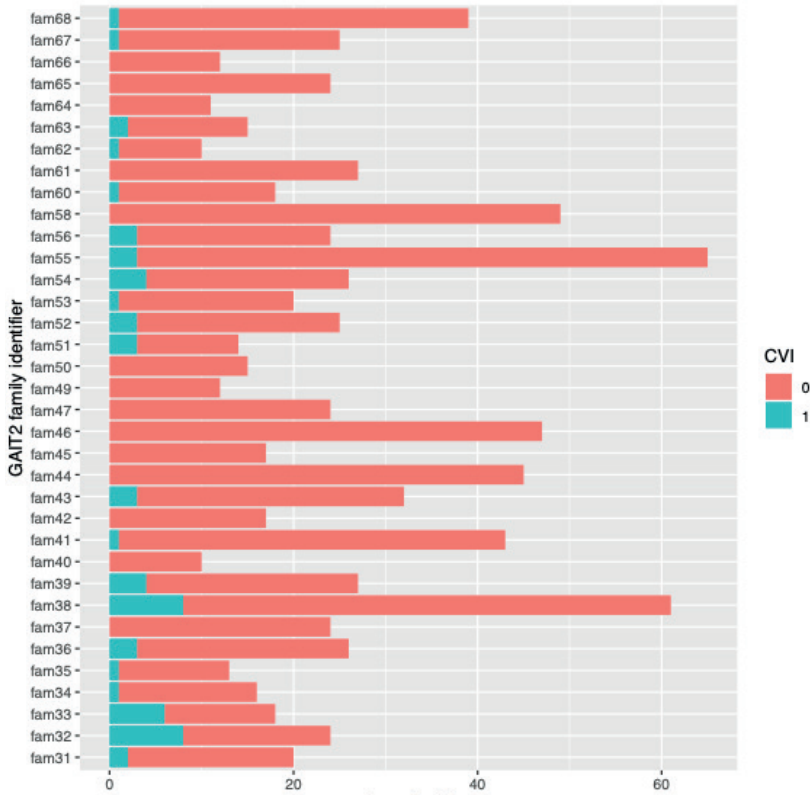


Figura 7: Distribución de los casos de enfermedad venosa crónica en las familias analizadas. 0: sanos, 1: afectados



6.2 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A EVC

Entre las variables poblaciones analizadas mostraron una relación estadísticamente significativa con la EVC la edad ($p=2,3 \times 10^{-6}$), y el sexo ($p=0,008$). Concretamente, mayor edad y sexo femenino se asociación a un mayor riesgo de EVC (Tablas 4 y 5; y Figura 8).

Tabla 4: Factores de riesgo relacionados con la enfermedad venosa crónica

Covariante	Estimación	SE	Chi	pval
EDAD	-0.08	0.02	22.27	0.00000237
SEXO	-0.37	0.14	6.96	0.00834

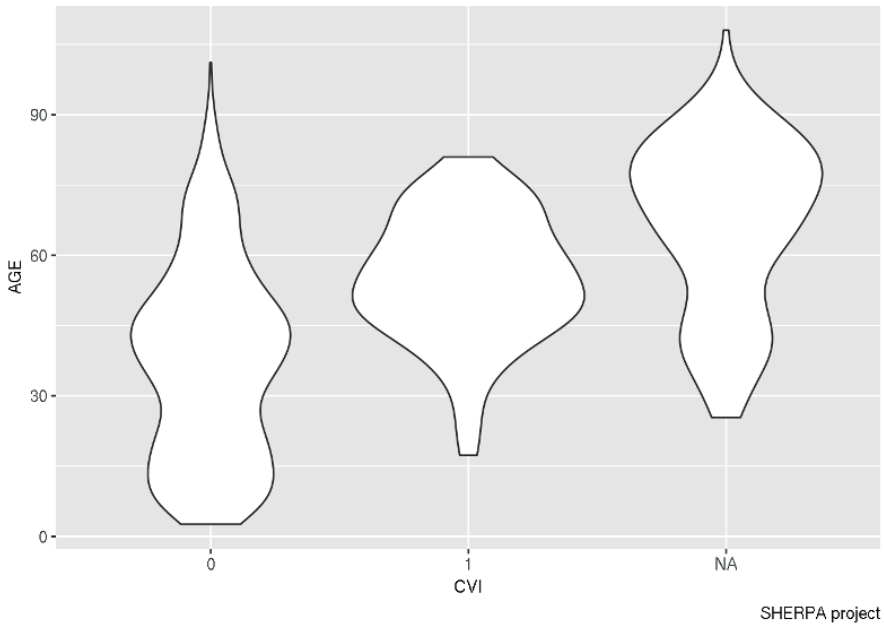


Figura 8: Distribución de edad según presencia de enfermedad venosa crónica. (0: sanos, 1: afectados, NA: no analizados)

En la distribución por sexos (Tabla 5) se objetiva como las mujeres tienen casi el doble de riesgo que los hombres de presentar varices ($p < 0.05$).

Tabla 5: Relación entre enfermedad venosa crónica (EVC) y sexo (siendo 0 ausencia de EVC y 1 presencia). F: femenino, M: masculino.

EVC	SEXO	Freq
0	F	0.911 (91.1%)
1	F	0.089 (8.9%)
0	M	0.954 (95.4%)
1	M	0.046 (4.6%)

6.3 HEREDABILIDAD

La heredabilidad (h^2), proporción de la varianza observada en el riesgo de EVC debida al efecto de los genes, fue de 0,78 ($p = 2,75 \times 10^{-8}$). Estos resultados confirman que el 78% de la variabilidad en la susceptibilidad de presentar EVC es atribuible a factores genéticos. Este resultado fue muy significativo dado el valor de la p ($p = 2,75 \times 10^{-8}$).

6.4 CORRELACIÓN CON RASGOS FENOTÍPICOS HEMOSTÁSICOS

De los 86 rasgos fenotípicos (tabla 1) encontramos que la antitrombina III (ATIII_f), una proteasa no dependiente de vitamina K que inhibe la coagulación se correlacionó genéticamente y de forma muy significativa con EVC ($Rho_g = -0,444$, p -valor = 0,0045). Fig. 9

Los otros rasgos significativos fueron la vitamina B12 ($Rho_g = 0,16$, valor $p = 0,048$) (Fig. 10) y la creatinina (Fig.11) que muestra una correlación genética con la EVC ($Rho_g = 0,29$, valor $p = 0,04$)



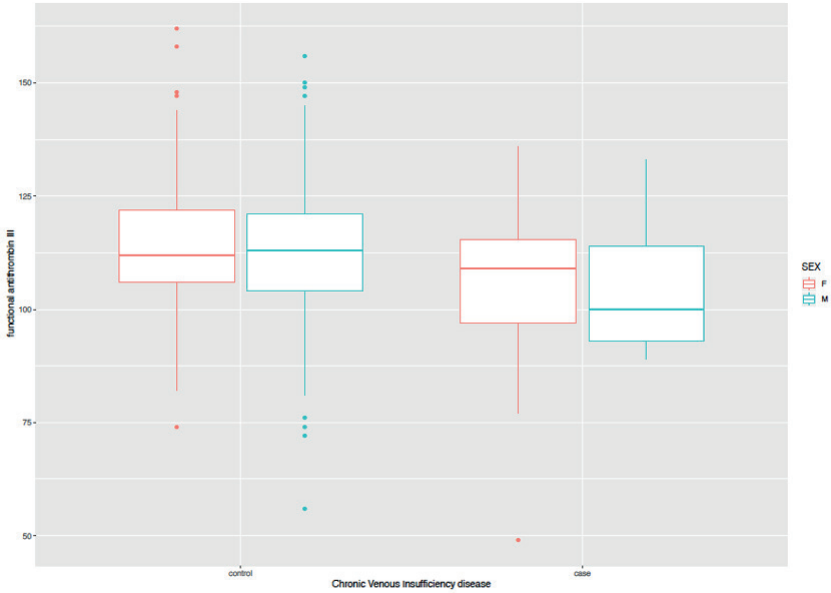


Figura 9: Distribución de los niveles de antitrombina III según sexo entre casos y controles.

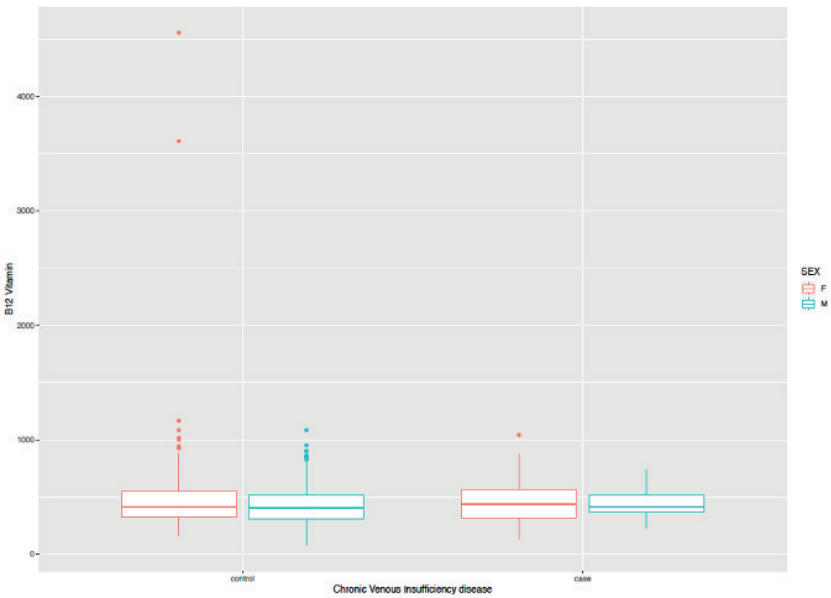
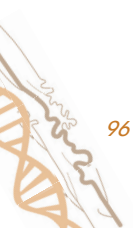


Figura 10: Distribución de los niveles de vitamina 12 según sexo entre casos y controles.



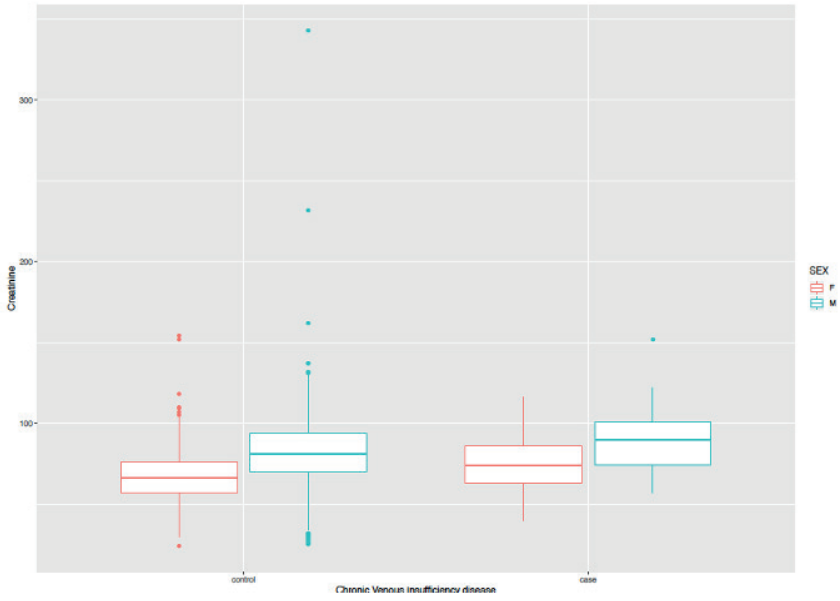


Figura 11: Distribución de los niveles de creatinina según sexo entre casos y controles.



6.5 ASOCIACIÓN DE LA EVC CON GENES CANDIDATOS

Resultados de las pruebas de asociación entre la EVC y cada uno de los 101 SNPs relacionados con la coagulación estudiados:

Tabla 6: Asociación de la enfermedad venosa crónica con 101 SNPs relacionados con la coagulación y el sistema ABO.

	SNP	N	p-value	beta	beta SE	varExp	est_maf
1	rs657152	883	9.11e-03	-0.27	-0.27	0.00	0.46
2	rs5985	895	1.59e-02	0.33	0.33	0.00	0.24
3	rs11925694	454	1.60e-02	0.41	0.41	0.00	0.29
4	rs10965243	454	1.60e-02	-0.48	-0.48	0.00	0.10
5	rs7901695	454	3.08e-02	0.35	0.35	0.00	0.42
6	rs932206	890	3.32e-02	-0.23	-0.23	0.00	0.37
7	rs2036914	894	3.70e-02	0.23	0.23	0.00	0.43
8	PT	623	5.01e-02	3.78	3.78	0.00	0.03
9	rs13387847	888	5.15e-02	-0.24	-0.24	0.00	0.21
10	rs7903146	454	5.63e-02	0.31	0.31	0.00	0.39
11	rs7202185	709	5.94e-02	-0.50	-0.50	0.00	0.04
12	rs302320	890	7.93e-02	-0.43	-0.43	0.00	0.04
13	rs12598	890	9.56e-02	-0.38	-0.38	0.00	0.05
14	rs510290	886	1.13e-01	0.34	0.34	0.00	0.08
15	D10S276	842	1.22e-01	-0.70	-0.70	0.00	0.01
16	rs8181047	454	1.22e-01	-0.31	-0.31	0.00	0.23
17	rs2228243	884	1.33e-01	-0.19	-0.19	0.00	0.20
18	rs8178851	894	1.39e-01	-0.30	-0.30	0.00	0.07
19	rs4253399	893	1.58e-01	-0.15	-0.15	0.00	0.45
20	rs8178847	868	1.62e-01	-0.29	-0.29	0.00	0.07
21	rs2232698	894	1.86e-01	3.94	3.94	0.00	0.01
22	rs1759417	454	1.89e-01	0.41	0.41	0.00	0.07
23	FVLeiden	624	1.93e-01	-0.98	-0.98	0.00	0.00
24	rs2027683	888	1.96e-01	-0.15	-0.15	0.00	0.30
25	rs10811647	454	2.19e-01	0.19	0.19	0.00	0.49
26	rs7034675	883	2.54e-01	-0.13	-0.13	0.00	0.44



	SNP	N	p-value	beta	beta SE	varExp	est_maf
27	rs4470720	890	2.68e-01	-0.21	-0.21	0.00	0.07
28	rs824580	890	2.80e-01	-0.13	-0.13	0.00	0.24
29	rs17116778	454	2.84e-01	3.84	3.84	0.00	0.01
30	rs7107663	454	2.84e-01	3.84	3.84	0.00	0.01
31	rs7930056	454	2.84e-01	3.84	3.84	0.00	0.01
32	ss99307036	454	2.84e-01	3.84	3.84	0.00	0.01
33	rs6808430	886	2.93e-01	-0.32	-0.32	0.00	0.02
34	rs763507	890	3.01e-01	0.11	0.11	0.00	0.49
35	HC677T	622	3.08e-01	0.13	0.13	0.00	0.39
36	rs1593806	856	3.25e-01	0.13	0.13	0.00	0.25
37	rs1026628	802	3.34e-01	-0.11	-0.11	0.00	0.46
38	rs3798220	866	3.53e-01	-0.31	-0.31	0.00	0.02
39	rs4686799	884	3.59e-01	-0.12	-0.12	0.00	0.23
40	rs8119351	890	3.60e-01	0.20	0.20	0.00	0.07
41	rs10965250	441	3.77e-01	-0.15	-0.15	0.00	0.20
42	rs7028570	454	3.77e-01	-0.14	-0.14	0.00	0.42
43	rs2071481	890	3.89e-01	0.17	0.17	0.00	0.11
44	rs7486001	890	4.00e-01	0.23	0.23	0.00	0.05
45	rs2798111	809	4.16e-01	-0.10	-0.10	0.00	0.32
46	rs2238243	798	4.18e-01	-0.09	-0.09	0.00	0.50
47	rs7485577	894	4.21e-01	-0.09	-0.09	0.00	0.26
48	rs1276123	888	4.26e-01	0.12	0.12	0.00	0.17
49	rs1093310	800	4.29e-01	-0.10	-0.10	0.00	0.30
50	rs2289252	894	4.37e-01	-0.08	-0.08	0.00	0.47
51	rs2719736	87	4.53e-01	0.29	0.29	0.00	0.26
52	ATCambri	895	4.64e-01	-0.36	-0.36	0.00	0.01
53	rs121909548	895	4.64e-01	-0.36	-0.36	0.00	0.01
54	rs9489143	890	4.69e-01	-0.13	-0.13	0.00	0.09
55	rs10008492	890	5.14e-01	0.07	0.07	0.00	0.47
56	rs6839415	895	5.22e-01	-0.16	-0.16	0.00	0.04
57	rs17756311	454	5.25e-01	-0.18	-0.18	0.00	0.08
58	rs4459877	890	5.44e-01	0.15	0.15	0.00	0.06
59	rs2553658	813	5.53e-01	0.08	0.08	0.00	0.21



	SNP	N	p-value	beta	beta SE	varExp	est_maf
60	rs4977756	454	5.72e-01	-0.09	-0.09	0.00	0.32
61	rs710446	895	5.86e-01	-0.06	-0.06	0.00	0.45
62	rs4703872	890	6.16e-01	0.05	0.05	0.00	0.45
63	rs10757283	454	6.21e-01	-0.07	-0.07	0.00	0.48
64	rs2017237	800	6.35e-01	0.06	0.06	0.00	0.26
65	rs2078289	800	6.44e-01	-0.06	-0.06	0.00	0.22
66	rs9347258	890	6.66e-01	-0.05	-0.05	0.00	0.46
67	rs2338216	890	6.91e-01	0.04	0.04	0.00	0.44
68	F12C46T	889	7.23e-01	0.05	0.05	0.00	0.22
69	rs12955640	888	7.29e-01	-0.04	-0.04	0.00	0.35
70	rs1785205	888	7.32e-01	-0.04	-0.04	0.00	0.35
71	rs3123108	889	7.51e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.43
72	rs11048667	864	7.52e-01	-0.05	-0.05	0.00	0.13
73	rs10965241	454	7.55e-01	-0.05	-0.05	0.00	0.25
74	rs16946674	886	7.62e-01	0.05	0.05	0.00	0.14
75	rs764129	454	7.70e-01	-0.04	-0.04	0.00	0.44
76	rs867186	801	7.83e-01	0.06	0.06	0.00	0.07
77	rs4676875	890	7.84e-01	0.03	0.03	0.00	0.37
78	rs902320	890	7.91e-01	0.04	0.04	0.00	0.19
79	rs3748400	890	7.96e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.26
80	rs764528	885	8.18e-01	0.06	0.06	0.00	0.05
81	rs1881893	890	8.36e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.13
82	rs10455872	886	8.40e-01	-0.06	-0.06	0.00	0.04
83	rs750753	454	8.65e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.43
84	ss99307928	453	8.65e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.20
85	rs45454293	888	8.82e-01	-0.03	-0.03	0.00	0.08
86	rs2066861	884	8.90e-01	0.02	0.02	0.00	0.20
87	rs6801848	454	8.97e-01	0.02	0.02	0.00	0.25
88	rs7974779	598	9.18e-01	0.04	0.04	0.00	0.03
89	rs3958	714	9.20e-01	0.01	0.01	0.00	0.37
90	rs4737921	889	9.25e-01	-0.01	-0.01	0.00	0.48
91	rs4402960	454	9.39e-01	0.01	0.01	0.00	0.26
92	rs2395269	890	9.41e-01	0.01	0.01	0.00	0.15



	SNP	N	p-value	beta	beta SE	varExp	est_maf
93	rs941374	890	9.52e-01	-0.01	-0.01	0.00	0.17
94	rs1484685	888	9.53e-01	-0.01	-0.01	0.00	0.29
95	DXS406	347	9.63e-01	0.01	0.01	0.00	0.50
96	rs1470579	454	9.66e-01	-0.01	-0.01	0.00	0.26
97	rs636258	890	9.69e-01	-0.01	-0.01	0.00	0.17
98	rs5030062	888	9.69e-01	-0.00	-0.00	0.00	0.40
99	rs10229457	890	9.74e-01	0.00	0.00	0.00	0.36
100	rs10757272	454	9.97e-01	0.00	0.00	0.00	0.39
101	rs2891168	454	9.97e-01	0.00	0.00	0.00	0.39

Se encontró significación estadística ($p < 0.05$) en la relación entre la EVC y los SNPs: **rs5985** ($p = 0,016$), **rs657152** ($p=0.009$), **rs11925694** ($p=0.016$), **rs10965243** ($p=0.016$), **rs932206** ($p=0.03$), **rs7901695** ($p=0.03$), **rs2036914** ($p=0.03$).

Es importante destacar que el polimorfismo **rs5985** se encuentra en el cromosoma 6 gen del factor de coagulación XIII (F13). (102). El rs10965243 se encuentra en el cromosoma 9 y se ha relacionado en un artículo con la diabetes tipo 2 y la patología coronaria (103). El rs932206 se encuentra en el cromosoma 2 y no se ha encontrado ninguna significación clínica con su presencia.

El **rs 657152**, gen ABO en cromosoma 9. Gen que controla el grupo sanguíneo ABO. El **rs11925694**, gen IGF2BP2 en el cromosoma 3. Factor de crecimiento insuline like. Genes susceptibilidad diabetes (104). El **rs7901695**, gen TCF7L2 en el cromosoma 10,. Implicado en la homeostasis de la glucosa en la sangre. Relacionado con la diabetes (105). El **rs2036914**, cromosoma 4, gen factor XI. Este gen codifica el factor de coagulación XI de la cascada de coagulación de la sangre (106).

La presencia del alelo A del gen ABO (tabla 7) se relacionó significativamente con un aumento en la presentación de varices respecto a los que no presentaban ninguno (9.42% vs 3.48% $p=0.002$).



Tabla 7: Relación del alelo A del gen ABO con la enfermedad venosa crónica.

	Sanos	EVC	Total
Grupo A	452 (90.58%)	47 (9.42%)	499 (100.00%)
Grupo no A	361 (96.52%)	13 (3.48%)	374 (100.00%)
Total	813 (93.13%)	60 (6.87%)	873 (100.00%)

El efecto del alelo A es aditivo en lo que se refiere al riesgo de presentar varices (tabla 8). El tener dos alelos A aumento el riesgo de presentar varices respecto a los que tenían un solo alelo (12.15% vs 8.67% $p=0.012$)

Tabla 8: Efecto del número de alelos A del ABO en la enfermedad venosa crónica.

	Sanos	Varices	Total
Grupo no A	361 (96.52%)	13 (3.48%)	374 (100.00%)
Grupo A	358 (91.33%)	34 (8.67%)	392 (100.00%)
Grupo AA	94 (87.85%)	13 (12.15%)	107 (100.00%)
Total	813 (93.13%)	60 (6.87%)	873 (100.00%)

Mientras que el alelo O parece tener un efecto protector (Tabla 9). Los individuos portadores de al menos un alelo están más protegidos que los que no tienen ninguno (5.76% vs 11.8% $p=0.0032$). Este efecto es también aditivo (tabla 10) ya que la presencia de dos alelos O protegen más que la presencia de un único alelo (3.83% vs 7.06% $p=0.00042$).

Tabla 9: Relación del alelo O del gen ABO con la enfermedad venosa crónica.

	Sanos	Varices	Total
Grupo O	671 (94.24%)	41 (5.76%)	712 (100.00%)
Grupo no O	142 (88.20%)	19 (11.80%)	161 (100.00%)
Total	813 (93.13%)	60 (6.87%)	873 (100.00%)



Tabla 10: Efecto del número de alelos O del ABO en la enfermedad venosa crónica.

	Sanos	Varices	Total
Grupo OO	276 (96.17%)	11 (3.83%)	287 (100.00%)
Grupo O	395 (92.94%)	30 (7.06%)	425 (100.00%)
Grupo no O	142 (88.20%)	19 (11.80%)	161 (100.00%)
Total	813 (93.13%)	60 (6.87%)	873 (100.00%)

6.6 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE TODO EL GENOMA (GWAS) CON LA EVC

En el Estudio de Asociación de todo el Genoma (GWAS) se han analizado un total de 10.333.120 de SNPs distribuidos por todo el genoma. Es importante destacar que 16 SNPs mostraron una significación estadística con una $p=10^{-7}$. En la tabla 11 se muestran dichos SNPs.

Tabla 11: Resultado del GWAS.

SNP	pSNP	chr	type
rs1447844	1,6E-07	3	SNP
rs775779	E,74E-07	3	SNP
rs775778	1,86E-07	3	SNP
rs71733839	4,37E-07	3	INDEL
rs199822133	4,63E-07	3	INDEL
rs775764	4,69E-07	3	SNP
rs80275869	7,05E-07	19	SNP
rs73659662	7,99E-07	9	SNP
rs200242468	8,23E-07	9	INDEL
rs62576159	8,23E-07	9	SNP
rs78211157	9,06E-07	9	SNP
rs201313070	9,11E-07	9	INDEL
rs57095228	9,23E-07	9	SNP
rs56029363	9,24E-07	9	SNP
rs80203234	9,5E-07	9	SNP
rs187659990	9,98E-07	2	SNP



Concretamente estos SNPs se localizan en: rs1447844, rs775779, rs775778, rs71733839, rs199822133, rs775764. Están en el gen *ROBO2* (*roundabout guidance receptor 2*) también conocido como *SAX3* ubicado en el cromosoma 3. El SNP rs80275869 está en el gen *NLRP5* también conocido como *MATER*, ubicado en el cromosoma 19. Los SNPs rs73659662, rs200242468, rs62576159, rs78211157, rs201313070, rs57095228, rs56029363, rs80203234 pertenecen al gen *Cylicin II* (*CYCL2*) del cromosoma 9. El rs187659990 ubicado en el gen *ZNF804A* del cromosoma 2.

De los SNPs con las p más significativas ninguno está en la región cromosómica (*locus*) del gen *FOX1* (cromosoma 16q24), asociado con EVC en otros estudios. Otros genes implicados previamente con EVC, como *MMP2* o *COLIA2*, tampoco aparecen asociadas a la EVC en nuestro estudio. La Figura 12 muestra el Manhattan Plot de los resultados de este análisis de GWAS. Este tipo de gráfica es el utilizado para representar en los estudios de GWAS todos los SNPs analizados cromosoma a cromosoma siendo los significativos aquellos que pasen el umbral $p < 10^{-7}$.



Figura 12: Manhattan plot



6.7 CORRELACIÓN GENÉTICA CON OTRAS ENFERMEDADES

Se buscó la correlación genética con diferentes enfermedades, tal como puede verse en la tabla 12. El estudio ha revelado una importante y estadísticamente muy significativa correlación genética entre la EVC y la Enfermedad Tromboembólica Venosa ($\rho_g = 0.80$, con una $p = 0.0069$). Esto sugiere que ambas patologías pueden tener una base genética común. Destacar que no se halló correlación ambiental significativa entre estas dos patologías ($\rho_e = 0.8$, $p = 0.19$), remarcando la importancia de la asociación genética entre ambas. Debido al bajo número de casos en la muestra de enfermedades como la artritis reumatoide, la dermatitis atópica, el vitiligo o la alopecia areata no se pudieron realizar los cálculos de correlación.

Tabla 12: Correlación genética entre la EVC y otras patologías recogidas en los sujetos estudiados.

Estimaterhog0	SErhog0	zscorerhog	rhoe	Estimaterhog	SErhoe	zscorerhoe	rhog0pval	rhoePval	tr1
0,590057212	0,497139	1,186905	rhoe	-0,66675	1,004684	-0,66364	0,159886	0,460762	Trombosis arterial
0,800630878	0,348587	2,296789	rhoe	0,803659	0,908886	0,884224	0,006962	0,198793	Enfermedad tromboembólica venosa
0,692904518	0,265491	2,609901	rhoe	0,790675	0,668842	1,182155	0,007772	0,162676	Trombosis arterial y venosa
-0,071741394	0,994604	-0,07213	rhoe	-0,84354	1,000147	-0,84342	0,791177	0,404317	Asma
-0,237963464	1,004286	-0,23695	rhoe	1	0	Inf	0,471774	0,091569	Rinitis alérgica
-0,243858884	1,442732	-0,16903	rhoe	1	0	Inf	0,35187	0,341548	Psoriasis
-1	0	-Inf	rhoe	1	0	Inf	0,014822	0,010377	Dermatitis atópica
1	0	Inf	rhoe	-0,35814	1,097636	-0,32628	0,444176	0,784174	Artritis reumatoide
0,215534727	0,999183	0,215711	rhoe	-0,33149	0,999685	-0,33159	0,157565	0,629592	Hipertensión arterial
-0,123736668	0,448653	-0,2758	rhoe	-1	0	-Inf	0,780406	0,343173	Neoplasias
0,109401939	0,329048	0,33248	rhoe	-0,60904	2,712418	-0,22454	0,734211	0,824609	Tiroiditis autoinmune
-0,376526649	0,995412	-0,37826	rhoe	1	0	Inf	0,183095	0,008442	Hypersensitivity
-0,347807103	0,293871	-1,18354	rhoe	0,782926	1,151529	0,679901	0,215339	0,348104	Autoinmune
0,486488641	1,883929	0,258231	rhoe	0,449633	0,868804	0,517531	0,625903	0,609846	Diabetes Mellitus







DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Identificar los factores genéticos implicados en el desarrollo de patologías es uno de los objetivos fundamentales de la medicina moderna imprescindible para la transición de la medicina reactiva (intervenir cuando ya ha aparecido la enfermedad) a la medicina preventiva (intervenir antes de que aparezca la enfermedad). Encontrar las variantes genéticas implicadas en el desarrollo y progresión de enfermedades nos puede llevar, no sólo a mejorar la prevención, sino a entender la fisiopatología de estas enfermedades y mejorar el diagnóstico y tratamiento. Sin embargo, en el ámbito de la Genómica, los buenos resultados obtenidos en la identificación de factores genéticos asociados a enfermedades monogénicas o mendelianas contrastan con la dificultad que suponen la identificación de la base genética de las enfermedades complejas.

Para abordar el estudio de una enfermedad compleja, como es la EVC, hemos diseñado un estudio innovador en nuestro campo, basado en familias extensas, siguiendo un enfoque multidisciplinar (datos clínicos y genómicos) y una metodología robusta (cálculo de la heredabilidad y asociación con variables fenotípicas y genéticas) para poder evitar posible sesgos. En este sentido es importante destacar que se ha usado la terminología recomendada por el VEIN-TERM (8) y la clasificación CEAP en su versión resumida del 2004 (12), ofreciendo un lenguaje común y estandarizado en lo que a la patología venosa se refiere, tal como reclaman Carpentier (38) y Allegra (11) en sus trabajos recalcando que hay pocos estudios que utilicen la CEAP como medida fenotípica.

Un aspecto importante a destacar ha sido la recogida de datos por parte de un cirujano vascular experto, evitando así el uso de auto-cuestionarios. Tal como demuestra Ahti (47), la información sobre antecedentes familiares o sobre la presencia de varices recogida en forma de auto-cuestionarios tienen un sesgo de memoria importante por lo que concluyen que el único medio válido para realizar este tipo de estudios, es la evaluación de los antecedentes familiares de varices con el examen clínico de los pacientes y sus familiares, tal como hemos realizado en este estudio.

A partir de estos datos clínicos, el presente trabajo aborda el estudio de la EVC, a partir de dos enfoques genéticos complementario: i) análisis de variantes en genes candidatos (aquellos que por su función podrían estar implicados en la enfermedad) y ii) analizando variantes genéticas distribuidas por todo el genoma. Esta última permite un enfoque global (genómica) sin hipótesis previas de partida sobre la funcionalidad de las variantes analizadas, lo que permite identificar genes no implicados en la enfermedad previamente. Este enfoque genómico en EVC aplicado a familias extensas constituye un trabajo único hasta la fecha.

Desde el punto de vista poblacional, el estudio demuestra que la edad y el sexo son dos factores significativamente implicados en la aparición de la enfermedad con un coeficiente de regresión para la edad de -0.08 ($DE=0.02$, $p=0.0000237$); y sexo del -0.37 ($DE=0.14$, $p=0.00834$). En la muestra estudiada a mayor edad más riesgo de presentar varices. Esto sucede tanto en hombres como en mujeres, siendo entre las mujeres el aumento más significativo. Este resultado es compartido por otras investigaciones (38) (37) (43) por lo que podemos considerar que la edad es uno de los factores más relacionados con el riesgo de presentar EVC.

La edad² (también presenta un valor significativo) indicando que este riesgo no sigue una relación lineal sino logarítmica, es decir el incremento del riesgo es mayor para mayores edades. Este resultado podría indicar la presencia de algún factor degenerativo que contribuyera a la aparición de la EVC. Dado el alto grado de heredabilidad obtenido este factor podría tener un sustrato genético.

La relación entre el sexo y la EVC ha sido muy discutida en la bibliografía revisada. A pesar del tipo de diseño planteado en el estudio, con una muestra que podría no ser representativa de la población, identificamos 60 individuos con EVC, 39 mujeres (65%) y 21 hombres (35%), encontrando una relación entre el sexo femenino y la presencia de EVC, donde la frecuencia de varices es el doble entre las mujeres comparada con los hombres. Este resultado concuerda con otras publicaciones (23) (24) (27) por lo que podría existir algún factor hormonal o genético que justificara estos resultados.

Al analizar la distribución de casos de EVC por familia llama la atención que en una enfermedad con una prevalencia tan elevada, hasta el 44% en el estudio Detect-IVC(24), presente una distribución tan segregada entre las familias. Vemos que hay 14 familias sin ningún caso y 21 con algún afectado, concentrándose la mayoría en 3 familias. La percepción de la existencia de una agregación familiar en la EVC ha sido estudiada en numerosos artículos (24, 25, 36-40, 43, 44, 68) (66, 67). Son los estudios de Cornu-Thénard (72), Carpentier (38) y Kroeger (32) los que de forma más evidente encuentran esta agregación familiar.

La agregación familiar es causa necesaria pero no suficiente para inferir un sustrato genético en la transmisión de una enfermedad ya que los componentes ambientales (que pueden compartir individuos que viven juntos) pueden jugar un papel importante. En el trabajo de Kohno (107) se estudió el riesgo de presentar varices en 80.214 niños adoptados según la afectación de los padres tanto biológicos como adoptados. Se pudo constatar que los niños adoptados con padres biológicos afectados tenían más riesgo de presentar varices ($SIR=2.2$; 95% CI, 1.91-2.55) que los niños con el padre biológico sano y el padre adoptivo con varices ($SIR=1.15$; 95% CI, 0.92-1.42). Estos estudios avalan la presencia de factores genéticos en la EVC. Los resultados del presente estudio demuestran la importante base genética de la EVC con una heredabilidad del 78% con una $p=3.5 \times 10^{-8}$. Este resultado pone de manifiesto el alto impacto del componente genético en la etiología de la enfermedad y abre el

camino para abordar la identificación de las bases genéticas de la EVC.

Aunque Fukaya et al.(108) ya reportaron una heredabilidad del 28%, su trabajo difiere en la metodología de estudio. Su muestra son datos recogidos de la base de datos UK Biobank durante los años del 2006 al 2010, y es una cohorte longitudinal de individuos de 40 a 69 años. Si tenemos en cuenta que el riesgo de varices se incrementa de forma exponencial con la edad, podemos decir que no es una muestra representativa de la población. Otro aspecto es la recogida de datos, ya que los individuos son catalogados como afectados en función del código ICD, no utilizan por tanto la nomenclatura estandarizada de la CEAP. La forma de calcular la heredabilidad es diferente en los dos trabajos, mientras ellos utilizan una estimación de la heredabilidad a través de los SNPs del GWAS, en nuestro estudio la calculamos directamente en familias extensas, siendo esta última forma metodológicamente más correcta.

Otro aspecto remarcado por ellos mismos es que los individuos catalogados como sanos no pueden ser excluidos como afectados ya que no han sido explorados por un especialista en cirugía vascular, simplemente podría ser que no hayan buscado atención médica. Por lo tanto, tal como ellos mismos admiten en su estudio, podrían estar infra-estimando el resultado de algunas asociaciones y explicaría la diferencia de resultados respecto a nuestro trabajo. Aun teniendo en cuenta todas estas limitaciones concluyen que la EVC tiene una alta heredabilidad remarcando la importancia de encontrar el sustrato genético de dicha patología.

Fiebig et al. (44) en su trabajo publicado en el 2010 encontraron una heredabilidad del 17.3% +/- 2.5% ($P= 1.4 \times 10^{-3}$), la cual es significativamente más baja que la hallada en nuestro estudio. A pesar de ello concluye que la heredabilidad es el factor de riesgo más importante en la aparición de EVC. El estudio de Fiebig muestra similitudes con el nuestro ya que ambos utilizan familias para calcular la heredabilidad. A pesar de contar con un tamaño muestral mayor, plantea varios problemas metodológicos que hacen que nos cuestionemos sus resultados. Estos autores reclutan pacientes ingresados en una clínica por presentar EVC, siendo el 71% de los sujetos incluidos mujeres, resultado coherente con el hecho de que son las mujeres las que con más frecuencia consultan por problemas relacionados con la EVC (109). Esto supone un sesgo importante de selección que genera que la muestra no sea representativa de la población. Por otro lado, este estudio carece de grupo control, lo cual en estudios de heredabilidad que se basan en poblaciones es de suma importancia. Otro sesgo es la recogida de datos referentes a los familiares, ya que esta información la aporta el paciente por medio de un auto-cuestionario. Tal como expone Ahti (47), la información obtenida a partir de entrevistas o auto-cuestionarios, suponen un sesgo de memoria importante, concluyendo que el único medio válido para realizar este tipo de estudios, es la evaluación de los antecedentes familiares de varices con el examen clínico de los pacientes y sus familiares, tal como nosotros hemos realizado. En nuestro estudio no se han utilizado auto-cuestionarios y todos los individuos han sido evaluados por un cirujano vascular.

Queremos destacar que la heredabilidad obtenida en el presente trabajo tiene importantes repercusiones clínicas. Por un lado, demuestra el escaso efecto de los factores ambientales sobre la aparición de la enfermedad, lo que evidencia la escasa repercusión de las medidas higiénico dietéticas en la prevención de las varices, especialmente en aquellos individuos que presenten una gran predisposición genética en su aparición de la enfermedad. Por otro lado, se justifica centrar los esfuerzos en la investigación genética con tal de detectar los genes implicados, y los mecanismos fisiopatológicos reguladores de la expresión de estos genes, para poder comprender en profundidad el origen de la enfermedad y así poder encontrar tratamientos centrados en evitar su aparición y no en controlar sus consecuencias.

Un punto importante es la relación entre Enfermedad tromboembólica venosa (ETV) y EVC. Históricamente, esta relación siempre ha sido controvertida. Los trabajos de Heit (110) y Müller (57) muestran como las varices son un factor de riesgo importante en la presentación de trombosis venosa profunda (TVP). Müller, en una cohorte de casos y controles, encuentra 132 casos de TVP entre los 2.357 afectados de varices lo que supone un 5.6%, mientras que sólo se encuentran 728 casos entre los 80.588 pacientes sin varices, un 0.9%. Concluye que hay prestar especial atención a los pacientes con varices, historia previa de TVP, cáncer u hospitalización reciente.

Cushman y cols (41) encuentra que los niveles altos de FVIII, factor von Willebrand y D Dímero asociados a un aumento del riesgo y de la gravedad de presentar EVC. Mientras que las variantes genéticas del Factor V Leiden o la mutación 20210A no tuvieron ninguna relación.

Recientemente, Chang y cols (111) reportan una relación significativa entre EVC y ETV. En una muestra retrospectiva con 212.984 pacientes con varices y 212.984 controles, la presencia de varices se asoció a mayores ratios de incidencia de TVP (6.55 vs 1.23 por 1000 personas-año) con una diferencia de riesgo absoluto (DRA) de 5.32 (IC 95%, 5.18-5.46). Para la Embolia Pulmonar (EP) las incidencias fueron de 0.48 en el grupo de varices vs 0.28 en el grupo control, con una DRA de 0.20 (IC 95%, 0.16-0.24). Los hazard ratios para el grupo de varices comparado con los controles fueron de 5.3 (IC 95%, 5.05-5.56) para la TVP y de 1.73 (IC 95%, 1.54-1.94) para el EP. En sus conclusiones finales indican que si esta relación es causal o si existen factores comunes debería ser objeto de futuras investigaciones.

Es el estudio publicado por Zöller (112) el que reporta una agregación familiar entre las varices y la ETV. Según este trabajo las personas con parientes con varices tienen un riesgo aumentado de presentar ETV con un *standar incidence ratio* (SIR) de 1.30, 95% (1.26 - 1.33), mientras que las personas con parientes con ETV tienen un riesgo aumentado para presentar varices, SIR 1.30, 95% (1.27 a 1.34). Encuentran también un aumento del riesgo a mayor número de miembros afectados en la familia. Un aspecto a destacar es que la relación entre varices y ETV no se limita tan sólo a las piernas ya que se encuentran también casos de EP sin TVP en EEII o trombosis de otras venas del cuerpo. Curiosamente no se aprecia esta relación entre los/as conyugues de los



afectados por ETV o varices, lo que indica que no existe una relación ambiental en la aparición o que esta, de existir, es muy débil, en concordancia con los resultados de nuestro estudio donde la principal componente que influye en la aparición de la enfermedad es genética. El estudio de Zöller et al. concluye que las varices y la ETV comparten una susceptibilidad familiar y que unido a la importante agregación familiar y al bajo riesgo entre los cónyuges esta relación puede ser genética. Siguiendo con la premisa de que existe una relación entre EVC y ETV, Wassel (113) desarrolla un score de riesgo genético con *loci* de ETEV para evaluar el riesgo de EVC. En su estudio incluyen 1.447 participantes genotipados para 33 SNPs en 22 loci de riesgo para ETV. Su score de riesgo genético para la EVC usando marcadores de riesgo de la ETEV funcionó en todos los grupos étnicos y raciales contribuyendo significativamente a la predicción. Las diferencias encontradas establecen la necesidad de estudiar de forma más profunda la arquitectura genética cada grupo racial.

En el presente trabajo se confirma la hipótesis de Zöller (112) y se ha demostrado una importante correlación genética de las varices con la ETEV con una $\rho_g = 0.80$, con una $p = 0.0069$. Si bien existe también una correlación ambiental, está no llega a ser significativa ($\rho_e=0.8$, $p=0.19$). Por lo tanto, sí que parece existir relación entre la EVC y la ETEV y además podemos confirmar que es una relación principalmente genética. Estos resultados concuerdan con los publicados por Fukaya en 2018 (108) donde también encuentran una correlación genética muy importante entre varices y TVP con una $r_g=0.36$; $p=5.5 \times 10^{-7}$. Esta correlación, menor que la encontrada en nuestro estudio, puede ser debida, como hemos indicado anteriormente, a una infraestimación de los resultados. A pesar de todo concluyen que la historia de TVP es la que presenta mayor correlación genética con la EVC.

Dada la alta prevalencia de la EVC entre la población, el demostrar la relación genética con una patología tan grave como la ETEV supone un gran avance ya que son muchas las personas que se pueden ver afectadas por estas dos patologías, y enfatiza la importancia de la prevención de la EVC. El hecho de considerar la EVC como una enfermedad benigna supone un grave error, especialmente en algunos pacientes por su riesgo aumentado de presentar ETEV. En este sentido, es importante tener en cuenta que la ETEV tiene un tratamiento preventivo como son los tratamientos anticoagulantes, y por tanto identificar los pacientes que se pueden beneficiar de ellos es un aspecto clave en esta patología. Por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio plantean una nueva área de investigación terapéutica en el contexto del uso de los fármacos anticoagulantes en pacientes con EVC avanzada y alto riesgo de ETEV.

La presencia de esta relación genética demuestra la existencia de factores comunes que afectan a ambas patológicas, la ETEV y la EVC. Para profundizar más en los aspectos de esta correlación, hemos observado una alta asociación genética entre la EVC y la ETEV con fenotipos de la coagulación (ver tabla 1). Concretamente, hemos encontrado una correlación genética significativa con fenotipos de la hemostasia como son la antitrombina III (ATf), y la vitamina B12. Estos resultados concuerdan



con la correlación encontrada con la ETEV, remarcando todavía más la relación entre ambas patologías. La antitrombina III es un inhibidor natural de la coagulación y sus niveles bajos se asocian significativamente al riesgo de ETV. En la muestra estudiada sus niveles son mayores en los controles, lo que pone de manifiesto el estado pro-coagulante de los afectados por la EVC y la relación entre estas dos patologías. La disminución de la función renal es un claro marcador de patología arterial (114) pero no se ha relacionado hasta la fecha con patología venosa crónica, por lo que se abre una vía de investigación entre la función renal y la EVC.

Finalmente, la vitamina B12 es una vitamina hidrosoluble que tiene un papel esencial en el funcionamiento del sistema nervioso, de la eritropoyesis y en la formación de otras proteínas. Está implicada en el metabolismo celular y en la síntesis y regulación del ADN. Su déficit provoca anemia megaloblástica (115). A pesar de tener un papel importante en la regulación del ADN tan sólo hay publicado un trabajo donde se estudia su relación con las varices (116); en él se concluye que no hay relación entre el déficit de vitamina B12 y la aparición de varices, a pesar de que los casos estudiados presentaban niveles levemente superiores de vitamina B12 que los controles. Nuestros resultados muestran una correlación positiva con los niveles de vit B12, es decir, los genes que regulan al alza la vit B12 parecen aumentar el riesgo de EVC. Sería importante replicar estos resultados en un estudio independiente para profundizar el papel que podría tener la vitamina B12 en enfermedad vascular en general y en EVC en particular.

Una vez demostrada la importante implicación de factores genéticos estudiados en la susceptibilidad a padecer EVC, hemos abordado la identificación de estos factores genéticos desde dos estrategias complementarias. En primer lugar, analizando variantes genéticas en genes candidatos que son aquellos que codifican para proteínas que participan en mecanismos implicados en procesos fisiológicos cuyas alteraciones podrían conducir a la aparición de EVC. Hemos seleccionado principalmente aquellas variantes genéticas relacionadas con la hemostasia y la cascada de la coagulación sanguínea. De los 101 SNPs analizados hemos encontrado una asociación significativa con 6 de ellos. Concretamente:

- el **rs5985** del gen *F11* que codifica para el factor XIII de la coagulación ubicado en el cromosoma 6, en el exón que codifica para el polipéptido A1. Niveles bajos de factor XIII se han relacionado con la aparición y la peor evolución de úlceras venosas (clase 6 de la clasificación CEAP) (117). También se ha publicado que ésta variante genética (su alelo más prevalente) tenía un carácter protector contra el infarto de miocardio y la trombosis venosas (102).
- La variante **rs2036914**, en el gen *F11* que codifica para el factor XI de la coagulación en el cromosoma 4. Esta proteína está presente en el plasma como un zimógeno. Este factor plasmático activado XI activa la fase media de la vía intrínseca de la coagulación sanguínea al activar el factor IX. Los defectos en este factor conducen al síndrome de Rosenthal, una anomalía

de la coagulación de la sangre (106), y los niveles altos de FXI se han asociado a ETV.

- De especial relevancia es la asociación encontrado entre la variante genética **rs 657152**, ubicada en el gen *ABO* en el cromosoma 9, y la EVC. Es una sustitución A>C/A>T que provoca una variación en el intrón ABO. Este gen codifica la glicosiltransferasa responsable de la determinación del grupo sanguíneo ABO (118). En nuestro estudio ser portador del alelo A (grupo sanguíneo A) aumenta tres veces el riesgo de presentar varices respecto a los no A (9.42% vs 3.48%). Este efecto es además aditivo ya que entre los portadores de 2 alelos A aumenta la presencia de varices respecto a los portadores de un solo alelo (12.15% vs 8.67%). Los resultados demuestran que la presencia del alelo O es protectora frente a la aparición de EVC. Los individuos con al menos un alelo O presentaron la mitad de tasa de varices que los no poseedores (5.76% vs 11.80%). El efecto es también aditivo ya que el tener los dos alelos O tiene mayor protección (3.83% de varices con dos alelos O vs al 7,06% con un solo alelo). Estos resultados concuerdan con la bibliografía previa (118-120), donde la presencia del alelo A se relacionó con la presencia de EVC. Por otro lado, la relación entre el ABO y la ETEV es bien conocida (121, 122). La asociación entre el grupo sanguíneo ABO y la EVC por una lado, y la ETV por otro, vuelve a poner de manifiesta la existencia de factores genéticos implicados en la aparición de ambas enfermedades, como demuestra la importante correlación genéticas identificada en nuestro estudio. Desde un punto de vista funcional, el grupo sanguíneo ABO se encarga de modular los niveles circulantes del factor von Willebrand (vWF), el cual regula la adhesión de las plaquetas y estabiliza el factor VIII de coagulación. Los portadores del alelo O tienen una disminución marcada del nivel de ambos factores en comparación con los individuos que no son O. El ABO es por tanto un nexo de unión claro entre la EVC y la ETEV haciéndolo por tanto un buen objetivo para realizar estudios de gen candidato.

Si comparamos los resultados del presente con los de Wassel (113) vemos que los genes del Factor XIII, del ABO y del factor XI coinciden como marcadores de riesgo asociado a varices y ETEV. De esta forma se puede corroborar la relación a nivel genético de los mecanismos de coagulación sanguínea en ambas patologías.

Otra de las variantes genéticas asociada con EVC es la variante **rs11925694**, en el gen *IGF2BP2* en el cromosoma 3, que codifica el factor de crecimiento *insuline-like*. El **rs7901695**, en el gen *TCF7L2* en el cromosoma 10, está implicado en la homeostasis de la glucosa en la sangre. Al igual que las dos variantes anteriores, estos dos genes están implicados en la susceptibilidad para la diabetes (104). Hasta la fecha este es el primer estudio que encuentra relación entre estos genes y la EVC y, aunque no se han encontrado estudios que relacionen la EVC con la diabetes, estos resultados abren una nueva vía de investigación en este ámbito.



La segunda estrategia para abordar la identificación de las bases genéticas de la EVC ha sido el análisis de asociación global del genoma (conocido por sus siglas en inglés GWAS). Estos estudios constituyen una herramienta indispensable para el estudio de las enfermedades complejas. Con ellos se puede estudiar la asociación de millones de SNPs con fenotipos complejos en muestras de gran tamaño. Representa ventajas respecto a los estudios basados en genes candidatos, ya que estos últimos se centran en pocos genes que son seleccionados partiendo de una posible relación con la enfermedad que estudiamos, aportando datos que en ocasiones son difíciles de replicar (75). Ofrecen también ventajas respecto a los estudios de ligamiento basados en familias, ya que estos últimos han funcionado muy bien en enfermedades de tipo Mendeliano donde unos pocos marcadores tienen un alto impacto en la aparición del fenotipo, mientras que en enfermedades complejas donde el fenotipo está afectado por cientos o miles de marcadores genéticos, con un efecto menor, funciona mejor el GWAS (75).

En el presente trabajo se han estudiado 10.333.120 variantes genéticas tipo SNPs distribuidas por todo el genoma, donde destacan 16 SNPs con un valor muy significativo. Concretamente, las variantes rs1447844, rs775779, rs775778, rs71733839, rs199822133, rs775764. Están en el gen *ROBO2* (*roundabout guidance receptor 2*) también conocido como *SAX3*, ubicado en el cromosoma 3. La proteína codificada por este gen, perteneciente a la familia *ROBO*, codifica para un receptor transmembrana de la proteína homóloga 2 de la hendidura y funciona en la guía de los axones y la migración celular. Las mutaciones en este gen están asociadas con el reflujo vésico-ureteral, caracterizado por el flujo de orina hacia atrás desde la vejiga hacia los uréteres o el riñón (123). En ratones está involucrado en el desarrollo del pericardio, el miocardio del asta sinusal y la alineación de la vena cava (124). Se ha asociado también con el cáncer de próstata (125) y con el cáncer gástrico (126). El estudio de la afectación a nivel de membrana vascular es uno de los objetivos para comprender la degeneración de las venas, por lo que valorar la función del *SOX3* en la pared varicosa puede ser una nueva línea de investigación.

El SNP rs80275869 está en el gen *NLRP5* también conocido como *MATER*, ubicado en el cromosoma 19. La expresión de su ARNm (aproximadamente 4,2 kb) está restringida a los ovocitos. La caracterización del gen *NLRP5* humano y su proteína proporciona una base para investigar sus implicaciones clínicas en la insuficiencia ovárica prematura autoinmune y la infertilidad en las mujeres (127). También se asociado a la progresión y edad de aparición de la esclerosis múltiple (128). Las mutaciones de *NLRP5* sugieren conexiones entre la aptitud reproductiva materna, el desarrollo cigótico temprano y la impronta genómica (129). No existe hasta la fecha ningún estudio que relacione la EVC y el gen *NLRP5* pero la clara asociación entre el sexo femenino y la EVC puede indicar una relación pendiente de confirmar.

Los SNPs rs73659662, rs200242468, rs62576159, rs78211157, rs201313070, rs57095228, rs56029363, rs80203234 pertenecen al gen *Cylicin II* (CYCL2) del cromosoma 9. Se expresa específicamente en los testículos y forma parte del cáliz citoesquelético de las cabezas de espermatozoides de mamíferos (130). Tampoco se ha reportado ninguna relación entre la EVC y este gen (o la expresión de su proteína). Los SNPs rs187659990 y rs181973206 pertenecen al gen *ZNF804A* en el cromosoma 2 que codifican una proteína de unión a los dedos de zinc. Se cree que los polimorfismos en este gen, especialmente rs1344706, confieren mayor susceptibilidad a la esquizofrenia, al trastorno bipolar y la adicción a la heroína (131). Se ha establecido también su relación con el riesgo de presentar lupus (132). Tampoco se ha reportado ninguna relación entre la EVC y este gen (o la expresión de su proteína).

Es importante destacar que, hasta la fecha, hay publicados cuatro estudios donde se ha realizado GWAS para el estudio de la EVC, ninguno de ellos en familias extensas como el presentado en este trabajo. El primero fue realizado por “23andMe” Biotechnology Company (Mountain View, California) presentado en el 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics (119). Sobre una muestra de 92.666 individuos se tomaron casos y controles en base a un cuestionario, encontrando 12 SNPs asociados a la EVC siendo el más relevante el gen ABO. En el presente estudio, utilizando la estrategia de genes candidatos, también encontramos asociación con el gen del ABO y determinamos que es el alelo A1 de este locus el que confiere más riesgo de desarrollar EVC. El resto de SNPs reportados en este estudio no coinciden con los identificados en el nuestro.

Un segundo estudio, fue publicado por Ellinghaus (133), con 2.269 casos y 7.765 controles. Los casos fueron diagnosticados usando la clasificación CEAP en una clínica especializada. No obstante, los controles fueron tomados de una base de datos (PopGen biobank) sin supervisión médica directa, por lo que no se puede excluir la presencia de EVC. Encontraron dos SNPs relacionados con la EVC ubicados en los genes EFEMP1 y KCNH8 (rs17278665, rs727139 con $p < 5 \times 10^{-8}$), y una asociación sugestiva que rozaba la significación estadística en el gen SKAP2 (rs2030136 con $p < 5 \times 10^{-8}$). Tampoco estas variantes genéticas estaban asociadas a EVC en nuestro estudio.

Shadrina et al (118) realizan el GWAS de dos poblaciones diferentes. La primera muestra fue de población rusa (709 casos y 278 controles) y la segunda de una cohorte de población británica tomada de una base de datos del reino unido (10.861 casos y 397.594 controles). La muestra de la población británica es la misma que posteriormente publicará Fukaya (120). La muestra de población rusa fue explorada medicamente tanto los casos como los controles, mientras que la muestra británica se basa en un registro sin supervisión médica directa. En la población rusa ningún SNP alcanzó la significación estadística de 10^{-8} , pero el rs11121615 (gen CASZ1) fue



el más significativo. En la población británica el rs11121615 (gen CASZ1), rs6712038 (gen PPP3R1) y el rs6062618 (gen SOX18) obtuvieron una significación estadística mayor de 10^{-8} . Tampoco estas variantes genéticas han aparecido asociadas a EVC en nuestro estudio.

El último trabajo a comentar, publicado por Fukaya (120), estudia el GWAS en una población británica de 9.577 casos y 327.959 controles de una muestra recogida de un biobanco (UK Biobank), identificándose 30 *loci* relacionados con la aparición de varices, todos ellos con una significación estadística mayor de 10^{-8} . Los más significativos fueron el rs11121615 (gen CASZ1), el rs2911461 (gen PIEZO1), rs2861819 (gen PPP3R1), rs7773004 (gen HFE) y el rs8053350 (gen GALNS). Varias de estas variantes coinciden con el estudio de Shadrina et al (118), porque están utilizando los mismos datos de los mismos individuos, por lo que no se trata de señales genéticas independientes. Los resultados obtenidos en los citados estudios ponen de manifiesto la dificultad que supone el estudio de una enfermedad compleja. En la tabla 13 Vemos claramente cómo se afectan genes relacionados con la angiogénesis y la pared vascular (*CASZ1*, *PPP3R1*, *ADM*, *SOX18*, *VEGFA*, *ANGPT1*, *ANGPT2*), pero también vemos otros genes relacionados con vías de señalización y con la coagulación. Es aquí donde radica la dificultad a la hora de encontrar genes candidatos que aporten información sobre los mecanismos fisiopatológica de esta enfermedad, donde numerosas vías pueden tener diferente incidencia en su aparición. Los resultados del presente estudio encuentran también ciertas vías de señalización como posible diana en la aparición de varices. El gen *ROBO2* es una proteína relacionada con la migración celular y en ratones se relaciona con la formación de grandes vasos. Encontramos también relación con genes relacionados con los ovocitos y los espermatozoides, tal como lo hacen el equipo de "23andMe"(119), lo cual podría indicar una posible relación entre el sexo y las varices. Sin embargo, nuestro trabajo aporta información muy relevante sobre los mecanismos de la EVC no identificada en estos estudios previos, muy especialmente en el ámbito de la coagulación.

Tabla 13: Principales single nucleotide polymorphisms (SNPs) relacionados con varices identificados en GWAs realizados en estudios previos. Se muestran los efectos biológicos de los genes localizados en las proximidades de los SNPs. "1 - 23andMe" results (119)/2 - Ellinghaus et al (133)/3 - Fukaya (120)

SNP	Gen	Cromosoma	Acción	Estudios
rs11121615	<i>CASZ1</i>	1	Desarrollo vasos venosos. Angiogénesis. Control tensión arterial	1,3
rs6712038	<i>PPP3R1</i>	2	Proinflamatorio. Expresa calcineurina, efecto angiogénesis	1,3
rs507666	<i>ABO</i>	9	Grupo sanguíneo	1,3
rs7111978	<i>ADM</i>	11	Regulador de la tensión arterial. Angiogénesis.	1
rs6062618	<i>SOX18</i>	20	Desarrollo de vasos sanguíneos y linfáticos	1,3
rs6905288	<i>VEGFA</i>	6	Angiogénesis, remodelamiento vascular, pro-inflamatorio	1
rs111434909	<i>ANGPT1</i>	8	Angiogénesis. Desarrollo de vasos venosos y linfáticos	1
rs966562	<i>ANGPT2</i>	8	Angiogénesis. Desarrollo de vasos venosos y linfáticos	1
rs4463578	<i>F9</i>	10	Factor de la coagulación IX	1
rs17278665	<i>EFEMP1</i>	2	Antagonista de la angiogénesis	2
rs79607156	<i>THEG5</i>	19	Expresión únicamente testicular	1
rs2030136	<i>SKAP2</i>	7	Regulación y vía de señalización de la respuesta inmune	2
rs727139	<i>KCNH8</i>	23	Regulador de los canales de potasio. Regula contracción muscular, secreción insulina, volumen celular,...	2
Rs2911461	<i>PIEZO1</i>	16	Canales iónicos activados mecánicamente	3
Rs8053350	<i>GALNS</i>	16	Relacionado con la displasia ósea.	3
rs7773004	<i>HFE</i>	6	Gen de la hemocromatosis. Relacionado con tromboembolismos venosos y úlceras venosas	3

En cualquier caso, todos estos hallazgos genéticos explican una parte muy pequeña de la alta heredabilidad identificada en la EVC. Esta observación no es exclusiva de la EVC, sino que es generalizada en la identificación de la base genéticas de las enfermedades complejas. Tal como exponen Manolio et al (75), existen fenotipos con una alta heredabilidad donde los loci identificados sólo explican un pequeño porcentaje de la heredabilidad del rasgo bajo estudio. Por ejemplo, la altura tiene una heredabilidad del 80%, y se han identificado 40 *loci* relacionados donde solo explican el 5% de la varianza fenotípica. Se han postulado varias explicaciones para justificar



esta “heredabilidad perdida” (75) Por ejemplo, la existencia de una mayor cantidad de variantes de pequeños efectos sumatorios, la presencia de variantes raras difíciles de identificar y que presenten un gran efecto sobre el fenotipo en cuestión, dificultad para detectar interacciones gen-gen o el efecto del ambiente en la expresión genética en momentos puntuales.

Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio sobre la identificación de las bases genéticas de la enfermedad tromboembólica venosa, estamos convencidos que sólo integrando otras capas de información biológica, como la transcriptómica (expresión de nuestros genes) y la epigenómica (regulación de la expresión de nuestros genes) podremos avanzar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la progresión de EVC y, de este modo, mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la EVC. Concretamente en nuestro estudio, cuyo resultados genómicos son la base del presente trabajo, ya disponemos de datos transcriptómicos y epigenómicos en los 935 sujetos, pertenecientes a las 21 familias extensas analizadas, que constituirán un abordaje ómico único en el ámbito de la EVC de cara a futuros trabajos.

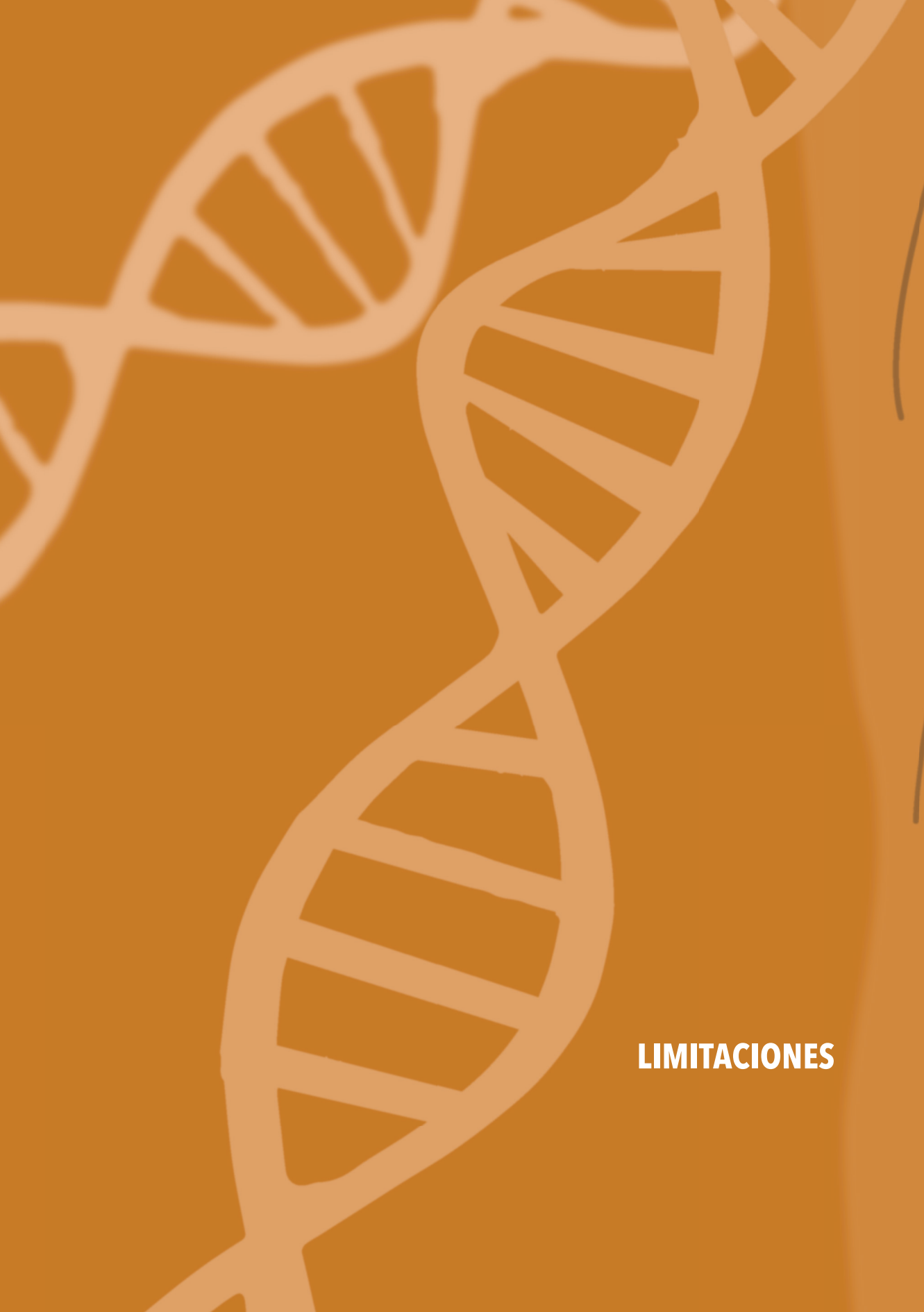




CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- La Enfermedad Venosa Crónica presenta una importante base genética, con una heredabilidad del 78%, por lo que podemos concluir que el principal factor de riesgo para presentar enfermedad venosa crónica es de origen genético.
- En el estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) se han analizado un total de 10.333.120 de SNPs, donde mostraron una significación estadística con una $p=10^{-7}$ los SNPs rs1447844, rs775779, rs775778, rs71733839, rs199822133, rs775764, rs80275869, rs73659662, rs200242468, rs62576159, rs78211157, rs201313070, rs57095228, rs56029363, rs80203234 y el rs187659990.
- Existe una correlación genética muy significativa entre la Enfermedad Venosa Crónica y la Enfermedad Tromboembólica Venosa, con una $\rho = 0.80$, con una $p = 0.0069$.
- Los fenotipos de la hemostasia relacionados con la enfermedad venosa crónica son la antitrombina III (ATf) y la vitamina B12.
- En el presente estudio, 6 de los SNPs relacionados con la hemostasia estudiados han presentado relación estadísticamente significativa con la enfermedad venosa crónica, y son: rs5985, rs2036914, rs657152, rs11925694, rs7901695 y el rs10965243. Siendo el más importante el grupo sanguíneo ABO, confirmando la relación genética entre enfermedad venosa crónica y enfermedad tromboembólica venosa.



LIMITACIONES

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PERSPECTIVAS

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Comentar que existen limitaciones en nuestro estudio. A pesar de ser el único trabajo realizado con familias extensas, este tipo de muestra limita la generalización de los resultados a la poblacional general, donde sería necesario un diseño de caso/control.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

- Los hallazgos detectados en el presente estudio ofrecen nuevas vías de investigación para mejorar el diagnóstico y futuras acciones terapéuticas en la Enfermedad Vascul ar Crónica.
- La integración de otras capas de información biológica en futuros estudios, como la transcriptómica (expresión de nuestros genes) y la epigenómica (regulación de la expresión de nuestros genes), haran avanzar en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que conducen a la progresión de EVC y su relación con la ETV, de este modo, podrá mejorar el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la EVC y, consecuentemente, la calidad de vida y supervivencia de estos pacientes.





BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Griffiths AJF. Introduction to genetic analysis. 10th ed. New York: W.H. Freeman and Co.; 2012. xxiii, 832 p. p.
2. INSTITUTE NNHGR. EPIGENÓMICA 2015 [Available from: <https://www.genome.gov/27562615/epigenmica/>].
3. Willyard C. New human gene tally reignites debate. *Nature*. 2018;558(7710):354-5.
4. INSTITUTE NNHR. TRANSCRIPTOMA 2015 [TRANSCRIPTOMA]. Available from: <https://www.genome.gov/27562853/transcriptoma/>.
5. GEZA MOZES PG. Venous Embriology and Anatomy. In: Bergan JJ, editor. The vein book. First ed. USA: ELSERVIER; 2007. p. 15-26.
6. Lozano F. Introducción a la patología venosa. In: Francisco L, editor. Cuadernos de patología vascular. 1. 1ª edición ed. Castellon. Spain: Aran ediciones S.L; 2005. p. 163-89.
7. Roeke T, Hovsibian S, Schlejen PM, Dinant S, Koster T, Waasdorp EJ. A mycotic aneurysm of the abdominal aorta caused by Mycobacterium bovis after intravesical instillation with bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Vascular Surgery Cases and Innovative Techniques*. 2018;4(2):122-5.
8. Eklof B, Perrin M, Delis KT, Rutherford RB, Gloviczki P, American Venous F, et al. Updated terminology of chronic venous disorders: the VEIN-TERM transatlantic interdisciplinary consensus document. *Journal of vascular surgery*. 2009;49(2):498-501.
9. Gloviczki P, Comerota AJ, Dalsing MC, Eklof BG, Gillespie DL, Gloviczki ML, et al. The care of patients with varicose veins and associated chronic venous diseases: clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery and the American Venous Forum. *Journal of vascular surgery*. 2011;53(5 Suppl):2S-48S.
10. Porter JM, Moneta GL. Reporting standards in venous disease: an update. International Consensus Committee on Chronic Venous Disease. *Journal of vascular surgery*. 1995;21(4):635-45.
11. Allegra C, Antignani PL, Bergan JJ, Carpentier PH, Coleridge-Smith P, Cornu-Thenard A, et al. The "C" of CEAP: suggested definitions and refinements: an International Union of Phlebology conference of experts. *Journal of vascular surgery*. 2003;37(1):129-31.
12. Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *Journal of vascular surgery*. 2004;40(6):1248-52.
13. Moneta GL. Regarding "The 'C' of CEAP: suggested definitions and refinements: an International Union of Phlebology conference of experts". *Journal of vascular surgery*. 2003;37(1):224-5.
14. Uhl JF C-TA, Carpentier PH, Schadeck M, Parpex P, Chleir F. Reproducibility of the "C" classes of the CEAP classification. *Journal of Phlebology*. 2001;1:39-48.
15. Marinello J. GR. PATOLOGÍA VENOSA. Guía de diagnóstico y tratamiento del Capítulo Español de Flebología. 1ª Edición ed. Madrid. Spain.: Luzan 5, S.A Ediciones; 2003 2003. 31-42 p.



16. Mark D. Iafrati and Thomas F. O'Donnell J. Varicose Veins: Surgical Treatment. In: Jack L. Cronenwett KWJ, editor. Rutherford's Vascular Surgery. I. 7th ed. Philadelphia. USA: Saunders Elsevier; 2010. p. 855.
17. Kucukguven A, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. *Current drug targets*. 2013;14(3):287-324.
18. Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J Vasc Res*. 2012;49(6):463-78.
19. Marianne G De Maeseneer SKK, Thomas Aherne, Niels Baekgaard, Stephen Black, Lena Blomgren, Athanasios Giannoukas, Manjit Gohel, Rick de Graaf, Claudine Hamel-Desnos, Arkadiusz Jawien, Aleksandra Jaworucka-Kaczorowska, Christopher R Lattime, et al. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2022 Clinical Practice Guidelines on the Management of Chronic Venous Disease of the Lower Limbs. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2022 Jan 10;S1078-5884(21):00979-5.
20. Jimenez-Cossio. Estudio epidemiológico de varices en una población laboral de 512 individuos. Estudio Barcelona II. *Med Clin*. 1977;69:415-9.
21. Varela-irioja F. Estudio epidemiológico vascular. Análisis de 700 varones. Incidencia de las varices. *Angiología*. 1986;38:247-67.
22. Peñafiel R GV, Moreno F, González JF, Ros E. Estudio angiogeriatrico Granada 90. Primera parte. *Angiología*. 1991;5:191-6.
23. Lozano Sánchez F, Jiménez-Cossío J, Ulloa J. La insuficiencia venosa crónica en España. Estudio epidemiológico RELIEF. *Angiología*. 2001;53(1):5-16.
24. Gesto Castromil R, Detect-IVC. G. Encuesta epidemiológica realizada en España sobre la prevalencia asistencial de la IVC en atención primaria. *Angiología*. 2001;53:249-60.
25. Alvarez LL, F.; Marinello, J.; Masegosa, A. An epidemiological survey on chronic venous insufficiency in Spain: The DETECT-IVC 2006 study [Encuesta epidemiológica sobre la insuficiencia venosa crónica en España: Estudio DETECT-IVC 2006] *Angiología*. 2008;60(1):27-36.
26. Lozano F, Carrasco E, Díaz S, Escudero J, Marinello J, Sánchez I, et al. Determining factors of the severity of chronic venous insufficiency. C-VIVES study [Determinantes de la gravedad en la insuficiencia venosa crónica. Estudio C-VIVES]. *Angiología*. 2013;65(1):1-9.
27. Escudero J, Fernández Quesada F, Bellmunt Montoya S. Prevalence and clinical characteristics of chronic venous disease in patients seen in primary care in Spain: Results of the international study Vein Consult Program. *Cirugía Española*. 2014;92(8):539-46.
28. Marinello J. Insuficiencia Venosa Crónica. Concepto General. In: Esquembre VI, editor. Libro Blanco sobre Patología Venosa y Linfática. Madrid: EDIMSA, EDITORES MEDICOS, S.A; 2014. p. 35-9.
29. Murad MH, Coto-Yglesias F, Zumaeta-Garcia M, Elamin MB, Duggirala MK, Erwin PJ, et al. A systematic review and meta-analysis of the treatments of varicose veins. *Journal of vascular surgery*. 2011;53(5 Suppl):49S-65S.
30. Meissner MH, Gloviczki P, Bergan J, Kistner RL, Morrison N, Pannier F, et al. Primary chronic venous disorders. *Journal of vascular surgery*. 2007;46 Suppl S:54S-67S.

31. Levy E, Levy P. [Management of venous leg ulcer by French physicians, diversity and related costs: a prospective medicoeconomic observational study]. *J Mal Vasc*. 2001;26(1):39-44.
32. Simka M, Majewski E. The social and economic burden of venous leg ulcers: focus on the role of micronized purified flavonoid fraction adjuvant therapy. *Am J Clin Dermatol*. 2003;4(8):573-81.
33. Martinez MJ, Bonfill X, Moreno RM, Vargas E, Capella D. Phlebotonics for venous insufficiency. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(3):CD003229.
34. Kahn SR, Shapiro S, Wells PS, Rodger MA, Kovacs MJ, Anderson DR, et al. Compression stockings to prevent post-thrombotic syndrome: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014;383(9920):880-8.
35. Management of chronic venous disorders of the lower limbs - guidelines according to scientific evidence. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2014;33(2):87-208.
36. Brand FN, Dannenberg AL, Abbott RD, Kannel WB. The epidemiology of varicose veins: the Framingham Study. *Am J Prev Med*. 1988;4(2):96-101.
37. Lee AJ, Evans CJ, Allan PL, Ruckley CV, Fowkes FG. Lifestyle factors and the risk of varicose veins: Edinburgh Vein Study. *J Clin Epidemiol*. 2003;56(2):171-9.
38. Carpentier PH, Maricq HR, Biro C, Poncot-Makinen CO, Franco A. Prevalence, risk factors, and clinical patterns of chronic venous disorders of lower limbs: a population-based study in France. *Journal of vascular surgery*. 2004;40(4):650-9.
39. Kroeger K, Ose C, Rudofsky G, Roesener J, Hirche H. Risk factors for varicose veins. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2004;23(1):29-34.
40. Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PD, Nicolaidis AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic venous disease. *The New England journal of medicine*. 2006;355(5):488-98.
41. Cushman M, Callas PW, Denenberg JO, Bovill EG, Criqui MH. Risk factors for peripheral venous disease resemble those for venous thrombosis: the San Diego Population Study. *J Thromb Haemost*. 2010;8(8):1730-5.
42. Anwar MA, Georgiadis KA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH. A review of familial, genetic, and congenital aspects of primary varicose vein disease. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2012;5(4):460-6.
43. Criqui MH, Jamosmos M, Fronek A, Denenberg JO, Langer RD, Bergan J, et al. Chronic venous disease in an ethnically diverse population: the San Diego Population Study. *Am J Epidemiol*. 2003;158(5):448-56.
44. Fiebig A, Krusche P, Wolf A, Krawczak M, Timm B, Nikolaus S, et al. Heritability of chronic venous disease. *Human genetics*. 2010;127(6):669-74.
45. Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. *J Surg Res*. 2007;141(2):311-6.
46. Laurikka JO, Sisto T, Tarkka MR, Auvinen O, Hakama M. Risk indicators for varicose veins in forty- to sixty-year-olds in the Tampere varicose vein study. *World J Surg*. 2002;26(6):648-51.
47. Ahti TM, Makivaara LA, Luukkaala T, Hakama M, Laurikka JO. Effect of family history on the risk of varicose veins is affected by differential misclassification. *J Clin Epidemiol*. 2010;63(6):686-90.



48. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation*. 2003;107(23 Suppl 1):I22-30.
49. Carrasco Carrasco JPG, J; Díaz Sánchez, S. Prevención de la enfermedad tromboembólica venosa en pacientes ambulatorios con patología médica. *Semergen*. 2010;36(3):152-62.
50. Fernández Capitan M. Epidemiología de las enfermedades tromboembólicas: fibrilación auricular, enfermedad tromboembólica venosa y síndrome coronario agudo. *Med Clin (Barc)*. 2012;139:Suppl 4-9.
51. Sogaard KK, Schmidt M, Pedersen L, Horvath-Puho E, Sorensen HT. 30-year mortality after venous thromboembolism: a population-based cohort study. *Circulation*. 2014;130(10):829-36.
52. Meissner MH, Wakefield TW, Ascher E, Caprini JA, Comerota AJ, Eklof B, et al. Acute venous disease: venous thrombosis and venous trauma. *Journal of vascular surgery*. 2007;46 Suppl S:25S-53S.
53. Trujillo-Santos J, Herrera S, Page MA, Soto MJ, Raventos A, Sanchez R, et al. Predicting adverse outcome in outpatients with acute deep vein thrombosis. findings from the RIETE Registry. *Journal of vascular surgery*. 2006;44(4):789-93.
54. Ruppert A, Steinle T, Lees M. Economic burden of venous thromboembolism: a systematic review. *J Med Econ*. 2011;14(1):65-74.
55. Soria JM, Fontcuberta J. New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis. *Haematologica*. 2005;90(9):1212-22.
56. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martinez E, Mateo J, et al. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation*. 2000;101(13):1546-51.
57. Muller-Buhl U, Leutgeb R, Engeser P, Achankeng EN, Szecsenyi J, Laux G. Varicose veins are a risk factor for deep venous thrombosis in general practice patients. *VASA Zeitschrift fur Gefasskrankheiten*. 2012;41(5):360-5.
58. Stavros K, Kakkos MG, Niels Baekgaard, Rupert Bauersachs, Sergi Bellmunt-Montoya, Stephen A Black, Arina J Ten Cate-Hoek, Ismail Elalamy, Florian K Enzmann, George Geroulakos, Anders Gottsäter, Beverley J Hunt, Armando Mansilha, Andrew N Nicolaidis, ..., Melina Vega de Ceniga. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2021 Clinical Practice Guidelines on the Management of Venous Thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2021;61(1):9-82.
59. Gaber Y, Siemens HJ, Schmeller W. Resistance to activated protein C due to factor V Leiden mutation: high prevalence in patients with post-thrombotic leg ulcers. *Br J Dermatol*. 2001;144(3):546-8.
60. Hafner J, Kuhne A, Schar B, Bombeli T, Hauser M, Luthi R, et al. Factor V Leiden mutation in postthrombotic and non-postthrombotic venous ulcers. *Arch Dermatol*. 2001;137(5):599-603.
61. Emmerich J, Vossen CY, Callas PW, Demers C, Naud S, Long GL, et al. Chronic venous abnormalities in symptomatic and asymptomatic protein C deficiency. *J Thromb Haemost*. 2005;3(7):1428-31.
62. M. S-J. Síndrome posttrombótico. Panorama actual y revisión de la literatura. *Revista Mexicana de Angiología*. 2010;38(3):6.
63. Darvall KA, Sam RC, Adam DJ, Silverman SH, Fegan CD, Bradbury AW. Higher prevalence of thrombophilia in patients with varicose veins and venous ulcers than controls. *Journal of vascular surgery*. 2009;49(5):1235-41.



64. Munkvad S, Jorgensen M. Resistance to activated protein C: a common anticoagulant deficiency in patients with venous leg ulceration. *Br J Dermatol*. 1996;134(2):296-8.
65. Wiszniewski A, Bykowska K, Bilski R, Jaskowiak W, Proniewski J. Prevalence rate for inherited thrombophilia in patients with chronic and recurrent venous leg ulceration. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2011;19(5):552-8.
66. Leu H. Heredity of varicose disease. *Rev Medecine* 1966;9:467-71.
67. Merlen JF, Coget J, Larere J. [Heredity of varices]. *Phlebologie*. 1967;20(3):213-6.
68. Pistorius MA. Chronic venous insufficiency: the genetic influence. *Angiology*. 2003;54 Suppl 1:S5-12.
69. Malhotra SL. An epidemiological study of varicose veins in Indian railroad workers from the South and North of India, with special reference to the causation and prevention of varicose veins. *Int J Epidemiol*. 1972;1(2):177-83.
70. Ahti TM, Makivaara LA, Luukkaala T, Hakama M, Laurikka JO. Effect of family history on the incidence of varicose veins: a population-based follow-up study in Finland. *Angiology*. 2009;60(4):487-91.
71. Niermann H. *Zwillingsdermatologie*. Berlin: Springer-Verlag; 1964.
72. Cornu-Thenard A, Boivin P, Baud JM, De Vincenzi I, Carpentier PH. Importance of the familial factor in varicose disease. Clinical study of 134 families. *J Dermatol Surg Oncol*. 1994;20(5):318-26.
73. Souto JC. Search for new thrombosis-related genes through intermediate phenotypes. Genetic and household effects. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32(5-6):338-40.
74. Souto JC, Almasy 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.
75. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009;461(7265):747-53.
76. Ott J, Kamatani Y, Lathrop M. Family-based designs for genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2011;12(7):465-74.
77. Morange PE, Suchon P, Tregouet DA. Genetics of Venous Thrombosis: update in 2015. *Thromb Haemost*. 2015;114(5):910-9.
78. Curtius F. Untersuchungen über das menschliche Venensystem. *Deutsches Arch Klin Med*. 1928;162:194.
79. Wesener G. Varices, an hereditary disease. *Rev Medecine*. 1966;9:485-97.
80. Troisier J, Le Bayon H. Genetic study of varices. *Ann Med* 1937;41:30-41.
81. Florian J. Varicose disease, a clinical hereditary entity. *Rev Medecine*. 1966;9:518.
82. Salleras V. Heredity and varicose disease. *Rev Medecine*. 1966;9:463-64.
83. Guo Q, Guo C. [Genetic analysis of varicose vein of lower extremities]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 1998;15(4):221-3.
84. Hauge M Fau - Gundersen J, Gundersen J. Genetics of varicose veins of the lower extremities. (0001-5652 (Print)).
85. Lee S, Lee W, Choe Y, Kim D, Na G, Im S, et al. Gene expression profiles in varicose veins using complementary DNA microarray. *Dermatol Surg*. 2005;31(4):391-5.



86. Jin Y, Xu G, Huang J, Zhou D, Huang X, Shen L. Analysis of the association between an insertion/deletion polymorphism within the 3' untranslated region of COL1A2 and chronic venous insufficiency. *Annals of vascular surgery*. 2013;27(7):959-63.
87. Mellor RH, Brice G, Stanton AW, French J, Smith A, Jeffery S, et al. Mutations in FOXC2 are strongly associated with primary valve failure in veins of the lower limb. *Circulation*. 2007;115(14):1912-20.
88. Ng MY, Andrew T, Spector TD, Jeffery S, Lymphoedema C. Linkage to the FOXC2 region of chromosome 16 for varicose veins in otherwise healthy, unselected sibling pairs. *Journal of medical genetics*. 2005;42(3):235-9.
89. Florez A, De Haro J, Bleda S, Varela C, Esparza L, Acin F. Analysis of vascular endothelial growth factor gene expression in the tissues of patients with chronic venous insufficiency. *Phlebology*. 2013;28(1):32-7.
90. Gormus U, Kahraman OT, Isbir S, Tekeli A, Isbir T. MMP2 gene polymorphisms and MMP2 mRNA levels in patients with superficial varices of lower extremities. *In Vivo*. 2011;25(3):387-91.
91. Pascarella L, Schmid-Schonbein GW, Bergan J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. *Journal of vascular surgery*. 2005;41(2):303-11.
92. Le Flem L, Mennen L, Aubry ML, Aiach M, Scarabin PY, Emmerich J, et al. Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis, and varicose veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(3):445-51.
93. Serra R, Buffone G, de Franciscis A, Mastrangelo D, Molinari V, Montemurro R, et al. A genetic study of chronic venous insufficiency. *Annals of vascular surgery*. 2012;26(5):636-42.
94. Martin-Fernandez L, Ziyatdinov A, Carrasco M, Millon JA, Martinez-Perez A, Vilalta N, et al. Genetic Determinants of Thrombin Generation and Their Relation to Venous Thrombosis: Results from the GAIT-2 Project. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146922.
95. Delaneau O, Cox AJ, Zagury JF, Marchini J. Haplotype estimation using sequencing reads. *Am J Hum Genet*. 2013;93(4):687-96.
96. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2009;5(6):e1000529.
97. 3.3.1 TRCTV. A Language and Environment for Statistical Computing. 2016.
98. Almasy L, Blangero J. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet*. 1998;62(5):1198-211.
99. Ziyatdinov A, Brunel H, Martinez-Perez A, Buil A, Perera A, Soria JM. solaris: an R interface to SOLAR for variance component analysis in pedigrees. *Bioinformatics*. 2016;32(12):1901-2.
100. Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95.
101. Comuzzie AG, Blangero J, Mahaney MC, Sharp RM, VandeBerg JL, Stern MP, et al. Triiodothyronine exerts a major pleiotropic effect on reverse cholesterol transport phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(2):289-93.



102. Mannila MN, Eriksson P, Leander K, Wiman B, de Faire U, Hamsten A, et al. The association between fibrinogen haplotypes and myocardial infarction in men is partly mediated through pleiotropic effects on the serum IL-6 concentration. *J Intern Med.* 2007;261(2):138-47.
103. Xian Cheng, et al.. The same chromosome 9p21.3 locus is associated with type 2 diabetes and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Diabetes.* 2011 Feb;60(2):680-4.
104. NCBI. IGF2BP2 insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2 [Homo sapiens (human)] . Gene ID: 10644, updated on 4-Nov-2018. 2018.
105. ncbi. TCF7L2 transcription factor 7 like 2 [Homo sapiens (human)] 2018 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rs7901695>].
106. NCBI. F11 coagulation factor XI [Homo sapiens (human)] 2018 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rs2036914>].
107. Kohno K, Niihara H, Li X, Hamano T, Nabika T, Shiwaku K, et al. Familial Transmission of Hospital-Treated Varicose Veins in Adoptees: A Swedish Family Study. *J Am Coll Surg.* 2016;223(3):452-60.
108. Eri Fukaya AF, Daniel Lindholm, Stefan Gustafsson, Daneila Zanetti. Clinical and Genetic Determinants of Varicose Veins. . *Circulation.* 2018;138(xx):xx.
109. Madar G, Widmer LK, Zemp E, Maggs M. Varicose veins and chronic venous insufficiency disorder or disease? A critical epidemiological review. *VASA Zeitschrift fur Gefasskrankheiten.* 1986;15(2):126-34.
110. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ, 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Archives of internal medicine.* 2000;160(6):809-15.
111. Chang SL, Huang YL, Lee MC, Hu S, Hsiao YC, Chang SW, et al. Association of Varicose Veins With Incident Venous Thromboembolism and Peripheral Artery Disease. *JAMA.* 2018;319(8):807-17.
112. Zoller B, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Venous thromboembolism and varicose veins share familial susceptibility: a nationwide family study in Sweden. *Journal of the American Heart Association.* 2014;3(4).
113. Wassel CL, Rasmussen-Torvik LJ, Callas PW, Denenberg JO, Durda JP, Reiner AP, et al. A genetic risk score comprising known venous thromboembolism loci is associated with chronic venous disease in a multi-ethnic cohort. *Thromb Res.* 2015.
114. Romero JM, Bover J, Fite J, Bellmunt S, Dilme JF, Camacho M, et al. The Modification of Diet in Renal Disease 4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease. *Journal of vascular surgery.* 2012;56(5):1324-30.
115. Langan RC, Goodbred AJ. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *Am Fam Physician.* 2017;96(6):384-9.
116. Selcuk Kapisiz N, Uzun Kulaoglu T, Fen T, Kapisiz HF. Potential risk factors for varicose veins with superficial venous reflux. *Int J Vasc Med.* 2014;2014:531689.
117. Zamboni P, Gemmati D. Clinical implications of gene polymorphisms in venous leg ulcer: a model in tissue injury and reparative process. *Thromb Haemost.* 2007;98(1):131-7.

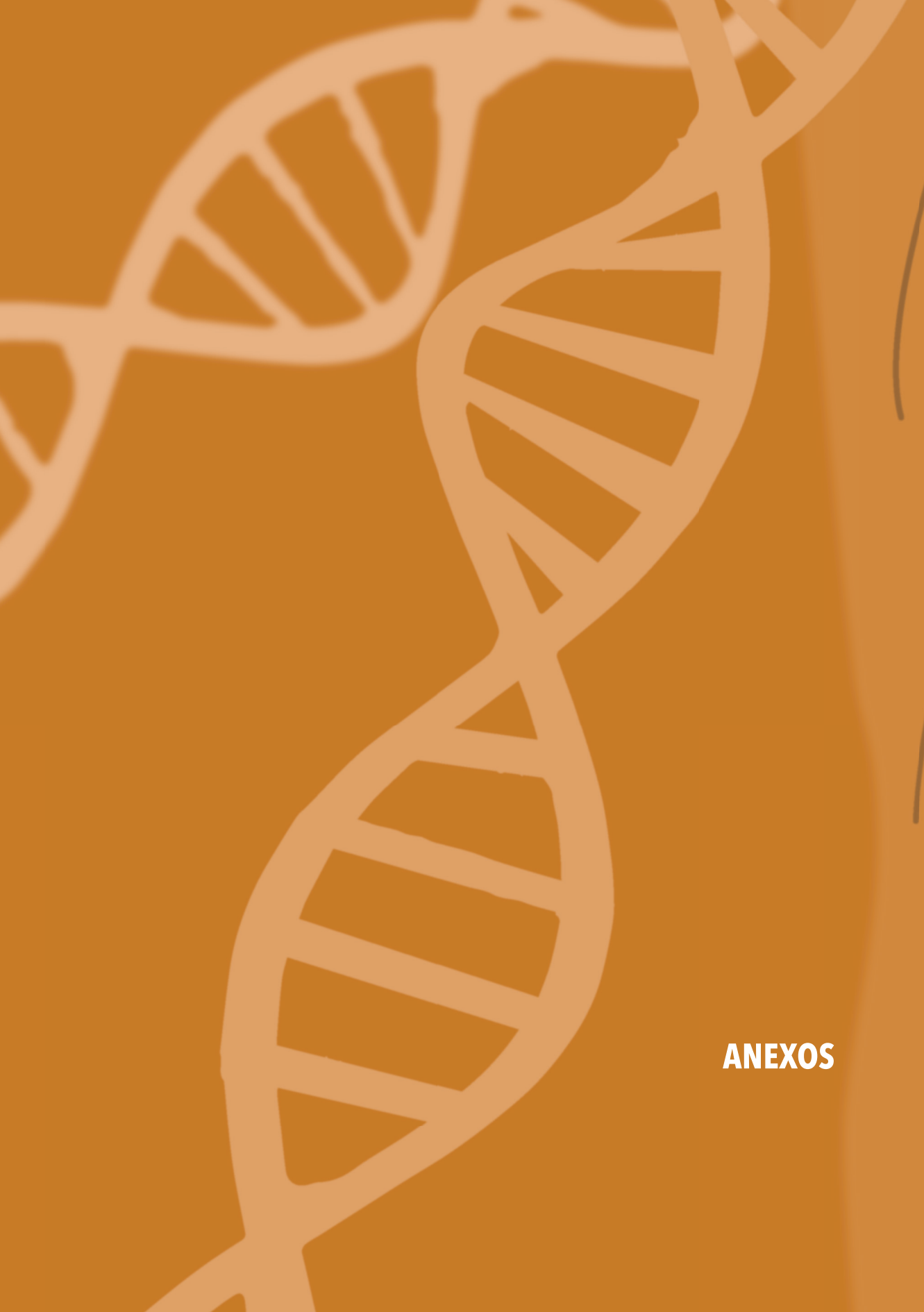


118. Shadrina A, Tsepilov Y, Smetanina M, Voronina E, Seliverstov E, Ilyukhin E, et al. Polymorphisms of genes involved in inflammation and blood vessel development influence the risk of varicose veins. *Clin Genet*. 2018;94(2):191-9.
119. Bell RK DE, McLean CY, Eriksson N, Tung JY, Hinds D. A large scale genome wide association study of varicose veins in the 23andMe cohort. In: The 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Diego, CA, 18–22 October, 2014. Paper no. 2082M, p. 487. 2014 [Available from: <https://blog.23andme.com/23andme-research/23andmes-research-at-ashg-2014/>].
120. Eri Fukaya AMF, Daniel Lindholm, Stefan Gustafsson. Clinical and Genetic Determinants of Varicose Veins Prospective, Community-Based Study of ~500 000 Individuals. *Circulation*. 2018;138:xx.
121. de Haan HG, van Hylckama Vlieg A, Lotta LA, Gorski MM, Bucciarelli P, Martinelli I, et al. Targeted sequencing to identify novel genetic risk factors for deep vein thrombosis: a study of 734 genes. *J Thromb Haemost*. 2018;16(12):2432-41.
122. Hinds DA, Buil A, Ziemek D, Martinez-Perez A, Malik R, Folkersen L, et al. Genome-wide association analysis of self-reported events in 6135 individuals and 252 827 controls identifies 8 loci associated with thrombosis. *Hum Mol Genet*. 2016;25(9):1867-74.
123. NCBI. ROBO2 roundabout guidance receptor 2 [Homo sapiens (human)] 2018 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6092>].
124. Mommersteeg MT, Andrews WD, Ypsilanti AR, Zelina P, Yeh ML, Norden J, et al. Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium. *Circ Res*. 2013;112(3):465-75.
125. Choi YJ, Yoo NJ, Lee SH. Down-regulation of ROBO2 expression in prostate cancers. *Pathol Oncol Res*. 2014;20(3):517-9.
126. Je EM, Gwak M, Oh H, Choi MR, Choi YJ, Lee SH, et al. Frameshift mutations of axon guidance genes ROBO1 and ROBO2 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *Pathology*. 2013;45(7):645-50.
127. Tong ZB, Bondy CA, Zhou J, Nelson LM. A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Hum Reprod*. 2002;17(4):903-11.
128. Sadovnick AD, Traboulsee AL, Zhao Y, Bernales CQ, Encarnacion M, Ross JP, et al. Genetic modifiers of multiple sclerosis progression, severity and onset. *Clin Immunol*. 2017;180:100-5.
129. Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL, Turner CL, Kivuva E, Maher ER, et al. Mutations in NLRP5 are associated with reproductive wastage and multilocus imprinting disorders in humans. *Nat Commun*. 2015;6:8086.
130. NCBI. CYLC2 cylicin 2 [Homo sapiens (human)] 2010 [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1539>].
131. NCBI. ZNF804 zinc finger protein 804A [Homo sapiens (human)] 2018 [Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(znf804a%5Bgene%5D\) AND \(Homo sapiens%5Borgn%5D\) AND alive%5Bprop%5D NOT newentry%5Bgene%5D&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(znf804a%5Bgene%5D) AND (Homo sapiens%5Borgn%5D) AND alive%5Bprop%5D NOT newentry%5Bgene%5D&sort=weight)].
132. Almlöf JC, Alexsson A, Imgenberg-Kreuz J, Sylwan L, Backlin C, Leonard D, et al. Novel risk genes for systemic lupus erythematosus predicted by random forest classification. *Sci Rep*. 2017;7(1):6236.



133. Ellinghaus E, Ellinghaus D, Krusche P, Greiner A, Schreiber C, Nikolaus S, et al. Genome-wide association analysis for chronic venous disease identifies EFEMP1 and KCNH8 as susceptibility loci. *Sci Rep.* 2017;7:45652.





ANEXOS

PROTOCOLO GAIT 2

(GENETIC ANALYSIS OF IDIOPATHIC THROMBOPHILIA)

ANALISIS GENETICO DE LA TROMBOFILIA IDIOPATICA

ESTUDIO DE LAS BASES GENETICAS DE LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA

Juan Carlos Souto
Nuria Pujol
Montserrat Borrell
Mireia Constans
Alfonso Buil
Ramón Souto
Jordi Fontcuberta
José Manuel Soria

UNITAT D'HEMOSTASIA I TROMBOSI
HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
BARCELONA

Febrero 2006



ÍNDICE

ANTECEDENTES	147
OBJETIVOS DEL PROYECTO GAIT 2	148
DEFINICION DE TROMBOFILIA IDIOPATICA	149
METODOLOGIA DEL PROYECTO GAIT 2	150
1. CRITERIOS DE INCLUSION.....	150
2. TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	150
3. CONSENTIMIENTO INFORMADO Y FIRMADO.....	150
5. ARBOL FAMILIAR.....	151
6. REGISTRO DE COMPOSICION DE DOMICILIOS Y DIETAS COMPARTIDAS.....	152
7. DATOS CLINICOS.....	152
7.1 ACTUALIZACIÓN DE EVENTOS.....	158
8. PROTECCION DE LOS DATOS Y LAS MUESTRAS.....	159
9. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS, RECOGIDA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO.....	159
9.1 Destino inicial de las muestras.....	161
9.2 Tipo, cantidad y volumen de alicuotas para congelación.....	162
9.3 Etiquetado de alicuotas y muestras biológicas.....	163
10. DETERMINACIONES DE FENOTIPOS.....	164
10.1 Parámetros de la hemostasia.....	164
10.2 Fenotipos relacionados con homocisteina y bioquímica básica.....	166
10.3 Fenotipos relacionados con la inflamación.....	166
10.4 Antígenos de membrana mediante citometría de flujo.....	167
10.5 Fenotipos del hemograma de rutina.....	168
11. ANALISIS GENETICOS: ADN Y ARN.....	169
VERIFICACION DE LA RUTINA DEL PROTOCOLO GAIT 2	171
COMISION DE SEGUIMIENTO DEL PROYECTO	173



ANEXO 1: PUBLICACIONES DEL PROYECTO GAIT 1	175
ANEXO 2: ARGUMENTOS PARA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	179
ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	183
ANEXO 4: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS.....	185
ANEXO 5: HOJA DE RECOGIDA.....	189
ANEXO 6: CUESTIONARIO PARA IDENTIFICAR EPISODIOS DE TROMBOSIS VENOSA PREVIA.....	191
ANEXO 7: CRITERIOS PARA IDENTIFICAR EPISODIOS DE IAM, AVC, AIT Y TROMBOSIS ARTERIAL PERIFÉRICA.....	193
ANEXO 8: CUESTIONARIO DE ACTUALIZACIÓN DE EVENTOS.....	195
ANEXO 9: CIRCUNSTANCIAS ASOCIADAS A LA EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA.....	197
ANEXO 10: CONSEJOS PARA EL DÍA DEL ESTUDIO GAIT-2.....	199
ANEXO 12: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA.....	203
ANEXO 13: FASES DEL RECLUTAMIENTO DE FAMILIAS.....	205

ANTECEDENTES

La enfermedad tromboembólica en sentido amplio (arterial o venosa) afecta a más de un 10% de la población en algún momento de la vida. Se trata, por tanto, de una enfermedad con gran prevalencia. Desde un punto de vista puramente clínico, se considera como un rasgo complejo por la frecuente observación de casos familiares (base genética) y la también muy frecuente asociación con factores ambientales: por ejemplo tabaco, dieta, estrés (en la enfermedad coronaria) y anticonceptivos, embarazo o cirugía intercurrente (en la trombosis venosa). En las últimas décadas se han descubierto varias anomalías genéticas simples que se asocian con una mayor predisposición a la trombosis venosa, pero que no explican por sí solas la mayoría de casos de trombosis. En cuanto a la trombosis arterial (infarto de miocardio como paradigma) se conocen muy bien varios factores ambientales, pero apenas se han descrito anomalías genéticas asociadas. No existen estudios adecuados que permitan conocer los factores de riesgo genético subyacentes, en la población general, ni en los casos de trombosis venosa ni de infarto de miocardio o enfermedad vascular cerebral.

Se define a la trombofilia como una predisposición acusada a padecer enfermedad tromboembólica. Clínicamente, esta tendencia se refleja en una o varias de las siguientes características:

- Tromboembolismo en edad joven (<45 años)
- Tromboembolismo de repetición en un mismo individuo
- Observación de varios casos de tromboembolismo en una misma familia
- Trombosis en localizaciones atípicas (por ej. mesentérica, renal o senos venosos cerebrales)

La investigación de la trombofilia en España

Nuestra Unidad, pionera en España del estudio de la enfermedad tromboembólica, inició en 1989 un estudio multicéntrico sobre las causas biológicas de trombosis venosa en población española, (EMET). En este estudio se identificaron deficiencias en inhibidores de la coagulación (Antitrombina, Proteína C o Proteína S), o la mutación FVL en sólo el 32% de los casos de trombosis. La posterior identificación en el 18% de estas familias de la mutación 20210 en el gen de la protrombina, amplía el número de familias con un factor genético de riesgo trombótico conocido hasta cerca del 50%, lo que coincide con los datos obtenidos en otras poblaciones, aunque las prevalencias varían según los criterios de selección de la población estudiada. Estas observaciones indican la existencia de otros genes aún no identificados que, por sí solos o, muy probablemente asociados a otros factores de riesgo, están implicados en enfermedad tromboembólica.

Para abordar la identificación de estos factores genéticos de riesgo trombótico desconocidos (trombofilia idiopática), nuestra Unidad inició en Enero de 1995 el proyecto GAIT 1 (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia), con la colaboración

del Departamento de Genética de la Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, Texas).

El objetivo último del proyecto GAIT 1 ha sido la localización y caracterización de genes desconocidos que determinan el riesgo de trombosis en la población. Como objetivo intermedio, se pretendió un estudio sistemático de las bases genéticas de los componentes fisiológicos de la hemostasia.

Con los resultados actuales (ver lista de publicaciones: ANEXO 1), el proyecto GAIT 1 ha demostrado la enorme eficacia de los métodos utilizados para el progreso científico en el campo de la Hemostasia en general y de la trombofilia en particular. La gran cantidad de fenotipos analizados, gracias a la inclusión de familias entre 1995 y 1997, ha establecido las bases para la búsqueda de los genes subyacentes. Sin embargo, esa misma gran cantidad de análisis ha terminado por agotar las muestras de plasma disponibles, sin haberse explorado todavía la totalidad de fenotipos conocidos de la Hemostasia. Es necesario, pues, realizar nuevos muestreos para continuar la descripción genética exhaustiva de este sistema. También se precisa el estudio de otros sistemas fisiológicos estrechamente relacionados con la Hemostasia y probablemente con las enfermedades tromboticas y cardiovasculares. Nos referimos a los mecanismos de interacciones celulares entre plaquetas, leucocitos, endotelio y subendotelio, a los mecanismos de la inflamación y al metabolismo del hierro, por ejemplo.

En consecuencia, nos proponemos la inclusión de nuevas familias con los mismos criterios de selección de trombofilia idiopática, que constituirán el proyecto **GAIT 2**.

OBJETIVOS DEL PROYECTO GAIT 2

1. Describir la base genética de nuevos fenotipos no analizados en el GAIT 1.
2. Confirmar los hallazgos del GAIT 1 en aquellos fenotipos directamente involucrados en el riesgo de trombosis.
3. Replicar los resultados genéticos de ligamiento obtenidos en GAIT 1.
4. Ampliar la potencia estadística (al aumentar el tamaño de la muestra) para detectar efectos genéticos más débiles, que no hayan conseguido significación estadística en el GAIT 1, pero que sean realmente sugestivos de verdaderos positivos.
5. Iniciar el estudio de otros componentes sanguíneos candidatos a intervenir en la fisiopatología de la trombosis: leucocitos, hematíes, plaquetas, mediadores inflamatorios, marcadores de estrés oxidativo, metabolismo del hierro.
6. Ampliar el estudio del metabolismo de la homocisteína y su relación con la enfermedad tromboembólica y la osteoporosis.
7. Investigar la posible relación entre fenotipos de la hemostasia y la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico.
8. Estudio de la variabilidad genética en la expresión de ARN de los genes relacionados con trombosis y la inflamación.

9. Investigación de la posible relación entre el ADN mitocondrial y los fenotipos incluidos.
10. Obtención de muestras biológicas de plasma y ADN en familias grandes, para el proyecto europeo EUROCLOT.
11. Obtención de muestras biológicas de plasma y ADN en familias grandes, para el proyecto europeo PROCARDIS.
12. Desarrollo de la Bioinformática, la Estadística Genética y la Genómica en el ámbito de la trombofilia.

DEFINICION DE TROMBOFILIA IDIOPATICA

A efectos del proyecto GAIT 2 se considerará trombofilia idiopática o inexplicada siguiendo los mismos criterios establecidos en 1995 en el proyecto GAIT 1, es decir sin contemplar las alteraciones asociadas a trombosis que se han descrito en los años posteriores a 1995 (mutación PT 20210 A, mutación FXII C46T, hiperhomocisteinemia moderada, aumento de los niveles de factor VIII).

Un individuo presenta **trombofilia venosa idiopática** si:

- 1º Manifiesta alguna de las siguientes características clínicas:
 - Trombosis venosa en edad joven (<45 años).
 - Tromboembolismo venoso de repetición.
 - Antecedentes familiares de tromboembolismo
 - Trombosis en localizaciones atípicas (mesentérica, renal, hepato-espleno-portal, senos venosos cerebrales, vena cava).

- 2º El estudio biológico de trombosis resulta normal para los siguientes parámetros:
 - Antitrombina
 - Fibrinógeno
 - Proteína C
 - Proteína S
 - Resistencia a la proteína C activada (RPCa) y factor V Leiden
 - Anticuerpos antifosfolípido y anticoagulante lúpico.

Se considera episodio tromboembólico espontáneo al que no se asocia a ninguna de las situaciones de riesgo ambiental siguientes:

- Cirugía o inmovilización (en los últimos 3 meses antes del episodio)
- Fracturas óseas (idem)
- Hospitalización (idem)
- Gestación, parto y puerperio (idem)
- Neoplasia activa
- Situaciones de trombofilia secundaria a otras patologías: enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Beçhet, HPN, síndromes mieloproliferativos, etc.

METODOLOGIA DEL PROYECTO GAIT 2

1. CRITERIOS DE INCLUSION

Se reclutarán familias de propositus con trombofilia idiopática, siempre que su estructura y tamaño cumplan los requisitos de familias extensas (*extended pedigrees*):

- Un mínimo de 10 individuos disponibles, incluyendo al propositus y a los parientes políticos
- Un mínimo de 3 generaciones, o bien 2 generaciones si alguna de ellas tiene 8 o más hermanos.

Al menos uno de los episodios de trombosis del propositus debe haber sido espontáneo.

Nota: a diferencia del GAIT 1 no se contempla la inclusión de familias “control”, aleatoriamente extraídas de la población general. En el ANEXO 12, se recogen las fases para contactar, proponer y organizar el reclutamiento de las familias seleccionadas.

2. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El número total de individuos será como mínimo de 1000.

No se define a priori un límite superior para cerrar la inclusión de familias. La potencia estadística para detectar efectos genéticos aumenta (aunque no de forma lineal) con el número de individuos incluidos. Las limitaciones finales del tamaño se establecerán por criterios presupuestarios y temporales.

Cada individuo incluido en este protocolo recibirá una cantidad testimonial de 60€ en concepto de compensación por las molestias que su desplazamiento al Hospital le pueda haber causado.

3. CONSENTIMIENTO INFORMADO Y FIRMADO

A todos los individuos incluidos (en caso de los menores de edad, a sus padres o representantes legales) se les informará de modo comprensible de los objetivos del estudio y de la importancia de su colaboración. También se les ofrecerá un documento explicativo llamado “El Proyecto GAIT 2. Argumentos para otorgar el consentimiento informado”, que se encuentra en el ANEXO 2. Antes de la obtención de datos clínicos y de la extracción de muestras biológicas se les requerirá la firma del documento de consentimiento que se adjunta en el ANEXO 3.

4. IDENTIFICACION INDIVIDUAL

(Ver ANEXO 4: Hoja individual de recogida de datos clínicos)

Cada individuo recibirá un **código único** (5 dígitos) compuesto por

- Un número de 2 dígitos arábigos que corresponderá al número único de cada familia. Para evitar errores con las familias del proyecto previo, GAIT 1, se iniciará con el nº 31 y se numerará a las familias consecutivamente desde el momento de su inclusión.
- Un número de un solo dígito para designar la generación que ocupa el individuo dentro de su familia
- Un número de 2 dígitos arábigos que designará la posición del individuo en su generación. La numeración será de izquierda a derecha. Nota: Dos individuos numerados consecutivamente en la misma generación pueden no estar emparentados genéticamente (por ejemplo marido y mujer). Pero en cada subconjunto de hermanos, el orden de nacimiento (y también el de numeración) debería ser, salvo excepción por motivos de claridad del dibujo, desde el primogénito hasta el más joven, de izquierda a derecha. No se numerarán ni los abortos, ni los fetos nacidos muertos ni las muertes neonatales (de menos de 6 semanas).

Nombre: El nombre es confidencial y se usará para evitar o detectar errores de identificación.

5. ARBOL FAMILIAR

Se dibujará el árbol familiar para cada familia incluida en el proyecto, según las reglas generalmente aceptadas:

1. Cada generación debe ocupar una línea horizontal separada, con la más antigua en la parte superior, numeradas de arriba a abajo con números romanos que se colocarán a la izquierda de cada línea generacional.
2. En cada generación, los individuos se numerarán preferentemente de manera consecutiva de izquierda a derecha con números arábigos. En cada grupo de hermanos, el orden debe ser preferentemente desde el primogénito hasta el menor.
3. Los varones se simbolizarán con cuadrados y las mujeres con círculos. Individuos de sexo desconocido, con rombos. Los abortos, fetos nacidos muertos y muertes neonatales (antes de la sexta semana de vida) no se dibujarán.
4. Los individuos fallecidos tendrán su símbolo cruzado con una línea inclinada
5. Los individuos afectados de tromboembolismo (arterial o venoso) se representarán

con su símbolo pintado de negro. Los símbolos de los sujetos asintomáticos se dejarán vacíos.

6. El *propositus* debe señalarse con una flecha.
7. Los matrimonios consanguíneos deben simbolizarse por una doble línea horizontal que conecta los dos símbolos. Se especificará aparte el grado de consanguineidad (ej. primos hermanos)
8. Los gemelos monocigóticos se simbolizarán con una línea desde la horizontal que se bifurca y conecta con los símbolos. Los gemelos dicigóticos, con dos líneas que se originan directamente desde un punto común, en la horizontal. En caso de que no se conozca el tipo de gemelaridad, se colocará un interrogante entre los dos símbolos.

El dibujo del árbol familiar se utilizará para representar gráficamente los individuos afectados de las distintas enfermedades registradas (trombosis venosa, trombosis arterial, enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, neoplasia) y la información relativa a composición de domicilios y dieta compartida (ver Punto 6)

6. REGISTRO DE COMPOSICION DE DOMICILIOS Y DIETAS COMPARTIDAS

En cada familia se registrará la composición de los domicilios involucrados, es decir la relación de individuos que conviven habitualmente en el mismo hogar. Esta información permitirá conocer los efectos ambientales compartidos sobre los distintos fenotipos. Para estudiar los posibles efectos de la dieta, se registrará también los individuos que, además de compartir domicilio, comparten la mayoría de las comidas habituales (al menos 2 de las 3 comidas principales los días laborables y todos las comidas en días festivos)

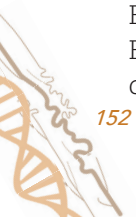
7. DATOS CLINICOS

En todos los individuos incluidos fenotipados se recogerá de forma exhaustiva la misma información clínica, independientemente de su estado de afectación trombótica.

La información clínica debe extenderse a los familiares ya fallecidos y a los vivos no fenotipados dibujados en el árbol. Se procurará obtener información documentada de los episodios de trombosis u otras patologías en la medida de lo posible. Es de suma importancia disponer de diagnósticos objetivos de los episodios de tromboembolismo, en especial para los no *propositus*.

Para cada individuo (fenotipados, no fenotipados y fallecidos) se cumplimentará una **Hoja de Recogida de Datos Clínicos (HRDC)**. Ver ANEXO 4.

En los individuos fenotipados no debe dejarse en blanco ningún campo del formulario. En los fallecidos y en los vivos no fenotipados se procurará recoger los siguientes datos: fechas de nacimiento y muerte, causa de muerte, antecedentes de trombosis



venosa o arterial, enfermedad inflamatoria y/o enfermedad autoinmune, cáncer.

En el campo que registra el número de episodios (trombóticos, reproductivos, etc.) cero (0) significará que no ha existido ninguno.

En los campos que registran datos demográficos:

"Y" = sí; "N" = no.

La HRDC utiliza como idioma el inglés, puesto que este proyecto será presentado a Instituciones Europeas y de USA, para evitar traducciones y errores. A continuación se describen los campos incluidos y se especifican las instrucciones de cumplimentación.

I. Identificación

1. Código individual

Nombre y apellidos. Nº de laboratorio y Nº de Historia Clínica. Domicilio y teléfonos.

2. Propositus: sí / no. Sólo se aceptará un propositus por familia. Fenotipado: sí / no.

3. Fecha de nacimiento

Definida como *día/mes/año* usando dos dígitos arábigos en *día* y *mes* y 4 dígitos en *año*. (Ejemplo. 8 de julio de 1953: 08/07/1953; y si sólo se conoce el año: 01/01/1953)

4. Fecha de entrada en el estudio

Se define como el día de la recogida de datos y extracción de muestras (Ver punto 3)

5. Sexo M= varón (*male*); F=mujer (*female*).

6. Fecha de la muerte (Ver punto 3)

7. Causa de la muerte: Elegir entre las siguientes:

- | | |
|--|--|
| - Edad avanzada | <i>Advanced age</i> |
| - Enfermedad tromboembólica (arterial o venosa) | <i>Thromboembolic disease</i> |
| - Neoplasia | <i>Cancer</i> |
| - Muerte traumática | <i>Traumatic death</i> |
| - Enfermedad infecciosa | <i>Infectious disease</i> |
| - Complicación quirúrgica (no trombótica) | <i>Surgical complication (not thrombotic)</i> |
| - Enfermedad hepática, pulmonar, digestiva o renal | <i>Liver, lung, digestive or kidney disease</i> |
| - Enfermedad cardíaca no coronaria | <i>Non coronary heart disease</i> |
| - Enfermedades del sistema nervioso central (no <i>ictus</i>) | <i>Central nervous system disease, except stroke</i> |
| - Enfermedad autoinmune | <i>Autoimmune disease</i> |
| - Enfermedad inflamatoria | <i>Inflammatory disease</i> |
| - Otras | <i>Other</i> |
| - Desconocida | <i>Unknown</i> |



II. Trombosis venosas previas

Se aplicará un cuestionario clínico validado, con una eficacia diagnóstica del 98%, para confirmar episodios previos de tromboembolismo venoso (*Frezzato et al. Am J Epidemiol 1996;143:1257-65*). Ver ANEXO 5.

1-4. Indicar el número de trombosis venosas profundas en EEII o EESS (*DVT*), embolias de pulmón (*PE*), tromboflebitis superficiales (*STP*) o de otro tipo sufridas por el individuo. Indicar la edad del primer episodio y el método diagnóstico más fiable (objetivo) utilizado.

Métodos puramente **clínicos**

Métodos diagnósticos **objetivos**

Ecografía	Gammagrafía
Flebografía	TAC
Pletismografía	RMN
Cirugía	Autopsia
Arteriografía	Otros

Clinical, phlebography, doppler ultrasonography, pletismography, surgery, angiography, gammagraphy, CT, MNR, autopsy, other

4. Especificar localización de "otras trombosis venosas"

Mesentérica Renal
Hepato-espleno-portal
Vena cava

*Mesenteric Renal
Hepatic-spleen-portal
Cava vein*

5. ¿Ha sucedido algún episodio durante tratamiento anticoagulante?

"Y" = al menos una vez "N" = nunca

6. Número de episodios espontáneos.

Se considera "espontáneo" el episodio que NO ha ocurrido dentro de los 3 meses posteriores a cualquiera de las siguientes situaciones:

Cirugía
Inmovilización
Fracturas óseas
Hospitalización
Embarazo, parto o puerperio
Neoplasia activa
Enfermedad inflamatoria intestinal
Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN)

*Surgery
Immobilization
Bone fracture
Hospitalization
Pregnancy, delivery or puerperium
Active cancer
Inflammatory bowel disease
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)*

Se considera episodio espontáneo aunque ocurra durante la contracepción oral o el tratamiento hormonal sustitutivo.

Se anotará "0" si todos los episodios han ocurrido dentro de los 3 meses posteriores a cualquiera de las citadas situaciones de riesgo.

7. Consignar el número de situaciones de riesgo (cirugías, ingresos hospitalarios, encamamiento de más de 1 semana, escayolamientos) SIN trombosis asociada.



III. Trombosis arteriales previas

Para cada situación indicar el número de episodios y la edad del primero de ellos

1. Infarto de miocardio
2. Angina de pecho
3. AVC isquémico
4. AVC isquémico transitorio (AIT)
5. Trombosis arterial periférica (extremidades)
6. Otros (especificar)

Carótida	riñón
Mesentérica	bazo
Retina	otros

<i>Carotid</i>
<i>kidney</i>
<i>Mesenteric spleen</i>

Reseñar el método diagnóstico más objetivo

Métodos puramente **clínicos**

Métodos diagnósticos **objetivos**

ECG
Ecografía
Enzimas TAC
Arteriografía RMN
Cirugía

<i>Clinical, ECG,</i>
<i>enzymes,</i>
<i>Angiography,</i>
<i>surgery,</i>

El registro de cualquier evento tromboembólico arterial debe basarse de modo preferente en informes clínicos de hospitalizaciones, urgencias, actos quirúrgicos o visitas a especialistas (cardiólogo, neurólogo, cirujano vascular). Ver ANEXO 6.

Se registrará específicamente si el episodio de AVC o trombosis arterial periférica ha sido de origen cardioembólico.

IV. Factores de riesgo cardiovascular asociados en el momento de inclusión

Para cada uno de los contemplados, indicar sí (Y), no (N)

Definiciones:

1. Tabaquismo actual (en el momento del estudio). Se distinguirán 6 categorías ordinales:
No ha fumado nunca; no fuma ahora; fumador pasivo; <10 cig/día; 10-20 cig/día; >20 cig/día.

Se marcará sólo una categoría. En caso de poder aplicar 2 categorías (por ej. "exfumador" y "fumador pasivo" actual) se escogerá la de mayor exposición al tabaco (en aquel caso, "fumador pasivo")

Se considerará fumador pasivo al que en la semana previa a la entrada en el estudio haya estado expuesto **al menos 1 hora** en un ambiente con humo de tabaco, según el cuestionario validado reportado en: *Eisner MD, et al. Environ Health Perspect 2001; 109:809-14.*

Y utilizado en: *Eisner MD, et al. Thorax 2005;60:814-21.*

De forma resumida, se preguntará:

"En los últimos 7 días: ¿Cuántas horas en total, ha estado Ud. expuesto al humo de tabaco en estas situaciones?"

- Su domicilio.
- En el domicilio de otra persona.
- En un coche o cualquier otro vehículo donde alguien fumaba.
- En el trabajo o en áreas del trabajo limitadas para fumadores.
- Cualquier bar, restaurante, club nocturno, recinto deportivo, concierto donde los asistentes fumaban.
- Cualquier otro lugar.

2. Dislipemia si el paciente recibe tratamiento farmacológico específico o las cifras son:

- LDL > 160 mg/dL (4.2 mmol/L)
- Triglicéridos > 200 mg/dL (2.25 mmol/L)
- HDL < 40 mg/dL en hombres o < 50 mg/dL en mujeres

(Esperaremos a conocer estos resultados).

3. HTA si las cifras de T.A. son > 140 / 90 o el paciente recibe tratamiento farmacológico específico.

4. Diabetes si recibe tratamiento farmacológico específico (y por la Historia Clínica) o si la glucemia en ayunas es > 126 mg/dL (7.2 mmol/L). Se considerará intolerancia a la glucosa en ayunas (criterio para síndrome metabólico) si la glucemia en ayunas está entre 110-126 mg/dL.

Si existe diabetes mellitus, distinguir tipo 1 / 2

5. Venas varicosas en EEII

6. Neoplasia. Distinguir activa (< 5 años) o curada (>5 años). Indicar el tipo.

7. Consumo habitual de alcohol

Para evaluar este parámetro se utilizará una pregunta simple que ha demostrado una buena correlación con el riesgo de enfermedad cardiovascular, según estas referencias:

- Giovannucci E, et al. *Am J Epidemiol 1991;133:810-7*
- Mukamal KJ, et al. *Circulation 2005;112:1406-13.*
- Mukamal KJ, et al. *Ann Intern Med 2005;142:11-9.*

Pregunta:

En una semana típica, ¿cuántos días consume Ud. cualquier tipo de bebida alcohólica?



Con 4 respuestas posibles: 0, 1-2, 3-4, 5-7.

8. Síndrome metabólico, si el individuo reúne al menos 3 de los siguientes criterios:

(Se decidirá "a posteriori", tras conocer todos los resultados).

- Diabetes mellitus tipo 2, o intolerancia a la glucosa en ayunas, o resistencia a la insulina
- Dislipemia con triglicéridos > 150 mg/dL o HDL < 40 mg/dL (hombres) / 50 mg/dL (mujeres)
- HTA
- Circunferencia de cintura > 102 cm en hombres o > 88 cm en mujeres

Medidas antropométricas:

Determinar el peso, la estatura y la circunferencia de cintura mediante aparatos adecuados. (ver apartado 9). Calcular el Índice de masa corporal (BMI).

VI. Historia clínica complementaria

A. Medicación habitual y actual: consignar todos los productos farmacológicos agrupados por mecanismos de acción:

- | | |
|---|--|
| - compuestos vitamínicos | <i>Vitamins</i> |
| - anticoagulantes | <i>Oral anticoagulants</i> |
| - antiagregantes plaquetares | <i>Antiplatelets agents</i> |
| - analgésicos, antiinflamatorios | <i>Analgesics, antiinflammatories</i> |
| - inmunosupresores | <i>Immunosupresors</i> |
| - hipolipemiantes: estatinas o fibratos | <i>Antilipemic agents</i> |
| - antidiabéticos | <i>Antidiabetics</i> |
| - antihipertensivos | <i>Antihypertensive agents</i> |
| - antiarrítmicos | <i>Antiarrhythmic agents</i> |
| - vasodilatadores | <i>Vasodilators</i> |
| - diuréticos | <i>Diuretics</i> |
| - antiepilépticos | <i>Anticonvulsants</i> |
| - antineoplásicos | <i>Chemotherapy</i> |
| - antiulcerosos | <i>Antiulcer agents</i> |
| - antidepresivos o psicotrópicos | <i>Antidepressants or antipsychotics</i> |
| - tratamientos hormonales (tipo tiroxina) | <i>Hormonal therapy</i> |
| - otros | <i>Other</i> |

Especificar hipolipemiantes: estatinas y fibratos

Si el paciente recibe habitualmente tratamiento antitrombótico, asegurar que en el día de la obtención de muestras no está bajo la influencia de HNF, HBPM, anticoagulantes orales, antiagregantes plaquetares ni antiinflamatorios o inmunosupresores (Ver ANEXO 8). En caso contrario, reprogramar estudio (si es posible) o consignar el fármaco, para controlar su efecto en los fenotipos pertinentes.

B. Relacionada con el metabolismo del hierro

Para cada uno de los contemplados, indicar sí (Y), no (N).

1. Ha seguido tratamientos previos con hierro oral?
2. Antecedentes de gastrectomía.
3. Antecedentes de sangrado. Localización.
4. Antecedentes de hemocromatosis hereditaria.
5. Antecedentes personales o familiares de anemia perniciosa.
6. Tratamientos previos con vitamina B12.
7. Antecedentes de síndrome mieloproliferativo crónico. Tipo.



C. Antecedentes personales de neoplasia hematológica.

D. Relacionada con la inflamación

Antecedentes de enfermedad inflamatoria. Tipo. Fase actual.

Ingesta habitual de antiinflamatorios. Supresión de más de 15 días.

Fármacos inmunosupresores. Supresión de más de 1 mes.

Se recogerán agrupados por familias de principios activos

E. Antecedentes personales de enfermedad autoinmune o hipersensibilidad. Tipos.

Se distinguirá entre un grupo nuclear de 9 enfermedades (*core* constituido por: diabetes tipo 1, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis y síndrome de Sjögren primario) y otras enfermedades autoinmunes (hematológicas, cutáneas, neurológicas, endocrinológicas, renales, de tracto digestivo, oculares o respiratorias). Se considerarán como enfermedades por hipersensibilidad al asma extrínseca, rinitis alérgica y dermatitis atópica.

F. Otras enfermedades asociadas.

G. Intensidad de actividad física, según la versión corta de un cuestionario clínico estandarizado y validado (IPAQ) que permite separar a la población en 3 categorías: inactivos, mínimamente activos o saludablemente activos y también expresar la actividad física como una variable continua medida en MET-min/semana (www.ipaq.ki.se). Ver Craig CL et al. *International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. Med Sci Sports Exerc* 2003;35:1381-95.

7.1 ACTUALIZACIÓN DE EVENTOS

Se instruirá a todos los participantes en el proyecto para comunicar cualquier evento tromboembólico o nuevo diagnóstico de enfermedad inflamatoria o autoinmune ocurrido con posterioridad a la fecha de inclusión y durante los 10 años siguientes. Esta información es muy relevante en los casos que sean todavía asintomáticos en el momento de la inclusión.

También se intentarán registrar las muertes acaecidas durante este tiempo y sus causas, mediante la colaboración de los familiares

Para evitar sesgos y obtener una actualización lo más completa posible, se propone un seguimiento de todos los individuos incluidos en el estudio. La metodología de este seguimiento está pendiente de diseñar, pero se basará en contactar con los propositus y/o todos los representantes de familia para interrogar sobre los nuevos diagnósticos clínicos relacionados (tromboembolismo, enfermedad autoinmune o inflamatoria, causas de muerte) de TODOS sus familiares.

Esto permitirá realizar un análisis actualizado de los fenotipos “riesgo de enfermedad”

Este seguimiento se realizará por personal administrativo, con apoyo de los médicos en los casos necesarios, con una periodicidad de 3-4 años desde el inicio del reclutamiento

A estos efectos se cumplimentará un cuestionario resumido de “Actualización de eventos”. Ver ANEXO 7

8. PROTECCION DE LOS DATOS Y LAS MUESTRAS

Todos los datos recogidos en este protocolo son estrictamente confidenciales, estarán sujetos a la Ley de Protección de Datos vigente y seguirán los cauces y normativas que el Hospital de la Santa Creu i Santa Pau tiene establecido para este tipo de información. Se velará por el cumplimiento riguroso de estas directrices.

Durante el desarrollo del protocolo se tendrán en cuenta las directrices de la Agencia Española de Protección de Datos. Se definirán estrictamente los tipos de usuario y sus correspondientes grados de acceso a la información sensible generada para todo el personal involucrado

El protocolo seguirá las recomendaciones de la European Society of Human Genetics, formuladas en:

- *The European Society of Human genetics' PPPC. Data storage and DNA banking for biomedical research: technical, social and ethical issues. Eur J Hum Genet 2003;11, Suppl 2:S8-S10.*
- *Godard B, Schmidtke J, Cassiman JJ, Aymé S. Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional perspective. Eur J Hum Genet 2003;11, Suppl 2:S88-S122.*

9. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS, RECOGIDA DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO

Ayunas de 12h: El mismo día que se recoja la información clínica, se realizarán las mediciones antropométricas y se procederá a la extracción de muestras de sangre de cada individuo incluido en el Protocolo.

El individuo habrá debido suspender previamente las siguientes medicaciones:

- Al menos 15 días, los anticoagulantes orales
- Al menos 24 horas las heparinas
- Al menos 15 días los antiagregantes plaquetares
- Si es posible, al menos 15 días los antiinflamatorios

El individuo no habrá tenido ningún episodio tromboembólico (arterial o venoso) en los últimos 3 meses. Tampoco habrá presentado ningún proceso inflamatorio agudo en el último mes.

Toda la información relacionada con la obtención de la muestra biológica y su procesamiento se recogerá en un formulario denominado "Circunstancias asociadas a la obtención de la muestra" que se encuentra en el ANEXO 8

Mediciones antropométricas:

Estatura, en cm, con una precisión de 1 cm. Se obtendrá con el individuo descalzo.

Peso, en Kg, con una precisión de 1 Kg. Descalzo y con sólo ropa ligera.

Índice de masa corporal (BMI). Se calculará como: peso (kg) / estatura (m)²

Circunferencia de cintura (cm): mediante cinta métrica, se medirá justo por encima de la cresta ilíaca, directamente sobre la piel.

Extracción de muestras de sangre

1. Extracción preferente

Tipos de tubos y volumen

- Hemostasia: 30 mL de sangre total en citrato
- Ultraestructura plaquetar: 4 mL de sangre total en 2 tubos con solución tamponada de glutaraldehído
- Citometría plaquetar: 3 mL de sangre total en citrato
- Hemograma y citometría leucocitos: 3 mL de sangre total en EDTA
- Bioquímica y metabolismo homocisteína: 6 mL suero y 4 mL de plasma frío EDTA
- Laboratorio inflamación: 10 mL de sangre total en heparina
- Extracción ARN: 5 mL sangre total (en 2 tubos especiales PAXgene®)

Total :	Citrato	35 mL sangre total (7 tubos de 5)
	EDTA	13 mL sangre total (1 tubo de 3 y otro de 10 en frío)
	Suero	20 mL sangre total (2 tubos de 10)
	Heparina	10 mL sangre total (1 tubos de 10)
	Glutaraldehido	4 mL sangre total (2 tubos, a 37°C)
	PAXgene	5 mL sangre total (2 tubos de 2,5)
Volumen total sangre:		87 mL (repartido en 16 tubos)

2. Extracción alternativa mínima en caso de niños pequeños o dificultades técnicas

Tipos de tubos y volumen

Total :	Citrato	20 mL sangre total (4 tubos de 5)
	EDTA	8 mL sangre total (1 tubos de 3, y otro de 5 en frío)
	Suero	10 mL sangre total (1 tubo)
	Heparina	5 mL sangre total (1 tubo de 5)
	Glutaraldehido	2 mL sangre total (1 tubo, a 37°C)
	PAXgene	2,5 mL sangre total (1 tubo)
Volumen total sangre:		47 mL (repartido en 10 tubos)

Orden de extracción de los tubos

1. Glutaraldehído (2); 2. Heparina (1); 3. PAXgene (2); 4. Citratos (7); 5. EDTA (2); 6. Suero (2)

La extracción se efectuará en decúbito, con palomita. A ser posible con una sola venopunción. En caso de precisar 2 venopunciones, la 2ª se efectuará en el brazo contralateral, siguiendo el mismo orden de tubos. Se acabará con una extensión en porta.

Se anotará la hora y el minuto (aprox) del inicio de la extracción de la muestra, para valorar la influencia en el tromboelastograma.

9.1 Destino inicial de las muestras

Se designarán dos técnicos (del equipo de ADN-ARN y de plasma) responsables de todo este circuito. El circuito detallado se describe en documento aparte.

1. Unitat d'Hemostasia i Trombosi.

7 tubos de citrato, 2 tubos de glutaraldehído y 2 tubos PAXgene.

A partir de estas muestras se realizarán determinaciones inmediatas en sangre total (por ejemplo, tromboelastografía y pruebas de función plaquetar) y se obtendrá plasma, ADN y ARN para su almacenamiento. Parte del plasma se consumirá de inmediato para el estudio básico de coagulación y la determinación de factores VII, VIII, IX, XI y XII. Con los tubos de glutaraldehído, se procesará la muestra para inclusión y microtomía previa al estudio de ultraestructura plaquetar.

2. Hematología Biológica (Coulter):

Tubo de EDTA de 3 mL. Una vez realizado el hemograma automático, se pasará al laboratorio de citometría de flujo, donde se determinarán, en el día, los fenotipos leucocitarios y plaquetares descritos en el apartado 10.4. Al final del día, el tubo primario (con código de barras y unos 100 μ L de sangre total) se entregará al laboratorio de Eritropatología para determinar el FoE.

3. Bioquímica

2 tubos de suero. Uno se remitirá por el circuito rutinario, inmediatamente (para evitar retrasos en la medición de glucemia) al analizador central. El otro tubo lo conserva Hemostasia a 4°C hasta el final del día, y se reunirá con la muestra excedente de las determinaciones inmediatas para alicuotar (Unitat d'Hemostàsia. Uno de los tubos primarios con el código de barras y unos 500 μ L de suero, a Eritropatología para 4 fenotipos de rutina (haptoglobina, sTfR, B12, folato sérico) Se congelará el sobrante, unos 400 μ L con el código **SER***, a los 2-3 días de la extracción.

4. Laboratorio de homocisteína.

Tubo de EDTA de 10 mL en frío por el circuito rutinario. La homocisteína (FPIA) se procesa en el día. Con el plasma excedente se crea una alícuota (1.2 mL, para SAM y SAH) y otras 2 de 175 μ L (para Hcy-Cys por HPLC, y para betaína) en el propio laboratorio. El resto se alícuotará en 4 fracciones y se almacenará en Hemostasia. El botón celular, en el tubo primario, con código de barras, a Eritropatología, para glicoproteínas de membrana eritrocitaria (Dr. Vives Corrons, Hosp. Clínic)

5. Laboratorio de inflamación

1 tubo de heparina. En una parte de la sangre total se separará el plasma para alícuotar y congelar (para marcadores basales) y con el botón celular sobrante se extraerá ARN sin estimular la muestra. El resto de sangre total se estimulará con ionóforo y lipopolisacárido (LPS) para alícuotar y congelar el plasma sobrenadante. Del botón celular sobrante en la fracción estimulada con LPS, se extraerá ARN.

9.2 Tipo, cantidad y volumen de alícuotas para congelación

Del total obtenido se tomarán 2 alícuotas de 0.25 mL de plasma y 250 μ L (50 ng/ μ L) de ADN para su inclusión en el proyecto EUROCLOT u otros futuros proyectos internacionales.

Plasma citratado: 40 alícuotas de 200 μ L y 1 alícuota de 300 μ L (a -80°C) y 2 de 600 μ L y 2 de 700 μ L (a -40°C). En total 45 alícuotas.

Suero: 12 alícuotas inmediatas de 500 μ L y 1 alícuota diferida 2 días (con el excedente SER*).

Plasma en EDTA frío: 2 alícuotas de 175 μ L y 1 alícuota de 1200 μ L (conservadas en Bioquímica) y 4 alícuotas con el resto, conservadas en Hemostasia.

Plasma en heparina SIN estimulación celular: 8 alícuotas de 250 μ L (0.25 mL) .

Plasma en heparina POST estimulación celular con ionóforo: 5 alícuotas de 200 μ L (0.2 mL)

Plasma en heparina POST estimulación celular con lipopolisacárido (LPS): 8 alícuotas de 250 μ L.



9.3 Etiquetado de alicuotas y muestras biológicas

Cada etiqueta contendrá la siguiente información:

- Acrónimo GAIT.
- Número GAIT2 del individuo (5 cifras) **y/o** número de laboratorio (siempre por este orden). Los dos primeros dígitos del n° de laboratorio corresponderán al año de la extracción.
- Fecha de congelación
- Tipo de muestra biológica, con el código siguiente:

- Suero	SER
- Suero (congelado 3 días post)	SER*
- Plasma citratado:	CIT
- Plasma en EDTA	EDT
- Plasma en EDTA frío:	EDT f
- Plasma en heparina basal:	HEP
- Plasma en heparina post ionóforo	HEP ion
- Plasma en heparina post LPS	HEP Ips
- ADN	DNA
- ARN basal	ARN
- ARN pre LPS	ARN pre
- ARN post LPS	ARN Ips
- Ultraestructura plaquetar	UP-pre y UP-blo

Ejemplos

GAIT 43208
05173458
14-06-05

GAIT 43208
14-06-05
DNA

GAIT 43208
05173458
14-06-05

GAIT 43208
0517345
~~14-06-05~~

GAIT 43208
14-06-05
ARN Ips

GAIT 43208
05173458
~~14-06-05~~

Cantidad de etiquetas

	<u>tipo</u>	<u>cantidad</u>
- Suero	SER	12 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Suero congelado 3 días post obtención	SER*	1 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Plasma citratado:	CIT	2 (con n° GAIT, para EUROCLOT)
- Plasma citratado:	CIT	45 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Plasma en EDTA:	EDT	0
- Plasma en EDTA frío:	EDT f	4 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Plasma en heparina basal:	HEP	8 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Plasma en heparina post ionóforo	HEP ion	5 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Plasma en heparina post LPS	HEP Ips	8 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- ADN	DNA	2 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- ADN	DNA	3 (con n° GAIT, para CNG y EUROC.)
- ARN basal	ARN	2 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- ARN pre LPS	ARN pre	2 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- ARN post LPS	ARN Ips	2 (con n° GAIT y n° de laboratorio)
- Ultraestructura plaquetar preinclusión	UP-pre	1 (sólo n° GAIT)
- Ultraestructura plaquetar bloques	UP-blo	1 (sólo n° GAIT)
- En blanco		2 (sólo n° GAIT)
	Total	100

Total de tubos para congelar y almacenar por Hemostasia: **85 (+3** en laboratorio de Hcy)
Cada individuo en una caja a -80°C, identificada exteriormente con el código GAIT y n° de laboratorio.



10. DETERMINACIONES DE FENOTIPOS

10.1 Parámetros de la hemostasia

Tipo de tubo	Volumen
Citrato	35.0 mL
EDTA	3.0 mL
Solución tamponada de glutaraldehído	4.0 mL
Suero	0.5 mL

Repetición de fenotipos GAIT 1.

Estudio biológico de trombosis (EBT) completo

- Tiempos de TTPA, TP, trombina
- Fibrinógeno, proteína C, proteína S (total, libre y funcional), antitrombina
- Anticoagulante lúpico
- Anticuerpos antifosfolípido (IgG e IgM): Anti β_2 glicoproteína I, anti CL, anti FS.
- PAI-1 (por su relación con t-PA y el síndrome metabólico)

Fenotipos GAIT 1 correlacionados genéticamente con el riesgo de trombosis

- RPCa
- Factor VII
- Factor VIII
- Factor IX
- Factor XI
- Factor XII
- Factor von Willebrand Ag.
- t-PA
- Homocisteína basal
- Vitamina B 12
- Folato en sangre total
- Tiempo de protrombina con TM
- Receptor soluble de la transferrina (sTfR)

Otros fenotipos no incluidos en GAIT 1

- Complejos TAT
- Trombomodulina soluble
- Factor XIII actividad
- α_2 -macroglobulina
- Receptor endotelial de la proteína C soluble (sEPCR)
- Fibronectina
- VW-collagen binding activity (vW funcional)
- Proteína Z
- Inhibidor de proteína Z (ZPI)
- ADAMTS-13 funcional
- Potencial endógeno de trombina en PPP
- Tiempo de lisis del coágulo
- Haptoglobina en suero (Serie roja)
- **Tromboelastograma (ROTEM® de PENTAPHARM GmbH)**

1. Se medirán los 5 fenotipos básicos:
 - Tiempo de reacción (R)



- Tiempo de coagulación (CT, en seg.)
- Tiempo de formación del coágulo (CFT, en seg.)
- Ángulo (α , en °)
- Amplitud máxima (MCF, en mm)

2. Otros fenotipos derivados de los básicos o relacionados con la firmeza del coágulo y la fibrinólisis:

- Amplitudes en distintos momentos (en minutos) del trazado ($A_5, A_{10}...$)
- Tiempo hasta amplitud máxima MCF-t (desde final de CT hasta MCF, en seg.)
- Tiempo T (total desde el inicio del trazado hasta MCF, CT + MCF-t)
- Constante T (desde el final de CFT hasta MA)
- Ratio MCF/ CT + CFT
- Elasticidad máxima del coágulo (MCE) definido como

$$MCE = 100 \cdot MCF / (100 - MCF)$$
- Lisis máxima (ML)
- Tiempo de lisis (CLT)
- Tiempo de inicio de la lisis (LOT)
- Ratio de lisis del coágulo (CLR)

- **Tromboelastograma activado con factor tisular (Tiftem).**

1. y 2. Se medirán los anteriores fenotipos tras activación de la muestra con factor tisular

- **Tromboelastograma activado con ácido elálgico (Intem) y con uroquinasa (UK).**

1. y 2. Se medirán los anteriores fenotipos tras activación de la muestra con ácido elálgico, iniciador de la vía intrínseca. La UK permitirá evaluar el tiempo de lisis.

Fenotipos relacionados con la actividad plaquetar

- Recuento plaquetar (*ver hemograma*)
- VPM (*ver hemograma* y mediante analizador semicuantitativo)
- Plaquetocrito (*ver hemograma*)
- PF4
- β_2 -tromboglobulina
- Prueba de función plaquetar (PFA-100) en cartucho de colágeno, sin inductores.
- Pruebas de función plaquetar con los inductores ADP y epinefrina (PFA-100)
- Marcadores de membrana (*ver citometría de flujo*)
- Parámetros morfológicos (tamaño y forma) y análisis de estructuras intraplaquetarias mediante microscopía electrónica:
 - gránulos (α , densos)
 - sistema canalicular abierto
 - sistema tubular denso
 - mitocondrias
 - gotas lipídicas
 - masas de glucógeno



10.2 Fenotipos relacionados con homocisteína y bioquímica básica

Tipo de tubo	Volumen
Suero	2.0 mL (para bioquímica básica)
EDTA (plasma obtenido en frío)	4.0 mL

Nuevos fenotipos relacionados con la homocisteína

Además de homocisteína basal (FPIA), Vitamina B12 y folato en sangre total (ya consignados)

- Homocisteína (por HPLC) que ofrecerá también la cisteína
- S-adenosil metionina (SAM)
- S-adenosil homocisteína (SAH)
- Creatinina
- Folato eritrocitario, Folato sérico

Opcionales:

- Vitamina B6, Betaína, Acido metilmalónico
- Vitamina D y marcadores metabolismo óseo

Fenotipos complementarios de bioquímica básica (inmediatos)

- Glucemia (procesamiento en menos de 30 min.).
- AST, ALT, GGT y Fosfatasa alcalina.
- Ácido úrico
- Creatinina (ver fenotipos homocisteína)
- Albúmina

Otros fenotipos de bioquímica no inmediatos

- Estudio de lípidos (colesterol total, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, triglicéridos y apoB)
- Proteína C reactiva (ELISA de alta sensibilidad)
- LDL oxidada
- Insulinemia (por su relación con el síndrome metabólico) (+ TNF α , IL-6, pag.20)
- Adiponectina.
- Leptina.
- Otros marcadores (posibles, aún por precisar) de estrés oxidativo: F2-isoprostanos, radicales libres de oxígeno (FORM assay), tirosinas modificadas (nitro, cloro, bromo-tirosina), derivados de hidroperóxido, fosfolípidos oxidados.

10.3 Fenotipos relacionados con la inflamación

Tipo de tubo	Volumen
Heparina	10.0 mL

- Albúmina (ya consignado)
- Fibrinógeno (ya consignado)
- Recuento de leucocitos (*ver hemograma*)

10.3.1 Fenotipos basales determinados en plasma (para evitar la activación plaquetar contenida en el suero)

- Proteína C reactiva (ELISA de alta sensibilidad, ya consignado en bioquímica/lípidos)
- TGF β
- MCP-1 (monocyte chemoattractant)
- Fractalquina, VEGF
- NAP-2 (neutrophil activating protein)
- Trombospondina-1
- Interleucinas:
 - TNF- α
 - IL-8 (y otros mediadores de inflamación retardada como IL-4, IL-10)
 - IL-6
 - Receptor soluble de IL-6 (sIL-6R)

10.3.2 Citocinas obtenidas post estimulación “in vitro”:

- De plaquetas, mediante ionóforo a los 10 minutos del estímulo: trombospondina-1, TGF- β , PDEGF, TXB₂
- De células mononucleadas, mediante LPS e incubación 24 horas: IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, MCP-1, IL-8, IL-4, IL-10, VEGF, TGF- β .

10.3.3 Otros marcadores posibles de estado inflamatorio (basal y/o postestimulación):

- ADAMTS-10, ADAMTS-17 (y ADAMTS-13, *ver hemostasia*)
- Mataloproteinasas: MMP-1, MMP-2, MMP-9

10.3.4 Moléculas de adhesión (basal y/o postestimulación):

Selectinas (CD62) solubles en plasma

- sP-selectina
- sL-selectina
- sE-selectina

Integrinas solubles en plasma

- s ICAM-1
- sVCAM-1

10.3.5 Expresión de ARN en las células nucleadas

- Antes de estimular e incubar con LPS
- Post estimulación e incubación con LPS

10.4 Antígenos de membrana mediante citometría de flujo

Tipo de tubo
EDTA

Volumen
3.0 mL

Marcadores de plaqueta (con 1.5 mL de sangre total en citrato de los consignados en 10.1):

- CD49b/CD29 GP Ia-IIa



- CD49e/CD29 *Integrina $\alpha 5$ - $\beta 1$*
- CD32 *GP VI/Fc- γ -RIIA*
- CD11b/CD18 *Mac-1*
- CD31 *PECAM-1*
- CD62 P *P selectina)*
- CD36 *(GP IV o receptor para trombospondina)*
- CD40L
- PAR-1
- EPR-1
- F11rp/JAM
- Elastasa
- Catepsina-G
- CD41 *(GP IIb)*
- CD42 *(GP Ib)*
- CD61 *(GP IIIa)*
- CD49 *(integrinas 1-5)*
- CD51 *(αV integrina, receptor vitronectina)*
- CD144 *VE-cadherina*
- Agregados leuco-plaquetares

Marcadores de stress oxidativo

- Por determinar

Marcadores de leucocitos y células mononucleadas:

(con los 3.0 mL de EDTA consignados en 10.1)

4 paneles de antígenos:

- Fenotipo linfoide estándar (Lymphogram: CD3, CD4, CD8, CD56 y CD19)
- CD 62, CD11b, CD45, CD117
- CD 38, CD110, CD4, CD3
- Células precursoras endoteliales (EPCs) CD 34 / KDR, CD144, CD33, CD45

Partículas circulantes (micropartículas) con actividad procoagulante:

(con los 3.0 mL de EDTA consignados en 10.1)

- Plaquetares
- Monocitos
- Linfocitos
- Eritrocitos
- Granulocitos
- Endoteliales

10.5 Fenotipos del hemograma de rutina

Tipo de tubo

EDTA

Volumen

3.0 mL (ya consignados en 10.1)

- Recuento plaquetar, VPM y plaquetocrito
- Hemoglobina
- Hematocrito
- Hematíes



- VCM
- CCMH
- HCM
- RDW
- Reticulocitos (incluye 5 fenotipos)
- Leucocitos totales
- Fórmula leucocitaria:
 - Neutrófilos segmentados (valor absoluto y %)
 - Eosinófilos (idem)
 - Basófilos (idem)
 - Monocitos (idem)
 - Linfocitos (idem)

11. ANALISIS GENETICOS: ADN Y ARN

11.1. Exploración global del genoma en el Centre National de Genotypage (CNG), Paris, Francia, utilizando más de 400 marcadores anónimos polimórficos (STRs) de ADN.

Otros STRs previstos para genotipar:

- Regiones cromosómicas con señales de ligamiento significativas en el GAIT 1.
- Regiones cromosómicas con evidencias sugestivas de ligamiento en el GAIT 1.
- Genes candidatos en dichas regiones

Otros marcadores (SNPs) previstos para genotipar:

- Factores de riesgo cardiovascular: FVL, PT20210, F12 46C/T, ABO, C667T MTHFR.
- En genes candidatos situados en las señales de ligamiento significativas en el GAIT 1.
- Análisis global del genoma con SNPs en el CNG de Paris

11.2. Análisis de expresión de ARN en plaquetas, mediante técnicas de microarrays. Se realizará en el Laboratorio de Genética de la Trombofilia, de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi.

11.3. Análisis de expresión de ARN de los genes involucrados en los procesos inflamatorios, en las células nucleadas sanguíneas. Se realizará con la muestra del botón celular excedente basal y con la muestra tras estimulación con LPS e incubación 24 horas y separación del plasma.

11.4. Métodos

11.4.1 Extracción ADN genómico

Se precisa el pellet celular de 4 tubos de citrato (que contienen unos 20 mL de sangre total)

Método Salting-out (Miller et al 1989)

Leer concentración O.D.280/260 nm. Pureza a 280 nm.

Separación en 2 alicuotas:

Una, para generar las sucesivas alicuotas de trabajo a las mismas concentraciones

- Soluciones de trabajo a 50 ng/ μ l para el laboratorio de Sant Pau
- Soluciones de 50 μ l a concentración 200 ng/ μ l. (Total 10 μ g de ADN genómico), para enviar a EuroClot y al CNG (Genome Scan SNPs y STRs)

La segunda alicuota se congelará a -80°C

11.4.2 Extracción ADNm (ADN mitocondrial)

Se obtendrá a partir de la extracción de ADN genómico.

Secuenciación directa de la los 16.500 pb del ADNm

Estimación: secuenciar en total entre 90-110 mujeres fundadoras en los diferentes pedigrees.

11.4.3 Extracción ARN

2 tubo PaxGene de sangre total:

Con el primero se realizará una extracción manual QuiaGene de ARN (Unitat d'Hemostasia)

Leer concentración O.D.280/260 nm. Pureza a 320 nm.

Congelar a -80°C

Microarrays de expresión

Con el segundo tubo, se procederá a congelar sin extraer el ARN.

Células estimuladas: a partir de la muestra de Heparina libre de endotoxina estimulada con LPS se realizará la extracción manual QuiaGene de ARN para cuantificar la expresión de genes candidatos relacionados con la inflamación.

Leer concentración O.D.280/260 nm. Pureza a 320 nm.

Congelar a -80°C



VERIFICACION DE LA RUTINA DEL PROTOCOLO GAIT 2

Requisitos cumplidos por el *propositus*:

- Trombosis inexplicada biológicamente
- Al menos un episodio de tromboembolismo espontáneo
- Familia extensa
- Disponer del árbol y de la información *household*

Rutina para la correcta inclusión de individuos e información en el proyecto GAIT 2

1. Arbol familiar dibujado.
2. Etiquetas con número de historia clínica del HSCSP.
3. Identificar y codificar al sujeto
4. Dar de alta el individuo en programa informático y en la base de datos GAIT 2
5. Información "*Household*" y dieta compartida.
6. Firma del consentimiento informado.
7. Cumplimentar *Hoja de recogida de datos clínicos (HRDC)*. Verificar diagnósticos.
8. Solicitud de analítica en un perfil de petición (código perfil 375).
9. N° de laboratorio. Registrarlo en la HRDC.
10. Controlar el ayuno previo a la extracción (12 h.)
11. Controlar supresión de fármacos anticoagulantes, hipolipemiantes, antiplaquetares y antiinflamatorios.
12. Ausencia de tromboembolismo en los 3 últimos meses y de proceso inflamatorio agudo (1 mes)
13. Pesar
14. Tallar
15. Circunferencia de cintura
16. Extracción muestras con un orden preciso de los tubos (página 18 y ANEXO 11).
17. Cumplimentar *Hoja de circunstancias asociadas a la obtención de la muestra* (Anexo 8)
18. Circuito de los tubos
 - Emisión de etiquetas codificantes Label Printer (*GAIT, N° GAIT y/o N° lab, fecha, tipo de muestra*) para todas las alicuotas.
 - 1 EDTA de 3 mL al Coulter, después a Citometría de Flujo (leucocitos y plaquetas). Resto final a Eritropatología.
 - 1 EDTA de 10 mL en frío al Laboratorio de Dr. Blanco. 3 alicuotas in situ. Resto, para 4 alicuotas en Hemostasia y botón celular final a Eritropatología (en tubo primario)
 - 2 sueros, uno a Bioquímica y el otro para alicuotar y después a Dra. Pujol y Dr. Remacha.
 - Alicuotación de suero, en Hemostasia. Tubo primario final con 500µL a Eritropatología..
 - Tubos con glutaraldehído, extraídos a 37°C, a Dra. Pujol
 - 1 heparina a Dr. Vila / Dra. Camacho. Alicuotas en Lab de inflamación.



Almacenamiento en Hemostasia.

- 2 tubos PAXgene al Laboratorio de Genética de Trombofilia, para obtención de ARN.

- 7 tubos de citrato a Laboratorio de plasma Coagulación:

1.5 mL sangre total a citometría plaquetas

Fenotipos en sangre total (PFA y TEG)

Obtención plasma

Alicuotas de plasma

Fenotipos de plasma en el día

Obtención de ADN

19. Procesado en el día. Resultados.

20. Fraccionamiento de plasma. Congelación.

21. Extracción de ADN y ARN.

22. Muestra de plasma y ADN para los proyectos EUROCLOT y PROCARDIS y de ADN para Centro Nacional de Genotipación (París).

23. Pasar resultados de los fenotipos inmediatos y rutinarios a la base de datos GAIT 2.



COMISION DE SEGUIMIENTO DEL PROYECTO

Una Comisión se encargará de revisar la calidad y exhaustividad de los datos clínicos, administrativos y las muestras biológicas que figuran en este protocolo.

También controlará la documentación de confidencialidad y consentimiento y la custodia de los datos y muestras.

Composición de la comisión

Miembros permanentes (de asistencia obligada)

Responsable Clínico: Dr. Souto.

Responsable de Investigación Básica de la Unitat d'Hemostàsia: Dr. Soria.

Técnico de genética molecular: a designar

Técnico de laboratorio de plasma: a designar

Secretario y coordinador: Lluís Alegría

Bioinformático: Alfonso Buil

Cualquiera de los técnicos y/o de los responsables científicos de los laboratorios implicados del Hospital de Sant Pau (ANEXO 10) podrá ser invitado a participar si alguno de los anteriores miembros lo cree necesario para el desarrollo de las funciones de la comisión.

El secretario y el bioinformático prepararán la documentación necesaria para cada convocatoria. El secretario informará sobre el calendario a todos los integrantes y procurará que este facilite la asistencia de los miembros ocasionales que sean convocados

Periodicidad

Flexible, en función de la velocidad de reclutamiento.

Como mínimo, una vez por trimestre



ANEXO 1: PUBLICACIONES DEL PROYECTO GAIT 1

Año 1999

Souto JC, Mateo J, Soria JM, Coll I, Llobet D, Fontcuberta J.
Homozygotes for prothrombin gene 20210 A allele in thrombophilic family without clinical manifestations of venous thromboembolism
Haematologica 84:627-32. 1999.

Año 2000

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Garí M, Martínez E, Mateo J, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J.
Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families.
Circulation 101:1546-1551,2000

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Coll I, Borell M, Mateo J, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J.
Linkage Analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influence plasma prothrombin levels and risk of thrombosis.
Blood 95:2780-85.2000.

Souto JC, Almasy L, Muñiz E, Soria JM, Borrell M, Bayén L, Mateo J, Madoz P, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J.
Functional effects of the ABO locus polymorphism on plasma levels of von Willebrand factor, factor VIII and APTT.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2024-28.2000.

Souto JC, Almasy L, Borrell M, Mateo J, Soria JM, Blanco-Vaca F, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J.
Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship with physiological risk factors: The GAIT Study.
Am J Hum Genet 67:1452-59. 2000.

Año 2001

Souto JC, Almasy L, Blangero J, Stone W, Borrell M, Urrutia T, Mateo J, Fontcuberta J.
Genetic regulation of plasma levels of vitamin K-dependent proteins involved in hemostasis: results from the GAIT project.
Thromb Haemost 85:88-92. 2001

Año 2002

Souto JC, Soria JM, Fontcuberta J.

La trombosis como enfermedad compleja: nuevos métodos para el estudio de sus bases genéticas.

Med Clin Monogr (Barc) 3(Supl 2):3-7. 2002

Soria JM, Blangero J, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Martínez-Marchán E, Coll I, Tirado I, Cercós A, Almasy L, Fontcuberta J.

Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties.

Hum Genet 111:59-65. 2002.

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martínez-Marchán E, Mateo J, Borrell M, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J.

A quantitative trait locus in human factor XII gene jointly influences plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease.

Am J Hum Genet 70:567-574, 2002.

Soria JM.

Unraveling the genetics of thrombosis.

Eur J Hum Genet 10(S1):59-60, 2002.

Soria JM, Souto JC, Fontcuberta J.

La trombosis como enfermedad compleja.

Hematologica 86:234-237, 2002.

Souto JC.

Search for new thrombosis-related genes through intermediate phenotypes. Genetic and household effects.

Pathophysiol Haemost Thromb 32 (suppl 1):128-130. 2002.

Año 2003

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Martínez-Sánchez E, Mateo J, Borrell M, Stone W, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J.

A new locus on chromosome 18 that influences normal variation in Activated Protein C Resistance phenotype and factor VIII activity and its relation to thrombosis susceptibility.

Blood 101:163-167;2003.

Almasy L, Soria JM, Souto JC, Coll I, Bacq D, Faure A, Mateo J, Borrell M, Muñoz X, Sala N, Stone WH, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J.

A genome scan reveals a major quantitative trait locus influencing free plasma Protein S levels on human chromosome 1q.

Arterios Thromb Vasc Biol 23:508-511;2003.

Souto JC, Almasy L, Soria JM, Buil A, Stone W, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J.

Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels: results from the GAIT Project.

Thromb Haemost 89:468-74;2003.



Souto JC.
Genetic studies in complex disease: the case pro linkage studies.
J Thromb Haemost 1(8):1676-8. 2003.

Souto JC, Stone W, Fontcuberta J.
Reply to: Genome-wide linkage analysis of von Willebrand factor plasma levels implicates the ABO locus as a principal determinant: should we overlook ADMTS13.
Thromb Haemost 90:962 (letter). 2003

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 88:1436-1438. 2003.

Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Souto JC, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, Rodríguez de Córdoba S.
Genetic determinants of variation in the plasma levels of the C4b-binding protein (C4BP) in Spanish families.
Immunogenetics 54:862-866. 2003.

Año 2004

Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Souto JC, Almasy L, Blangero J, Rodríguez de Córdoba S, Fontcuberta J.
Genetic correlation between plasma levels of β chain-containing C4BP isoforms and susceptibility to thrombosis.
J Med Genet 41:e5 2004.

Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J.
Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus (QTL) on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1321-1325. 2004.

Año 2005

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Buil A, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J.
A genome search for genetic determinants that influence fibrinogen plasma levels.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1287-1292. 2005

Souto JC, Blanco-Vaca F, Soria JM, Buil A, Almasy L, Ordoñez-Llanos J, Martín-Campos JM, Lathrop M, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J.
A genome-wide exploration suggests a new candidate gene at chromosome 11q23 as the major determinant of plasma homocysteine levels: results from the GAIT Project.
Am J Hum Genet 76:925-933. 2005.

Almasy L, Soria JM, Souto JC, Buil A, Lathrop M, Fontcuberta J, Blangero J.
A genome scan reveals a major quantitative trait locus influencing Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) and susceptibility to thrombosis disease on human chromosome 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1489-1492. 2005.

Remacha A, Souto JC, Soria JM, Buil A, Sarda P, Lathrop M, Blangero J, Almasy L, Fontcuberta J. Genome-wide linkage analysis of soluble transferrin receptor plasma levels. *Ann Hematol* 2005. En prensa.

Año 2006

Soria JM, Almasy L, Souto JC, Sabater-Lleal M, Fontcuberta J, Blangero J.
The *F7* gene and clotting factor VII levels: dissection of a human quantitative trait locus.
Hum Biol 2006;77:561-575.

Remacha A, Souto JC, Soria JM, Buil A, Sardà MP, Lathrop M, Blangero J, Almasy L,
Fontcuberta J.
Genomewide linkage analysis of soluble transferrin receptor plasma levels.
Ann Hematol 2006;85:25-28

Sabater-Lleal M, Almasy L, Martínez-Marchán E, Martínez-Sánchez E, Souto R, Blangero J,
Souto JC, Fontcuberta J, Soria JM.
Genetic architecture of the *F7* gene in Spanish population: implication for mapping complex
diseases and for functional assays.
Clin Genet 2006;69:420-428.



ANEXO 2: ARGUMENTOS PARA EL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Introducción

Este documento le ayudará a decidir sobre su participación en un proyecto de investigación genética sobre la trombosis, consistente en el estudio de familias grandes como la suya.

¿Qué es una investigación genética basada en el estudio de familias completas?

La investigación genética es fundamental para conocer el papel de los genes en la salud humana y en la enfermedad. Cada proyecto genético de investigación tiene sus propios objetivos. El objetivo puede ser descubrir nuevos genes, averiguar cómo funcionan los ya conocidos o aplicar el conocimiento sobre los genes para prevenir o tratar la enfermedad. Los investigadores deben explicar a los participantes los objetivos específicos del proyecto, antes de que estos decidan participar.

El objetivo fundamental de nuestro proyecto es encontrar los genes que provocan la trombosis venosa. Es muy probable que estos mismos genes estén implicados en el infarto de miocardio y las embolias cerebrales. Para encontrar genes que causan trombosis es imprescindible investigar pacientes con esta enfermedad y también personas emparentadas con ellos. Por eso el método más eficaz consiste en estudiar familias enteras. En el proyecto GAIT 2 pretendemos incluir unas 50 familias con un total aproximado de 1000 personas.

¿Qué es el consentimiento informado?

Antes del inicio del proyecto un grupo de expertos de diferentes ámbitos, llamado Comité Ético, revisará todo el diseño, métodos y criterios de inclusión de familias para asegurar que los investigadores explican bien sus intenciones y proteger a todas las personas que tomen parte. Pero es muy importante que la decisión de participar sea tomada por todas y cada una de las personas afectadas. Este es el proceso que se conoce como “consentimiento informado” para que usted tome la decisión tan libremente como sea posible.

Cuando los investigadores le solicitan su consentimiento, le piden su aceptación voluntaria para participar en el estudio científico. Consentimiento informado significa más que meramente firmar la declaración. Significa que usted conoce los riesgos y los beneficios del estudio y que sabe cómo el estudio le puede afectar o no personalmente. Es imprescindible que usted acepte o rechace la participación libremente y que esta decisión no tenga ninguna consecuencia para los cuidados sobre su salud actuales o futuros. El equipo investigador debe exponerle toda la información que usted necesite para tomar su decisión. Lea con atención cualquier documento

que se le entregue para firmar. No dude en preguntar cualquier asunto relacionado con el estudio que no haya comprendido. Su consentimiento debe ser otorgado cuando usted conoce claramente las implicaciones del estudio.

¿Cuales son los beneficios de los estudios genéticos sobre enfermedades?

La investigación de grupos familiares permite descubrir nuevos genes y su mecanismo de acción en las enfermedades humanas. El gran objetivo a medio y largo plazo es prevenirlas y tratar mejor a los pacientes. Al participar en un estudio genético usted contribuye al progreso de la ciencia y la medicina. No obstante, no debe esperar un beneficio personal directo. Habitualmente, los científicos no le darán ningún resultado de sus análisis, porque ellos no están estudiando individuos aislados. Sin embargo, dada la naturaleza de nuestra investigación, su familia podría beneficiarse de algún hallazgo particular, con aplicaciones en la prevención de trombosis, en algunos familiares concretos.

¿Cuales son algunos de los riesgos de participar en el estudio GAIT 2?

Se va a necesitar una muestra de su sangre. El riesgo que comporta la extracción de sangre es muy pequeño. Por otro lado, existe el riesgo teórico de que si alguien ajeno a los investigadores obtuviera sus datos y los resultados de sus análisis, hiciera un uso inadecuado de esta información. Para su tranquilidad respecto a este riesgo usted debe saber que:

1. Sus muestras de sangre se procesarán de forma anónima, marcadas con un código numérico. La conexión entre sus datos clínicos, sus muestras de sangre y su código numérico se mantendrá siempre bajo secreto profesional. Los miembros del equipo investigador deben poder conocer el código por si necesitaran información adicional, por si tuvieran que comunicarle un resultado concreto y para el análisis estadístico de los resultados. Pero nadie más aparte de los investigadores conocerá su código secreto.
2. Al codificar sus muestras y sus datos, al menos una persona del estudio ha de tener acceso a los ficheros que conectan su nombre con su código y sus muestras de sangre. Se adoptarán medidas de seguridad para salvaguardar esta información, como son habitaciones privadas y cerradas u ordenadores de acceso restringido a los investigadores y bajo contraseñas. No obstante nadie podrá nunca garantizar completamente que la información no llegará a manos de terceros, aunque razonablemente la posibilidad de que esto ocurra es ínfima.

¿Mis muestras serán usadas en otros proyectos de investigación genética?

Algunas veces las muestras sobrantes de un proyecto se guardan adecuadamente (en general son congeladas) para su posible utilización en otros proyectos científicos. En este caso, los investigadores deben informarle sobre cuanto tiempo se guardarían, quién podría usarlas y en qué tipo de investigación. A usted le corresponde autorizar o no este uso adicional de sus datos y su muestra. Los riesgos serían los mismos que ya se han descrito.

De todos modos, hay que comprender que el esfuerzo que supone participar en un proyecto y el enorme coste económico implicado se rentabilizan mucho más si las muestras pueden ser utilizadas en otros proyectos, siempre con el objetivo de combatir la enfermedad. Cualesquiera que fueran los estudios futuros, es imprescindible que los correspondientes Comités Éticos los supervisen y protejan los intereses de todos los participantes. Pero nadie puede conocer, hoy por hoy, los riesgos ni los beneficios exactos de estudios futuros que no han sido ni tan siquiera planificados.

Equipo Investigador GAIT 2
Unitat d'Hemostàsia i Trombosi
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

Febrero 2006



ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: Análisis Genético de la Trombofilia Inexplicada (GAIT-2)

La Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), el Department of Population Genetics de la Southwest Foundation for Biomedical Research (San Antonio, USA) y el Centre National du Genotypage (Francia) están realizando un estudio para conocer cómo afectan los genes al riesgo de padecer trombosis. Le pedimos su participación en el estudio porque o bien usted ha sufrido una trombosis o bien tiene algún familiar que la ha sufrido. Nuestra intención es investigar familias completas y extensas con casos de trombosis, hasta un total de más de 1000 personas de todas las edades. Por favor, le rogamos que lea el documento anexo titulado *El Proyecto GAIT-2: argumentos para otorgar el Consentimiento Informado*.

La enfermedad tromboembólica (trombosis venosa, infarto de miocardio, embolia cerebral) provoca problemas de salud muy serios a muchas personas. Sabemos que el riesgo de padecerla se relaciona con factores como la dieta, el ejercicio, el tabaco y también la constitución genética. El propósito principal de nuestro estudio es encontrar los genes (aún desconocidos) que influyen sobre el riesgo de trombosis. Esto nos ayudará en el futuro a conocer qué personas son susceptibles y a desarrollar medidas preventivas. Usted pertenece a una familia en la que se han diagnosticado casos de trombosis. Por eso le pedimos su colaboración.

Si usted decide participar, le extraeremos alrededor de unos 80 mL de sangre de una vena del brazo (unos 45 mL, en caso de niños pequeños). De esta muestra de sangre obtendremos plasma, ADN y ARN para realizar múltiples análisis. Parte de la muestra se analizará inmediatamente y otra parte se almacenará para su estudio posterior. De esta última parte, una porción será enviada al Centre National du Genotypage (Paris, Francia) y otra al estudio europeo Euroclot (Saint Thomas' Hospital de Londres), con el que colaboramos para el estudio de los genes relacionados con la embolia cerebral.

También le realizaremos una encuesta clínica sobre su salud, dieta, medicaciones y hábitos como el consumo de tabaco, alcohol o tratamientos hormonales. Está usted en su derecho de no contestar a las preguntas que no crea convenientes. Así mismo le realizaremos algunas medidas importantes para el riesgo cardiovascular como peso, talla y perímetro abdominal. En total necesitaremos unos 5 minutos para la extracción de sangre y mediciones y unos 30 minutos para la entrevista clínica.

Es posible que transcurridos unos pocos años, le citemos de nuevo para realizar una segunda extracción de sangre y un seguimiento de su estado de salud.

Toda la información relativa a su persona (datos clínicos y resultados de los análisis) será estrictamente confidencial. Una vez obtengamos las muestras de sangre, les asignaremos un código numérico. Mantendremos los ficheros que relacionen su código con su nombre bajo medidas de seguridad y privacidad. Ni su nombre ni ningún dato que pueda señalarle aparecerán nunca en ninguna presentación o publicación de los resultados del estudio.

Este estudio no tiene prácticamente ningún riesgo físico para usted, excepto las mínimas molestias derivadas del pinchazo venoso para la extracción de sangre (breve y leve dolor, hematoma superficial y muy excepcionalmente infección cutánea). Tomaremos todas las precauciones para evitar la infección. Algunas personas pueden marearse durante la extracción de sangre, pero esto se corrige o evita cuando se recuesta al paciente.

El tipo de información que obtendremos en este estudio probablemente no dirá nada específico sobre su salud personal. La posibilidad que alguien ajeno a los investigadores hiciera un mal uso de sus resultados o datos personales es muy pequeña. Sin embargo, para proteger su información, ni su nombre ni su dirección se guardarán junto a las muestras.

Usted no recibirá ningún beneficio directo de los resultados del estudio. Pero tampoco debe pagar nada por la extracción de sangre, entrevista médica o análisis de laboratorio. Como compensación por el tiempo dedicado y las molestias causadas le gratificaremos con 60 €. En caso de cualquier problema de salud derivado de su participación en el estudio, nos comprometemos a proporcionarle toda la asistencia necesaria.

El objetivo final de nuestro estudio es mejorar la salud pública. A veces, este tipo de investigación puede resultar en hallazgos que tengan valor comercial, en cuyo caso se podrían derivar patentes o licencias de explotación. Si esto ocurriera, los beneficios pueden revertir en los investigadores o en las organizaciones responsables del estudio, pero usted no recibiría ningún ingreso.



Este estudio no está diseñado para valorar su estado personal de salud. Por esta razón, no le será entregado ningún resultado de los análisis de su muestra de sangre. Sin embargo, es posible que se le envíen comunicaciones con los resultados generales o hallazgos científicos importantes. También serán publicados los resultados en revistas médicas y científicas especializadas.

Al finalizar el estudio, nos gustaría mantener las muestras biológicas sobrantes para investigaciones futuras, a menos que usted nos indique lo contrario. Las muestras se mantendrán congeladas bajo el control de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. En todo caso, siempre un Comité Ético similar al que ha revisado este proyecto y protege sus derechos, revisará y aprobará cualquier proyecto científico futuro que se realice con su muestra.

¿Cuáles son mis derechos como participante?

Usted es libre de participar o no en el estudio. Si usted rehusa participar, mantiene completamente sus derechos asistenciales médicos y no sufrirá ningún tipo de reproche o castigo. Aunque decida participar en el estudio, usted podrá retirarse en cualquier momento y sus muestras de sangre serán destruidas y la información clínica eliminada de nuestras bases de datos. Usted puede elegir que las muestras sobrantes no sean usadas en futuras investigaciones y aún así seguir formando parte del presente estudio. Puede usted solicitar una copia de esta declaración de consentimiento para sus archivos.

¿A quien debo llamar si tengo preguntas o problemas relacionados con el estudio?

Para preguntas sobre el desarrollo del estudio, contactar con Dr Juan Carlos Souto, responsable clínico del estudio al teléfono 93 2919290 de 9 a 12 h.

Si usted tiene preocupaciones sobre sus derechos en el estudio contactar con Dr Jordi Fontcuberta, jefe de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, al teléfono 93 2919193.

CONSENTIMIENTO Y FIRMAS

Acepto participar en el estudio GAIT 2 y proporcionar una muestra de mi sangre. He tenido la oportunidad de realizar preguntas y obtener explicaciones satisfactorias relativas al estudio. Comprendo que los resultados individuales de mis análisis no me serán entregados. Se me ha ofrecido una copia de este documento de consentimiento.

He leído la parte relativa al almacenamiento de mis muestras para investigaciones futuras más allá del presente estudio. Mi elección al respecto es:

Rechazo que mis muestras se almacenen o usen para ningún tipo de investigación distinta a la actual.....

Acepto que mis muestras se almacenen y se codifiquen para investigaciones médicas futuras.....

Nombre..... **NIF**.....

Nombre del tutor o representante legal (en caso de menores o incapacitados)

..... **NIF**.....

Fecha.....

Firma.....

Testigo:

He observado el proceso de consentimiento. El participante ha leído el documento, ha tenido oportunidad de realizar preguntas, ha aceptado y comprendido las respuestas y ha firmado su inclusión en el estudio.

Nombre del testigo..... **NIF**.....

Fecha.....

Firma.....



COMPLEMENTARY CLINICAL DATA

A. Current medication _____

statins Y N **fibrates** Y N

B. Iron metabolism and anemia

Previous treatments with iron (Fe⁺⁺) Y N
 Previous gastrectomy Y N
 Bleeding history Y N Localization _____
 Antecedents de hereditary haemochromatosis Y N
 Antecedents of *anemia pernicious (A.P.)* Y N Family antecedents of A.P. Y N U
 Previous treatments with Vit B12 Y N
 Antecedents of chronic mieloproliferative syndrome Y N Type _____

C. Haematologic cancer

Personal antecedents Y N
 Type _____

D. Inflammatory diseases

Type _____

Medication _____

Current phase Chronic Acute

E. Autoimmune disease

Type _____ Y N

Core group: Type 1 diabetes, autoimmune thyroid disease (Hashimoto thyroiditis or Graves' disease), rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease (Ulcerative colitis or Crohn disease), SLE, multiple sclerosis, psoriasis, primary Sjögren syndrome

Other AD: Pernicious anemia, hemolytic anemia, idiopathic thrombocytopenic purpura, autoimmune neutropenia, antiphospholipid syndrome.

Vitiligo, scleroderma, alopecia areata, pemphigus, leiquien, mixed connective tissue disease, dermatomyositis.

Miastenia gravis, primary hypophysitis, suprarenal insufficiency.

Autoimmune glomerulonephritis.

Primary biliary cirrhosis, Celiac disease, autoimmune hepatitis.

Uveitis.

Sarcoidosis, interstitial disease, Churg-Strauss syndrome, Goodpasture syndrome.

Hypersensitivity diseases: Asthma, allergic rhinitis, atopic dermatitis.

F. Other associated diseases _____



OTHER LIFESTYLE VARIABLES

H. Physical activity (IPAQ)

1. During the last 7 days, on how many days did you do **vigorous** physical activities?
(at least 10 minutes at a time)_____

2. How much time did you usually spend doing **vigorous** physical activities on one of those days?
_____hours per day
_____minutes per day

3. During the last 7 days, on how many days did you do **moderate** physical activities? Do not include walking.
(at least 10 minutes at a time)_____

4. How much time did you usually spend doing **moderate** physical activities on one of those days?
_____hours per day
_____minutes per day

5. During the last 7 days, on how many days did you **walk** for at least 10 minutes at a time?_____

6. How much time did you usually spend **walking** on one of those days?
_____hours per day
_____minutes per day

7. During the last 7 days, how much time did you usually spend **sitting** on a **week day**?
_____hours per day
_____minutes per day

Categorical score: Inactive Minimally active HEPA active

Continuous score: expressed as MET-min per week
(MET level x minutes of activity x events per week)_____



ANEXO 5: HOJA DE RECOGIDA

CUESTIONARIO PARA IDENTIFICAR TROMBOEMBOLISMO VENOSO PREVIO

Adaptado de:

Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated Questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. Am J Epidemiol 1996;143:1257-65.

DESCRIPCIÓN DE UNA TROMBOSIS VENOSA

La trombosis ocurre más frecuentemente en las venas de las piernas. Su presentación es distinta según afecte a las venas profundas (dentro de los músculos) o a las superficiales (debajo de la piel):

- En la **trombosis venosa profunda** hay hinchazón del muslo o la pierna y la piel se pone enrojecida, caliente y como pastosa. Suele doler toda la extremidad (a diferencia del dolor localizado cuando hay una artrosis o un golpe); la extremidad suele estar tensa y es difícil de mover. Las venas superficiales pueden verse aumentadas de tamaño y, a veces, hay fiebre. Todos estos síntomas aparecen de pronto y duran varios días. Son más o menos intensos dependiendo del tamaño y el sitio de la vena obstruida.
- En la **tromboflebitis superficial**, se nota como un cordón duro y doloroso a lo largo de la vena afectada. La piel que la rodea está enrojecida y caliente.

PREGUNTA 1:

De las descripciones propuestas, ¿cree Ud. que alguna vez le ha pasado este tipo de problema?

TVP	SI	NO
TFS	SI	NO

PREGUNTA 2:

La trombosis venosa puede causar otra enfermedad: algunos fragmentos del trombo se pueden separar e ir a parar al pulmón: Esto es la **embolia de pulmón**.

¿Le han ingresado alguna vez en un Hospital por una embolia de pulmón? SI NO

PREGUNTA 3:

Incluso si las respuestas son negativas a las preguntas 1 y 2, ¿recuerda Ud. Si algún médico le ha diagnosticado nunca una de las siguientes enfermedades?:

a) trombosis, flebitis o tromboflebitis		
- de las venas de las piernas	SI	NO
- de otras venas (brazos, cuello, hígado...)	SI	NO
b) embolia de pulmón	SI	NO
c) síndrome postflebítico	SI	NO

PREGUNTA 4:

¿Recuerda Ud. si alguna vez le han dado tratamiento con inyecciones subcutáneas en abdomen o en los brazos, para hacer su sangre más fluida? SI NO

PREGUNTA 5:

¿Recuerda Ud. Si alguna vez ha tomado pastillas para hacer su sangre más fluida y que necesitaba análisis periódicos (cada 15-30 días) para dosificar el número de pastillas? SI NO

Se considera caso de tromboembolismo si:

Alguna de las 3 primeras es SI Y alguna de las 2 últimas es SI

En caso contrario, se descarta el antecedente de tromboembolismo

Con estas 5 preguntas se consigue una eficiencia diagnóstica (porcentaje de sujetos correctamente clasificados) del 98.2%.





ANEXO 6: CUESTIONARIO PARA IDENTIFICAR EPISODIOS DE TROMBOSIS VENOSA PREVIA

CRITERIOS PARA IDENTIFICAR EPISODIOS DE IAM, AVC Y AIT o TROMBOSIS ARTERIAL PERIFÉRICA

1. Infarto agudo de miocardio (IAM) y angor

Según informes clínicos de ingreso hospitalario. Los criterios diagnósticos se basarán en la sintomatología típica, registro ECG, elevación de enzimas cardíacos o datos de necropsia.

2. Accidente vascular cerebral (AVC) isquémico

- Según informes clínicos de ingreso hospitalario.
- Mediante cualquier informe de infarto cerebral de diagnóstico por la imagen (TAC, RMN, arteriografía, angio TAC, angio RMN, doppler de troncos supraaórticos...)
- En ausencia de informes neurológicos, el diagnóstico se basará en la presentación clínica: signos o síntomas clínicos focales, de inicio agudo, con pérdida de función neurológica durante más de 24 horas y sin ninguna otra causa aparente distinta a un origen vascular. Según criterios del Proyecto MONICA (*Asplund K et al. Diagnostic criteria and quality control of the registration of stroke events in the MONICA Project. Acta Med Scand 1988;728 suppl:26-39*). Los signos focales aceptados como definitorios de AVC isquémico son (WHO MONICA Project. *MONICA Manual, Part IV*: en <http://www.ktl.fi/publications/monica/manual/part4/iv-2.htm>):
 - Déficit motor unilateral o bilateral (incluyendo descoordinación)
 - Déficit sensitivo unilateral o bilateral
 - Afasia / disfasia (lenguaje no fluido)
 - Hemianopsia
 - Diplopia
 - Desviación conjugada de la mirada
 - Disfagia de inicio agudo
 - Apraxia de inicio agudo
 - Ataxia de inicio agudo
 - Déficit de la percepción de inicio agudo
- No se aceptarán como evidencia única de déficit focal, los siguientes síntomas/signos:
 - Mareo, vértigo
 - Cefalea localizada
 - Visión borrosa de ambos ojos
 - Disartria o lenguaje poco claro
 - Deterioro de función cognitiva (incluyendo confusión)
 - Deterioro de conciencia
 - Convulsiones
- Se descartarán otras causas de ictus no isquémico como hemorragia subaracnoidea, hemorragia intracerebral o infarto cerebral por trombosis de senos venosos.
- Se registrarán de modo diferenciado los AVC isquémicos de origen cardioembólico.

3. Accidente isquémico transitorio (AIT)

- Según informe clínico de un especialista
- Si el paciente refiere episodios agudos de déficit focal encefálico o retiniano (ver signos focales definitorios arriba) con una duración inferior a 24 horas, habitualmente menos de 1 hora.

4. Trombosis arterial periférica

Según informes clínicos de ingreso hospitalario o cirugía vascular. Distinguir origen cardioembólico.





ANEXO 7: CRITERIOS PARA IDENTIFICAR EPISODIOS DE IAM, AVC, AIT Y TROMBOSIS ARTERIAL PERIFÉRICA

GAIT 2

UP-DATING OF RELATED CLINICAL EVENTS QUESTIONNAIRE

I. Identification Date of up-dating / /

GAIT 2 code / / (Family number/ generation/ position)

N Clinical Record _____

Name _____

II. Event

II. 1 Venous thromboembolism Date _____

Type (DVT, PE, STP, visceral, cerebral)

Localization

Age

Diagnostic method

Spontaneous Y N

Associated risk condition (surgery, hospitalization, bed rest, traumatism, plaster cast, pregnancy, active cancer, other)

II. 2 Arterial thromboembolism Date _____

Type (MI, angina, ischemic stroke, TIA, periferal artery)

Age

Diagnostic method

Associated risk factors (smoking, lipid disease, arterial hypertension, diabetes; obesity)

II. 3 Inflammatory or autoimmune disease Date _____

Type _____

Age

Objective diagnosis Y N

II. 4 Death Date _____

Cause:

- Advanced age
- Thromboembolic disease (arterial o venous) See II. 1 o II. 2
- Cancer Type _____
- Traumatic death
- Infectious disease
- Surgical complication (not thromboembolic)
- Disease of the liver, lung, digestive system or kidney
- Non coronary heart disease
- Disease of the central nervous system (except ischemic stroke)
- Autoimmune disease See II. 3
- Inflammatory disease See II. 3
- Other Especify _____
- Unknown





6. Circunstancias clínicas (por defecto deben ser todas NO)

Embarazo	S	N
Hepatopatía crónica	S	N
Proceso infeccioso/inflamatorio en el último mes	S	N
Tromboembolismo en los últimos 3 meses	S	N
Fase aguda	S	N
Enteropatía	S	N
Síndrome nefrótico	S	N
Otras relevantes		
Definir _____		

7. Problemas con los tubos

Hemólisis
Coagulado
.....



ANEXO 9: CIRCUNSTANCIAS ASOCIADAS A LA EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

CONSEJOS PARA EL DIA DEL ESTUDIO GAIT-2

Previamente, y al menos 1 mes antes al día del estudio:

Cada uno de los familiares participantes debería proporcionar la siguiente información para poder preparar toda la documentación:

- Nombre.
- Fecha de nacimiento.
- Tarjeta sanitaria o número de la Seguridad Social (si lo tienen)
- Dirección y teléfono.
- Composición de su domicilio (familiares con quienes convive)
- Familiares con quienes comparte la mayor parte de su dieta (Ver definición en página siguiente).
- Toda la medicación habitual que toma.

El día del estudio:

El individuo no habrá tenido ningún episodio tromboembólico en los últimos 3 meses. (trombosis venosa, tromboflebitis, embolia de pulmón, infarto de miocardio, angina de pecho, embolia cerebral, embolia de extremidades)

Tampoco habrá presentado ningún proceso inflamatorio agudo en el último mes (neumonía, gripe, catarro, rinitis, sinusitis, meningitis, apendicitis, gastroenteritis, brote de colitis ulcerosa o de enfermedad de Crohn, colecistitis, infección de orina, artritis, ataque de gota, etc...)

Además, habrá debido suspender previamente las siguientes medicaciones:

- Al menos **15 días**, los anticoagulantes orales: (**Sintrom**, **Aldocumar**). Necesita una pauta de heparina.
- Al menos **24 horas** las heparinas (**Clexane**, **Hibor**, **Innohep**, **Fraxiparina**, **Fragmin**, **Arixtra**)
- Si es posible, al menos **15 días** los antiagregantes plaquetares: **Aspirina**, **Adiro**, **Tromalyt**, **Plavix**, **Iscover**, **Tiklid**, **Persantin**, **Disgren**, **Ageroplas**, **Anpeval**, **Bioplak**.
- Si es posible, **un mes** los **hipolipemiantes** tipo estatinas y **2 meses** los del tipo fibrato:

Estatinas: Arudel, Belmalip, Bristacol, **Cardyl**, Digaril, Glutasey, Histop, Lescol, **Lipemol**, **Liplat**, Lipociden, Liposcler, Lymetel, **Mevacor**, **Pantok**, Prareduct, **Pravastatina** Ratiopharm, **Prevencor**, Pritadol, **Symvastatina** (Bayvit, Davur, Normon o Ratiopharm), Vaditon, **Zarator**, **Zocor**.

Tipo fibrato: **Eulitop**, **Secalip**, Trialmin, Dexide, Efensol, Resincolesteramina, Ezetrol, Rebakol.

- Si es posible, al menos **15 días** los antiinflamatorios no esteroideos: (**Airtal**, Artrotec, Dolo-Nervobion, **Dolotren**, Dolo-Voltaren, Droal, Falcol, Fiacin, Flogoter, Normulen, Prodamox, Toradol, **Voltaren**, Acabel, Cycladol, Improntal, Movalis, Parocin, Reutenox, Advil, Aleve, Algiasdin, Algidrin, Alogesia, Antalgin, Atriscal, **Dalsy**, Dolbufen, Dolorac, Enantyum, **Espidifen**, Gelofeno, Ibumac, **Ibuprofeno**, Ibuprox, Ketesse, Momen, **Naprosyn**, **Neobrufen**, Norvectan, Saetil, Seracil, **Celebrex**, **Ceoxx**, Dynastat, **Vioxx**, Arava, Cartisorb, Condro-San, Condrosulf, Galaxdar, Glizolan, Hespercorbin, Thiomucase, Xicil, Robervital, Miocrin, Cupripen.
- Si es posible, al menos **1 mes** los antiinflamatorios de tipo esteroideo: Corticoides: **Actocortina**, **Dacortin**, Dezacor, Estilsona, **Fortecortin**, **Zamene**.



Otros datos de interés

Ayunas: Los familiares vendrán en ayunas de 12h

Mediciones: Peso, estatura y circunferencia de cintura.

El peso y la estatura se medirán descalzos. Se recomienda vestir ropa ligera para poder medir con una cinta métrica la circunferencia de la cintura y la cadera.

Informes médicos: Es muy importante que el familiar nos traiga cualquier informe médico (por ejemplo de un ingreso en el hospital) de las enfermedades que padece o ha padecido. Sobre todo se necesitan los informes de enfermedades relacionadas con las trombosis o los infartos de miocardio y cerebrales.

También necesitamos conocer todas las **medicaciones** que toma actualmente.

Necesitamos saber también el **número** de veces que ha sido operado, ha ingresado en un hospital, ha estado enfermo en cama durante más de 1 semana o ha sido escayolado por fracturas. En las mujeres, el número total de embarazos y la fecha en que se inició la última regla.

Comparten dieta todos aquellos familiares que comen regularmente lo mismo al menos dos de las tres comidas diarias principales (desayuno, almuerzo o cena)

Firma del documento de consentimiento: El representante y coordinador de la familia dispone de copias para aquellos que las quieran leer previamente. También existe un documento de información.

Lugar: Laboratorio de Hematología (pabellón nº 7) Hospital de Sant Pau, con cita programada.

Para cualquier duda llamar al teléfono 93-2919290 de 9 a 12 h. Preguntar por el Sr. Luís Alegría.



ANEXO 10: CONSEJOS PARA EL DÍA DEL ESTUDIO GAIT-2

Grupos de Investigación colaboradores en el proyecto GAIT 2

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona:

1. Unitat d'Hemostàsia i Trombosi. Dr Jordi Fontcuberta
2. Bioquímica. Drs. Francisco Blanco-Vaca y Jordi Ordoñez.
3. Eritropatología. Dr. Angel Remacha
4. Laboratorio de Inflamación. Dr. Lluís Vila y Dra. Mercedes Camacho.
5. Citometría de Flujo. Dr. Josep Nomdedeu
6. Servei de Medicina Interna. Dr. Jordi Casademont
7. Endocrinología. Dr. Antonio Pérez
8. Servei d'Extraccions. María Murugó

Otros centros españoles:

1. CSIC. Madrid. Dr Santiago Rodriguez de Córdoba
2. Departament de Biologia Evolutiva. Universitat Pompeu Fabra, Barcelona: Dr Jaume Bertranpetit.
3. Laboratorio de eritropatología (Dr. Vives Corrons). Hospital Clínic de Barcelona
4. CBTEG. Universitat Autònoma de Barcelona. Dr. Miguel Chillón
5. Departament de Biologia Animal: Universitat de Barcelona. Dr. Pedro Moral

Centros extranjeros:

1. Southwest Foundation for Biomedical Research. San Antonio (Texas). Dr John Blangero y Dr Laura Almasy.
2. Centre National de Genotypage. Evry. París. Dr Mark Lathrop.
3. Proyecto **EUROCLOT** (Genetic regulation of the end-stage clotting process that leads to thrombotic stroke). Participantes:
Centro coordinador: Twin Research & Genetic Epidemiology Unit del St Thomas' Hospital. Londres. Dr. Tim Spector
Otros países: Finlandia (University of Helsinki), Dinamarca (University of Southern Denmark), Italia (National Center of Epidemiology), Holanda (Leiden University Medical Centre), Suecia (Karolinska Institute) y Reino Unido (Queen's University de Belfast, Leeds General Infirmary, St George's Hospital, España (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau).
4. Proyecto **PROCARDIS** (Genome wide strategy to identify susceptibility loci in precocious CAD). Participantes:
Centro coordinador: Clinical Trial Service Unit (CTSU) de la Oxford University. Dr Hugh Watkins
Karolinska Institut. (Estocolmo). Dr. Anders Hamsten.
Wellcome Trust Centre for Human Genetics. Oxford.
Münster University.
Instituto Mario Negri. Milán.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.
5. Department of Pathology and Laboratory Medicine. Emory University School of Medicine. Atlanta. Dr. Tom E. Howard



Protocolo de extracción de la muestra sanguínea

Tipos de tubos:

Los tubos de citrato, EDTA, heparina y suero son los regulares.

Uno de los EDTA (de 10 mL) va en frío (para homocisteína)

Los tubos con glutaraldehído los prepara y calienta a 37°C el equipo de Hemostasia.

Los tubos de PAXgene, para obtención de ARN, los suministra el equipo de Hemostasia.

Tipos de extracción:

Hay 2 posibles extracciones:

1. Preferente de unos 87 mL de sangre en total, repartidos en 16 tubos.
2. Alternativa de unos 47 mL de sangre total, en 10 tubos (para niños pequeños o accesos venosos muy difíciles).

La extracción se efectuará en decúbito.

El sistema informático emitirá **19** etiquetas con código de barras y N° de laboratorio y una etiqueta para la extensión en porta. (Sobrarán una de EDTA y 2 de suero)

Orden de la extracción:

Preferente

1. Glutaraldehído (2)
2. Heparina (1 tubo de 10 mL)
3. PAXgene (2)
4. Citratos (7)
5. EDTA 3 mL
6. EDTA frío de 10 mL
7. Suero (2)
8. Extensión en porta

Alternativa

1. Glutaraldehído (2)
2. Heparina (1 tubo de 5 mL)
3. PAXgene (1)
4. Citratos (4)
5. EDTA 3 mL
6. EDTA frío de 5 mL
7. Suero (1)
8. Extensión en porta

Circuito de los tubos extraídos:

Siguen el circuito de rutina: un tubo de suero y el EDTA frío.

Los técnicos de Hemostasia distribuyen: el otro suero, los citratos, heparina, EDTA a temperatura ambiente, los tubos de glutaraldehído y PAXgene y la extensión.

Información complementaria:

- El extractor valorará si la extracción ha sido dificultosa y el motivo: muy larga (lenta), traumática, con lipotimia (leve o intensa)
- Personal de Extracciones efectuará las medidas antropométricas (peso, estatura y circunferencia de cintura)
- Personal de Hemostasia y Extracciones rellenará la Hoja de "Circunstancias asociadas a la obtención de la muestra".



ANEXO 12: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

Fases del reclutamiento

Previa.

Búsqueda y preselección familias candidatas

- *Propositus* con trombofilia venosa idiopática (pag. 6 protocolo)
- Al menos un episodio espontáneo.
- Familia extensa, colaboradora y con disponibilidad geográfica.

FASE 1.

Cita por el secretario. Agenda de estudios familiares Dr. Souto.

Contacto con el *propositus*. Se convocan otros familiares (opcional)

Se confirma la condición de familia candidata.

Propuesta formal de participar en GAIT 2.

Esbozo del árbol familiar completo (incluye fallecidos y no fenotipables)

Compensación económica prevista.

Tomar nota de los familiares asistentes y modo de contacto (teléfonos)

Fijar fecha de próximo contacto.

Material

Entregamos material marketing (Dossier para *propositus*):

- Anexo 2 protocolo: "Argumentos para otorgar el consentimiento informado"
- Anexo 3 protocolo: "Documento de consentimiento informado"
- Anexo 9 protocolo: "Consejos para el día del estudio GAIT-2."
- Noticias de prensa
- Artículos científicos publicados en GAIT-1 (fotocopia de 1ª página)

FASE 2.

Aceptación de la familia (con visita o por contacto telefónico). Se produce durante las semanas siguientes a fase 1.

Tras esta aceptación, se deja claro a la familia que el inicio del reclutamiento efectivo se decidirá en función de algunas prioridades: tamaño familia, concurrencia con otro protocolo (ELFO), disponibilidad exacta de los miembros, etc... El estudio se puede realizar a lo largo de los 3-4 años próximos (2006-2009)

FASE 3.

Se convoca 2 meses antes de la fecha prevista para incluir a los primeros familiares.

Es la fase que empieza con una **reunión clave** (quizás de varias horas) con cuantos miembros de la familia quieran asistir. Esenciales son el *propositus* y los familiares más colaboradores. Durante la fase, que dura dos meses (desde reunión clave hasta análisis del primer familiar), se empieza a recoger información de todos los miembros y se dan las indicaciones (parar medicaciones, etc.) para el día de la extracción.

Reunión clave

Cita por el secretario. Agenda de estudios familiares Dr. Souto.

Se ultima el árbol familiar y se numera correlativamente (no códigos GAIT definitivos).

Al gráfico resultante se le llamará "Pedigree beta"

Se adjudica número de familia GAIT 2.

Material

Entregamos:

- Copia del gráfico "Pedigree beta" con numeración correlativa

- Ejemplos de consentimiento informado (anexo 3 del protocolo)
- DOC Consejos para el día del estudio (anexo 9 del protocolo)
- DOC para registrar la información individual previa (datos demográficos, administrativos, medicaciones y situaciones vividas de riesgo trombótico) **
- Indicaciones mecanismo de remuneración económica.

**Solicitamos a la familia la siguiente información. Marcamos el plazo de 1 mes para obtenerla:

- Composición *household*
- Composición dietas compartidas
- Para cada miembro que vendrá (fenotipado):
 - o Nombre
 - o Apellidos
 - o Fecha nacimiento
 - o Número tarjeta sanitaria
 - o Teléfonos
 - o Dirección
 - o Medicación que toma
 - o Informes clínicos (o que los traigan a la visita)
- Para los miembros que no vendrán:
 - o Nombre
 - o Apellidos
 - o Fecha nacimiento
 - o Exitus : Fecha muerte y causa
 - o Antecedentes de:
 - Trombosis venosa
 - Trombosis arterial
 - Enfermedad inflamatoria y/o autoinmune
 - Cáncer

Introducimos familia en Cyrillic (ver doc. "Workflow introducción familias")

FASE 4.

Confección calendario de reclutamiento individual

Citaciones individuales (1 mes antes)

Días previos a la cita → Recordatorio y chequeo (viernes anterior)

- Ausencia de trombosis en los últimos 3 meses
- Ausencia proceso inflamatorio agudo en el último mes
- Medicación suspendida
- Que venga en ayunas de 12 h

FASE 5.

Firma consentimiento + entrevista + extracción + mediciones antropométricas + "Hoja de circunstancias asociadas a la muestra".

Se citarán 4 individuos por día (martes y miércoles, total 8 por semana)

Lunes previo:

- Numero historia Hospital de Sant Pau.
- Numero laboratorio
- Preparación consentimientos informados, con copia para los interesados.
- Edición de etiquetas. Etiquetado de las alicuotas.
- Preparación hoja de "Circunstancias asociadas a la muestra". Anexo 8.

ANEXO 13: FASES DEL RECLUTAMIENTO DE FAMILIAS

Procedimiento para el envío de muestras a otros Centros colaboradores

Tipos de muestra biológica, con código, susceptibles de envío a otros Centros

- Suero	SER
- Suero (congelado 3 días post)	SER*
- Plasma citratado:	CIT
- Plasma en EDTA	EDT
- Plasma en EDTA frío:	EDT f
- Plasma en heparina basal:	HEP
- Plasma en heparina post ionóforo	HEP ion
- Plasma en heparina post LPS	HEP Ips
- ADN	DNA
- ARN basal	ARN
- ARN pre LPS	ARN pre
- ARN post LPS	ARN Ips
- Ultraestructura plaquetar bloque	UP-blo
- Ultraestructura plaquetar rejilla	UP-grid
- Ultraestructura plaquetar fotos	UP-photo
- Botón celular eritrocitos	Eritro

En cualquier envío realizado se registrará informáticamente:

- Nº consecutivo de envío de cada Nº de laboratorio (1, 2, 3...)
- Fecha de envío
- Destino (Ej: EUROCLLOT, Dr Vives-Corróns, CSIC Madrid, UPF...)
- Código o tipo de la muestra
- Cantidad (Ej: Volumen, Nº de alicuotas, Nº de rejillas...)





UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona