



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Nuevos Mecanismos Implicados en la Regulación
de los Niveles de Antitrombina**

D^a Mara Toderici

2018



**UNIVERSIDAD
DE MURCIA**
DEPARTAMENTO
DE MEDICINA INTERNA
Facultad de Medicina

D. **Javier Corral de la Calle**, Profesor y Doctor de la Universidad de Murcia del Área de Hematología en el Departamento de Medicina Interna y D^a. **M^a Eugenia de la Morena Barrio**, Doctora en Medicina Interna e Investigadora en la Universidad de Murcia,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Nuevos Mecanismos Implicados en la Regulación de los Niveles de Antitrombina**”, realizada por D^a. **Mara Toderici** bajo su inmediata dirección y supervisión, y que se presenta para la obtención del grado de Doctor con Mención Internacional por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de Septiembre de 2018

Fdo: Dr. Javier Corral de la Calle

Fdo: Dra. M^a Eugenia de la Morena Barrio

·A ti, por todo lo que ya sabes qué. Pues eso.

RESUMEN

La inhibición de un gran número de serín proteasas procoagulantes que realiza la antitrombina, junto con su eficaz mecanismo, la convierte en el principal anticoagulante endógeno. Debido a ello, la reducción, incluso moderada, de la actividad anticoagulante de la antitrombina incrementa de manera significativa el riesgo trombótico y su deficiencia completa causa letalidad embrionaria.

El análisis de casos con deficiencia de antitrombina ha permitido identificar alteraciones genéticas que afectan los niveles o la función de este anticoagulante. Estos estudios también han contribuido a conocer dominios funcionales y estructurales, y han permitido el desarrollo de terapias anticoagulantes. Sin embargo, son escasos los estudios que hayan evaluado elementos reguladores de los niveles de antitrombina o responsables de la variabilidad de formas de antitrombina detectadas en plasma. Aún se desconoce, por ejemplo, la localización del promotor del propio gen, así como elementos potenciadores o silenciadores de la transcripción del mismo y se piensa que todas las variantes genéticas ocasionan una sola variante proteica.

Empleando tres estrategias diferentes, y aplicando diferente metodología (molecular, bioquímica, funcional) en distintos modelos (pacientes, sistemas celulares y modelos animales), este proyecto doctoral ha buscado aportar nueva información sobre esta molécula.

En primer lugar, estudiamos 30 pacientes con deficiencia de antitrombina que sin embargo no presentaban alteraciones en las regiones codificantes de *SERPINC1* ni en genes implicados en la ruta de la N-glicosilación. Cuatro de estos pacientes presentaban alteraciones que afectaban 2 de las 6 secuencias VDRE identificadas en el gen. Estudios de validación familiar y en 307 sujetos sanos confirmaron el efecto funcional para las tres alteraciones donde estos estudios pudieron realizarse, y demostraron que estas modificaciones reducen ligera, pero significativamente, los niveles de antitrombina en plasma. Este apartado se complementó con la demostración en un modelo celular (HepG2) del efecto positivo y dependiente de dosis, que la vitamina D tiene sobre los niveles de ARNm y proteína sintetizada y secretada.

En un segundo capítulo, analizamos 3 pacientes incluidos en un programa de trasplante hepático por atresia biliar que sorprendentemente presentaban niveles inusualmente elevados de antitrombina (150-190%). Tras comprobar que el incremento no era ningún artefacto y se correspondía con un aumento específico de la proteína circulante, analizamos los posibles elementos implicados en el aumento específico de antitrombina. Como en estos pacientes se acumulan sales biliares, y dado que éstas pueden ejercer una función reguladora transcripcional, analizamos en un modelo celular las consecuencias transcripcionales de 4 de ellas (CA, CDCA, UDCA y LCA). El CDCA incrementaba significativamente y de forma dosis dependiente los niveles de ARNm de *SERPINC1*. Este efecto se validó en dos modelos murinos, ratones silvestres y ratones con deficiencia heterocigota de antitrombina. En el modelo empleando ratones deficientes en antitrombina, la administración de 25 mg/kg de CDCA aumentaba los niveles de ARNm y proteína plasmática a valores similares a los encontrados en ratones silvestres, mostrando las posibilidades terapéuticas de estos elementos reguladores.

Finalmente realizamos un profundo estudio de la mutación p.Arg393Cys, previamente descrita en casos con deficiencia de antitrombina tipo II con defecto del centro

reactivo. Efectivamente, la mutación del residuo P1 de la antitrombina (Cys393) provoca una pérdida de función. Pero sorprendentemente, el estudio de la antitrombina plasmática de estos pacientes, empleando diferentes condiciones electroforéticas, permitió comprobar que la mutación generaba dos tipos de formas variantes: una que interacciona mediante puentes disulfuro con la albúmina y una forma variante monomérica. El calentamiento del plasma de portadores a temperaturas ligeramente moderadas (40°C durante 24h) provocaba la transición de la forma monomérica a la dimérica, pero como esta interacción se producía en el plasma, no podía llevar implícito la formación de un puente disulfuro, como comprobamos tras la purificación de los complejos del plasma y su análisis posterior. De esta forma, mostramos que una misma alteración genética puede generar heterogeneidad de formas variantes. Finalmente, especulamos sobre el posible papel, que el balance de estas formas pudiera tener, en el desarrollo de eventos trombóticos.

En conclusión, nuestro estudio muestra nuevos elementos implicados en el control de los niveles y plegamiento del anticoagulante endógeno más importante. Alteraciones en los elementos de regulación del gen *SERPINC1*, como el eje RXR/VDR descrito en este estudio; cambios en las concentraciones de factores que regulen al gen como los ácidos biliares; y condiciones externas que puedan modificar el balance de formas diferentes de antitrombinas variantes, pueden afectar a los niveles o función de la antitrombina. Estos resultados tienen relevancia en la caracterización molecular de la deficiencia de antitrombina, en la identificación de factores con importancia pronóstica, y pueden tener aplicaciones terapéuticas.

ABSTRACT

The essential role of antithrombin as a crucial endogenous anticoagulant is defined by the large number of procoagulant proteases that this serpin inhibits by a strong and efficient mechanism, and by the dramatic consequences of its deficiency. We know that even moderate deficiency of antithrombin significantly increases the risk of thrombosis and homozygous deficiency is lethal.

The analysis of patients with deficiency of antithrombin has helped to identify defects in *SERPINC1*, the coding gene, which affect the levels or function of this key anticoagulant. These studies have also assisted to characterize functional or structural domains and they have allowed the development of anticoagulant therapies. However, it surprises the few studies evaluating other elements playing a role in the regulatory mechanism of such a crucial molecule. Additionally, only few studies have evaluated patients or states with high antithrombin levels. Unfortunately, the promoter region of this gene is largely not known and few studies have identified regions potentially involved in the transcriptional regulation of this gene. Finally, there are few examples of a variability of antithrombin variants caused by a single mutation and the pathological consequences of such variability.

In this thesis, we tried to discover new information concerning potential regulatory mechanisms of antithrombin. This was achieved by using variable methodology (molecular, biochemical, functional) in different models (patients, cell lines and animal). The analysis of potential regulatory regions of *SERPINC1* in patients with antithrombin deficiency but without known genetic defects is an excellent strategy to identify new regulatory elements of *SERPINC1* and mechanisms involved in the regulation of antithrombin. Moreover, this approach may potentially reveal new thrombotic risk factors.

First of all, we have addressed this issue through the study of a cohort of 30 patients with moderate or severe deficiency of antithrombin without mutation in the coding region of the *SERPINC1* gene. Four of these patients carried regulatory mutations. These mutations disrupt two out of six potential vitamin D receptor elements (VDRE) identified in *SERPINC1*. The functional effects of these gene variations were validated by family studies as well by their analysis in a control cohort of 307 Spanish Caucasian healthy blood donors. The relevance of the vitamin D pathway on the regulation of *SERPINC1* was confirmed in a cell model. The treatment of HepG2 with the vitamin D analog, paricalcitol, increased the levels of expression of *SERPINC1* mRNA dose dependently. The increased transcriptional rate paralleled with augmented levels of antithrombin secreted to the conditioned medium.

In the second chapter, we have studied three unrelated patients included on the waiting list for liver transplantation due to hepatic damage caused by biliary atresia and reported to our laboratory because of abnormally higher antithrombin levels (anti-FXa: 150-190%). We confirmed these abnormal levels by different methods, functional and different immunological approaches, discarding any potential artifact. Interestingly, all the three patients shared the same disorder underlying the hepatopathy, biliary atresia, and they received ursodeoxycholic acid therapy, a nonhepatotoxic bile salt. We speculated that the accumulation of bile salts in liver of these patients might play a role in the abnormally high levels of antithrombin identified. Bile salts are also potent regulators of gene transcription. Accordingly, we tested in a cell model the effects of four bile salts (CDCA, CA, LCA, UDCA) on *SERPINC1*. Only CDCA significantly increased the levels of

SERPINC1 transcripts. To prove the hypothesis that bile salts could play a potential role in the antithrombin level we evaluated this modulator on two animal models (wild type and *serpinc1*^{+/-} deficient). The results observed, strongly support that CDCA at a dose of 25 mg/Kg increases two fold the expression of this gene also in vivo. Actually, this effect is able to normalize the levels of RNAm levels of this gene in mice with heterozygous antithrombin deficiency.

Finally, we made a deep analysis of the *SERPINC1* p.Arg393Cys mutation, which has been previously reported as an antithrombin deficiency type II RCL. In fact, this mutation, by affecting the P1 residue of the reactive center loop causes a loss-of-function. Surprisingly, analysis of plasma antithrombin of carriers by native-PAGE revealed two different variants: one forming a dimer with albumin interacting by disulphide bonds and another monomeric variant. Interestingly, moderate heating of plasma samples (40 °C for 24h) induced the transformation of the monomeric variant into a dimer form. As disulphide linkage takes place intracellularly, the complex generated in these conditions is not linked by disulphide bonds, as we demonstrated by analysis of the complexes purified by chromatography. Thus, our study demonstrates that the same mutation produces different variants whose levels may change according to the environmental conditions. We speculate that transformation to the dimer variant might have deleterious consequences and might increase the risk of thrombosis.

In conclusion, our study shows new agents involved in the control of levels and folding of the most important endogenous anticoagulant. Changes in regulatory elements of *SERPINC1* gene: the RXR/VDR described before, different concentration in factors that modulate the gene as bile salts; as well as external conditions able to disturb the balance of types of antithrombin variants, could affect the levels and function of antithrombin. The results obtained in this thesis may help to achieve a better molecular characterization of antithrombin deficiency, may be useful to define the prognosis, and could also have potential therapeutic application, growing the antithrombotic arsenal.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema hemostático y riesgo trombótico

1.2 Antitrombina

1.2.1 Características estructurales y funcionales

1.2.2 Deficiencia de antitrombina

1.2.3 Mecanismos patogénicos de la deficiencia de antitrombina en mutantes que afectan al residuo P1

1.2.4 Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de antitrombina

1.2.5 Aspectos genéticos y elementos reguladores

1.3 Vitamina D

1.3.1 Descubrimiento de la vitamina D

1.3.2 Estructura y metabolismo de la vitamina D

1.3.3 Acciones genómicas y no genómicas de la vitamina D

1.3.4 Estructura del receptor de la vitamina D

1.4 Ácidos biliares

1.4.1 Aspectos generales de los ácidos biliares

1.4.2 Estructura de los ácidos biliares

1.4.3 Biosíntesis de los ácidos biliares

1.4.4 Conjugación de los ácidos biliares

1.4.5 Papel fisiológico y enfermedades por acumulación de ácidos biliares

1.4.6 Ácidos biliares como moduladores genéticos

1.5 Receptores nucleares

1.5.1 Aspectos generales y mecanismo de acción de los receptores nucleares

1.5.2 Vías de señalización genómica de los RNs

1.5.3 Vías de señalización no genómica de los RNs

1.5.4 Receptores glucocorticoides

1.5.5 Receptores FXR

1.5.6 Receptores de hormonas tiroideas

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

2.2 Objetivos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y Controles

3.2 Extracción y preparación de las muestras de sangre

3.3 Métodos Bioquímicos

3.3.1 Estudio de los niveles de antitrombina

3.4 Métodos Moleculares

- 3.4.1 Determinación de otras trombofilias
- 3.4.2 Estudios de grandes deleciones o inserciones en las regiones codificantes del gen *SERPINC1* mediante *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)
- 3.4.3 Amplificación de los exones del gen *SERPINC1*
- 3.4.4 Electroforesis en geles de agarosa
- 3.4.5 Purificación del producto de PCR
- 3.4.6 Reacción de secuenciación
- 3.4.7 Electroforesis capilar automática
- 3.4.8 Genotipado mediante electroforesis capilar de la inserción *IVS1+1179insTTGA* del gen *SERPINC1*
- 3.4.9 Genotipado del polimorfismo rs146692719 del intrón 1 del gen *SERPINC1*
- 3.4.10 Búsqueda *in silico* de secuencias VDRE en el gen *SERPINC1*
- 3.4.11 Genotipado de polimorfismos funcionales en *VDR*
- 3.4.12 Análisis de haplotipos
- 3.4.13 Secuenciación del gen *VDR*
- 3.4.14 Extracción de ARN
- 3.4.15 Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR
- 3.4.16 Análisis de antitrombina mediante Western Blot
- 3.4.17 Predicciones *in silico* y modelado estructural de la variante de antitrombina

3.5 Métodos experimentales

- 3.5.1 Agentes moduladores de la expresión de *SERPINC1*
- 3.5.2 Cultivos celulares
- 3.5.3 Modelos animales
- 3.5.4 Evaluación de factores ambientales y suplementación con albúmina

3.6 Purificación de antitrombina

3.7 Análisis estadístico

4. RESULTADOS

4.1 Vitamina D y antitrombina

- 4.1.1 Identificación de secuencias VDRE en *SERPINC1*
- 4.1.2 Búsqueda de nuevas alteraciones en regiones reguladoras del gen *SERPINC1* asociadas con deficiencia de antitrombina
- 4.1.3 Secuenciación del gen *VDR*
- 4.1.4 Genotipado de los polimorfismos funcionales del gen *VDR*
- 4.1.5 Efecto *in vitro* de la vitamina D en el control transcripcional de *SERPINC1* en la línea celular HepG2
- 4.1.6 Efecto de la forma activa de la vitamina D sobre la antitrombina en pacientes con insuficiencia renal

4.2 Ácidos biliares y antitrombina

- 4.2.1 Datos clínicos y funcionales de pacientes con niveles inesperadamente elevados de antitrombina
- 4.2.2 Análisis molecular de *SERPINC1*
- 4.2.3 Modulación de la expresión de *SERPINC1* en células HepG2
- 4.2.4 Efecto *in vivo* de CDCA sobre la expresión de *SERPINC1* y niveles de

antitrombina plasmáticos

4.3 Antitrombina Milano

4.3.1 Caracterización de la mutación p.Arg393Cys

5. DISCUSIÓN

5.1 Vitamina D y antitrombina

5.2 Ácidos biliares y antitrombina

5.3 Antitrombina Milano

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

6.1 Conclusiones

6.2 Conclusions

ABREVIATURAS

REFERENCIAS

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representación esquemática de los cuatro eventos fisiológicos del proceso de activación de la hemostasia tras una lesión vascular del endotelio.
- Figura 2** Representación esquemática del sistema hemostático.
- Figura 3** Representación estructural de la configuración nativa de la antitrombina.
- Figura 4** Mecanismo inhibitorio de las serpinas.
- Figura 5** Principales conformaciones de antitrombina.
- Figura 6** Activación de la antitrombina por el pentasacárido esencial de la heparina.
- Figura 7** Diferencias estructurales en la inhibición de trombina (Factor II) y Factor X. Estructuras cristalográfica de los complejos Michaelis.
- Figura 8** Representación esquemática del gen *SERPINC1* localizado en la región 23-25 del brazo largo del cromosoma 1.
- Figura 9** Localización de las potenciales regiones reguladoras del gen *SERPINC1* en la región 5'UTR, identificadas en ensayos de protección de DNasa.
- Figura 10** Localización de secuencias repetidas en el gen *SERPINC1*.
- Figura 11** Identificación y caracterización funcional de la alteración *g.2143 C>G* en *SERPINC1*.
- Figura 12** Potenciales elementos reguladores en el gen *SERPINC1*.
- Figura 13** Síntesis de vitamina D3 en la piel.
- Figura 14** Metabolismo de la vitamina D.
- Figura 15** Representación esquemática de vías genómicas y no genómicas de la vitamina D.
- Figura 16** Acción genómica de la vitamina D a través de su receptor nuclear VDR tras unirse a elementos de respuesta a vitamina D en su gen diana.
- Figura 17** Localización cromosómica del gen *VDR*, organización genómica y dominios funcionales.
- Figura 18** Dominios estructurales y funcionales del receptor nuclear VDR.
- Figura 19** Estructura y perfil de hidrofobicidad de los ácidos biliares (ABs).
- Figura 20** Rutas de la síntesis de ABs en humanos.
- Figura 21** Estructura y tipos de receptores nucleares.
- Figura 22** Efectos genómicos y no genómicos de los receptores nucleares.
- Figura 23** Estructura del ligando sintético del FXR: GW4064.
- Figura 24** Localización de los amplicones empleados para estudiar el gen *SERPINC1*.
- Figura 25** Localización de VDREs en el gen *SERPINC1* identificados *in silico* empleando el software JASPAR.
- Figura 26** Localización de la mutación *c.1-171 C>G* en la región promotora de *SERPINC1*.
- Figura 27** Localización de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA* en el intrón 1 de *SERPINC1*.
- Figura 28** Genotipado de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA*.
- Figura 29** Actividad anti-FXa en plasma de portadores (*insTTGA*) y no portadores (WT) de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA* del gen *SERPINC1*. **p*<0,05.
- Figura 30** Localización de la mutación *c.42-1087_-1068dup* en el intrón 1 de *SERPINC1*.
- Figura 31** Genotipado de la mutación *c.42-1087_-1068dup*.
- Figura 32** Localización de la mutación *c.42-1056 G>A* rs146692719 en el intrón 1 de

SERPINC1.

- Figura 33** Patrón de restricción con la endonucleasa Fok1 de portadores de los tres posibles genotipos del polimorfismo rs2228570 del gen *VDR*.
- Figura 34** Patrón de restricción con la endonucleasa BsrD1 de portadores de dos de los tres posibles genotipos del polimorfismo rs4516035 del gen *VDR*.
- Figura 35** Expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con diferentes dosis de paricalcitol durante 24 horas.
- Figura 36** Efecto del paricalcitol, análogo de la vitamina D, en los niveles de antitrombina y protrombina secretadas al medio de cultivo de células HepG2 y detectadas mediante *Western Blot*.
- Figura 37** Expresión de *VDR* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con diferentes dosis de paricalcitol durante 24 horas.
- Figura 38** Efecto del paricalcitol (2 μ g/mL/día) sobre la antitrombina plasmática de 5 pacientes con insuficiencia renal crónica en tres momentos del tratamiento: basal, día +2 y día +4.
- Figura 39** Niveles de antitrombina en plasma en los casos 1, 2, 3, con insuficiencia hepática.
- Figura 40** Niveles de otras proteínas hepáticas en el plasma de los tres pacientes con insuficiencia hepática que presentaban mayores niveles de antitrombina.
- Figura 41** Efecto sobre la expresión génica de *SERPINC1* del tratamiento de células HepG2 con Dexametasona (Dexa), GW4046, Triyodotironina (T3) y Paricalcitol (VitD).
- Figura 42** Efecto sobre la expresión génica de *SERPINC1* del tratamiento de células HepG2 con diferentes dosis de distintos ácidos biliares biliares: CDCA, CA, UDCA y LCA.
- Figura 43** Efecto *in vivo* del CDCA en la expresión hepática de *SERPINC1* tras tres días de tratamiento.
- Figura 44** Efecto *in vivo* del CDCA (25 mg/kg) en la expresión hepática de *SERPINC1* tras tres días de tratamiento.
- Figura 45** Árbol genealógico de la familia estudiada.
- Figura 46** Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por Western blot tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras.
- Figura 47** Electroferogramas del exón 7 del gen *SERPINC1* en el probando, su madre y un sujeto sano.
- Figura 48** Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por Western blot tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras.
- Figura 49** Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por Western blot tras electroforesis en condiciones nativas.
- Figura 50** Purificación del plasma de las variantes de antitrombina con la mutación p.Arg393Cys.
- Figura 51** Antitrombina plasmática en portadores de diferentes mutaciones que afectan al residuo Arg393 y un control sano detectada por Western blot tras electroforesis en condiciones nativas.

- Figura 52** Antitrombina plasmática en portadores de la mutación p.Arg393Cys y un control sano en condiciones basales (0 h) y tras tratamiento del plasma a 42°C durante 24 horas.
- Figura 53** Perfil de elución de la cromatografía de Gel filtración realizada sobre las fracciones de cromatografía de afinidad por heparina que contiene la antitrombina obtenida del plasma del portador de la mutación p.Arg393Cys.
- Figura 54** Proteínas presentes en las fracciones de elución de la cromatografía de Gel filtración del plasma del portador de la mutación p.Arg393Cys.
- Figura 55** Identificación de factores trombofílicos y riesgo trombótico asociado (expresado como Odds Ratio: OR).
- Figura 56** Algoritmo diagnóstico para la búsqueda de alteraciones moleculares en pacientes con deficiencia de antitrombina.
- Figura 57** Hipótesis que vincula el riesgo trombótico con el cambio en las proporciones de variantes V1/V2 en portadores de la mutación p.Arg393Cys.
- Figura 58** Modelo para explicar las variantes identificadas en los portadores de la mutación p.Arg393Cys.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1** Mutantes naturales que afectan al residuo P1 y sus implicaciones clínicas y biológicas.
- Tabla 2** Extensión de los 7 exones del gen *SERPINC1*.
- Tabla 3** Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *SERPINC1*.
- Tabla 4** Oligonucleótidos y enzimas utilizadas para la amplificación del gen *VDR* y genotipado de los polimorfismos funcionales.
- Tabla 5** Oligonucleótidos y condiciones empleadas para la amplificación del gen *VDR*.
- Tabla 6** Características demográficas, clínicas, analíticas y genéticas de los pacientes con deficiencia de antitrombina y alteraciones en las secuencias regulatorias de *SERPINC1*.
- Tabla 7** Frecuencia alélica para los polimorfismos del gen *VDR* identificados en los 17 pacientes con deficiencia de antitrombina (def AT) sin base molecular conocida y la descrita en el HapMap.
- Tabla 8** Frecuencia alélica y asociación de los polimorfismos rs2228570 y rs4516035 con la actividad anti-FXa de antitrombina en la población general.
- Tabla 9** Identificación de haplotipos del gen *VDR* definidos por los polimorfismos rs2228570 y rs4516035.
- Tabla 10** Características demográficas, clínicas y parámetros bioquímicos de las pacientes con niveles de antitrombina (AT) sorprendentemente elevados para la insuficiencia hepática que presentaba.
- Tabla 11** Niveles de proteína C, proteína S y albúmina en los tres pacientes con niveles anormalmente elevados de antitrombina.

*Raras son las personas que usan la mente,
pocas aquellas que usan el corazón y únicas
las que usan ambos.*

Rita Levi-Montalcini

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema hemostático y riesgo trombótico

Un organismo con un sistema circulatorio cerrado y de alta presión precisa de un sistema hemostático extraordinariamente potente y rápido para controlar la fluidez de la sangre y evitar las consecuencias letales derivadas del daño vascular (**Figura 1**). Por ello, evolutivamente se han seleccionado mecanismos hemostáticos de respuesta inmediata que no requieren de síntesis proteica, para evitar un excesivo sangrado tras la lesión vascular.

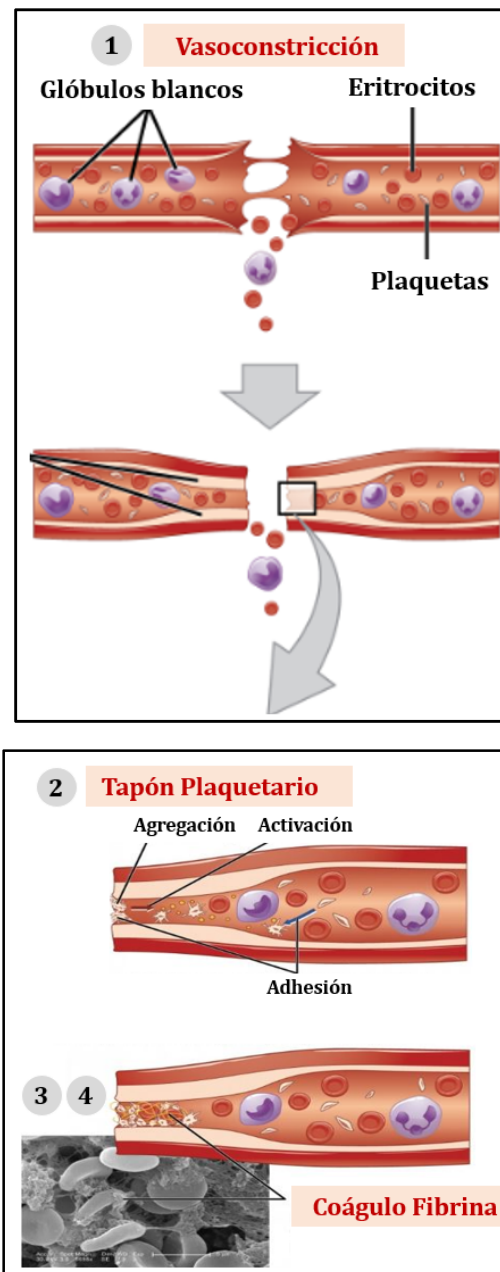


Figura 1. Representación esquemática de los cuatro eventos fisiológicos del proceso de activación de la hemostasia tras una lesión vascular del endotelio: (1) vasoconstricción, (2) formación del tapón plaquetario, (3) formación de coágulo de fibrina y fibrinólisis (4).

Pero el sistema hemostático es mucho más que una serie de elementos efectores (procoagulantes) que evitan el sangrado cuando existe daño vascular. Se trata de un

sistema complejo en el que también juegan un papel crucial elementos reguladores (anticoagulantes) y reparadores (fibrinolíticos). Y todo en un delicado equilibrio perfectamente controlado.

La capacidad antihemorrágica del sistema hemostático se consigue mediante reacciones proteolíticas en cascada que activan proteínas plasmáticas que se encuentran como zimógenos en altas concentraciones, y culminan con la formación de trombina. En este esquema, las serín proteasas son elementos cruciales tanto para los procesos de amplificación de señal como para el proceso final que cataliza la trombina para generar la malla de fibrina y activar las plaquetas (**Figura 2**).

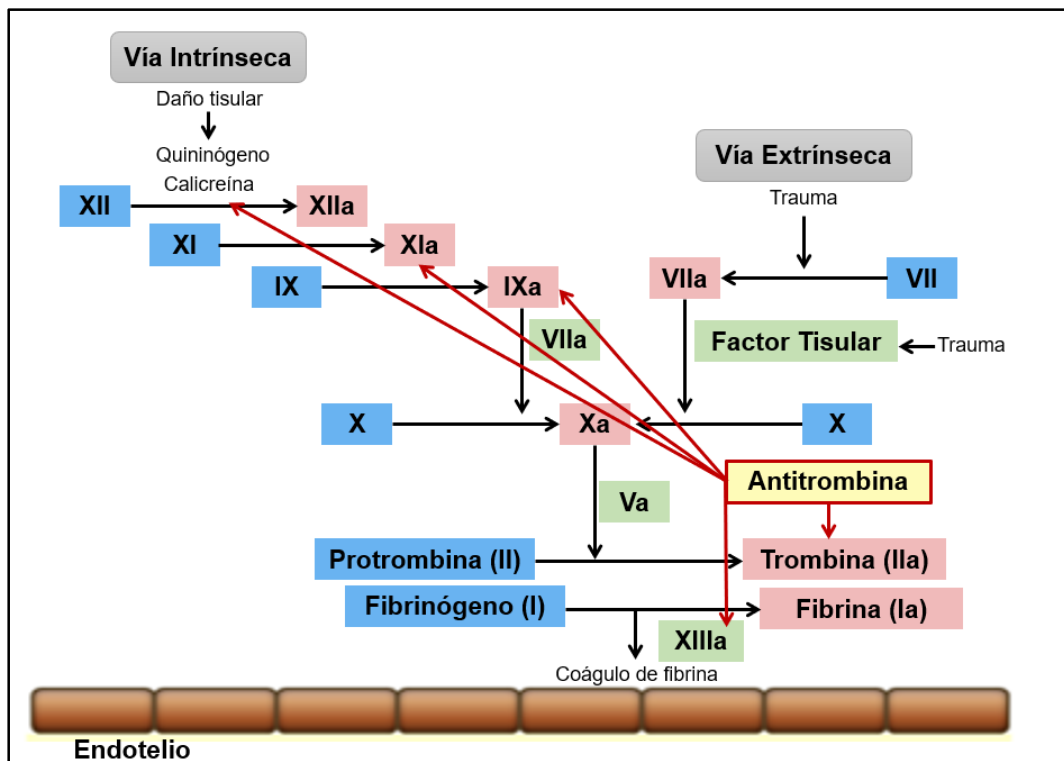


Figura 2. Representación esquemática del sistema hemostático. La cascada de coagulación puede activarse por la vía intrínseca o hacerlo por la extrínseca. Ambas rutas producen la activación del factor X y posterior formación de trombina, necesaria para convertir el fibrinógeno en fibrina para la activación del factor XIII, encargado de estabilizar el coágulo de fibrina. Los factores de coagulación se expresan en números romanos. La forma activada del zimógeno se muestra incorporando el sufijo “a”. Destacamos la acción anticoagulante de la antitrombina, marcada en rojo.

Para evitar procesos trombóticos, la potencia procoagulante debe ser controlada y restringida espacio-temporalmente a la zona de daño endotelial y al momento en que se ha producido la generación de trombina. Por ello, los mecanismos anticoagulantes son claves en el mantenimiento del balance hemostático [1]. De hecho, en condiciones normales, el sistema anticoagulante es dominante ya que mantiene la sangre en estado fluido. Finalmente, el sistema fibrinolítico, también constituido por proteasas e inhibidores de las mismas, participa en la eliminación del coágulo de fibrina para volver a la situación normal.

El desequilibrio del balance hemostático, que provoca una mayor o menor capacidad de respuesta o la disfunción de la regulación del mismo, puede dar lugar a dramáticas consecuencias y a la aparición de trastornos hemorrágicos o trombóticos. El resultado final de las alteraciones hemostáticas son un conjunto amplio de enfermedades con gran relevancia socio sanitaria. De hecho, la enfermedad tromboembólica es la principal causa de morbimortalidad de nuestra sociedad. Se estima que aproximadamente 1/1000 habitantes/año sufre un episodio de trombosis venosa, incidencia que está en constante aumento debido al envejecimiento de la población y a la mayor prevalencia de comorbilidades asociadas al tromboembolismo venoso, como es la obesidad, la insuficiencia cardíaca y el cáncer [2]. Este hecho ha incentivado la búsqueda de alteraciones asociadas con variaciones en el funcionamiento del sistema hemostático.

La trombosis venosa fue descrita inicialmente en la década de los 90 como una enfermedad monogénica, sin embargo hoy día es considerada una enfermedad multifactorial y poligénica resultado de la interacción de factores de riesgo trombótico tanto genéticos como ambientales [3]. La identificación de factores genéticos protrombóticos ha tenido especial interés, por ser estos permanentes y transmisibles a la siguiente generación. La elevada variabilidad interindividual de los fenotipos hemostáticos intermedios (niveles de factores, actividad funcional, etc.), junto con la alta heredabilidad de los mismos, indica la existencia de alteraciones genéticas implicadas en el riesgo de sufrir eventos trombóticos en territorio venoso. En muchos casos se ha demostrado el papel que tiene la variabilidad genética que afecta al gen que codifica dicho fenotipo. Por ello, una gran parte de los estudios que pretenden identificar factores genéticos de riesgo trombótico se han centrado en los genes que codifican los propios elementos del sistema hemostático[4]. Es más, se focalizaron en el estudio de las regiones codificantes de estos genes, dado el mayor peso que una alteración genética en estas posiciones puede tener. Los resultados alcanzados inicialmente fueron positivos, pero claramente insuficientes, ya que la mayoría de casos con trombosis tienen todavía una base molecular desconocida. Las descripciones de alteraciones en otros genes capaces de modular de forma indirecta los niveles de ese elemento son menos frecuentes, y podrían constituir verdaderamente nuevos elementos implicados en el riesgo trombótico.

1.2 Antitrombina

1.2.1 Características estructurales y funcionales

La antitrombina es una glicoproteína plasmática de síntesis hepática con un eficaz mecanismo de inhibición de gran número de serín proteasas como miembro de la superfamilia de las serpinas que es **(Figura 2)**. Sus principales dianas son la trombina (FIIa) y el factor Xa (FXa), pero la antitrombina también es capaz de inhibir otras proteasas procoagulantes como son los factores IXa, XIa, XIIa y VIIa **(Figura 1)** [5-7]. Estas características hacen de la antitrombina el principal anticoagulante endógeno implicado en el control del sistema hemostático [6, 8, 9]. Por ello, la reducción de su actividad anticoagulante incrementa de manera muy significativa el riesgo trombótico y su deficiencia completa se asocia con letalidad embrionaria[10, 11].

La molécula de antitrombina consta de una sola cadena peptídica de 464 aminoácidos que tras perder el péptido señal formado por 32 aminoácidos, da lugar a una proteína madura de 432 aminoácidos con un peso molecular de 58kDa. Se trata de una proteína de síntesis hepática que alcanza en plasma concentraciones medias de 150 μ g/mL y tiene una vida media aproximadamente de 3 días [12].

La antitrombina contiene 4 residuos de asparagina (Asn) susceptibles de ser glicosilados (Asn96, 135, 155 y 192). El 90% de la molécula circulante se encuentra glicosilada en las 4 Asn, dando lugar a la glicofoma α . El 10% restante, o glicofoma β , carece de glicosilación en la posición Asn135 y presenta mayor afinidad por heparina (**Figura3**) [13]. La numeración empleada en la memoria tiene como referencia a la proteína madura, sin péptido señal.

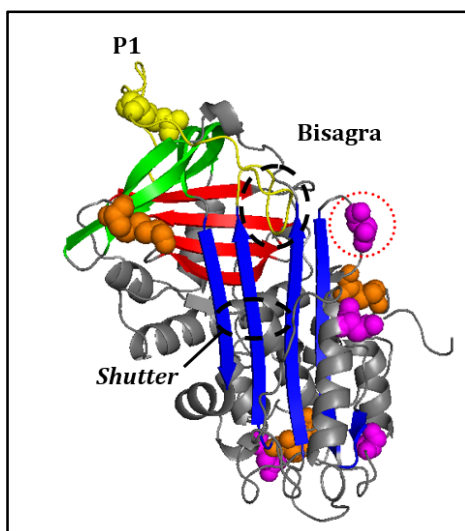


Figura 3. Representación estructural de la configuración nativa de la antitrombina. (Código PDB: 1T1F). Las láminas β se muestran en azul, rojo y verde. El centro reactivo (RCL) está marcado en amarillo, con el residuo P1 (Arg393) indicado específicamente. Los residuos de cisteína implicados en la formación de los puentes disulfuro intermoleculares se muestran en naranja. Los residuos de arginina con N-glicosilación se indican en violeta, el residuo Asn135 (N135), con glicosilación ineficaz, responsable de la glicofoma beta rodeado por un círculo naranja. Los círculos con líneas negras discontinuas indican las zonas móviles de la molécula, implicadas en el mecanismo inhibitorio: la región bisagra, con el RCL parcialmente internalizado y la región lanzadera o *shutter* en inglés, de localización central que estará implicado en el movimiento del RCL roto. Imagen generada con Pymol (www.pymol.com).

La molécula de antitrombina contiene 6 residuos de cisteína (Cys) que forman 3 puentes disulfuro intramoleculares (Cys8-Cys128, Cys21-Cys95, Cys248-Cys430) que contribuyen al correcto plegamiento de la cadena peptídica en una configuración metaestable, necesaria para su correcto funcionamiento.

Como se ha indicado anteriormente, la antitrombina pertenece a la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serín-proteasas), un grupo de más de 1000 proteínas con un elevado grado de homología estructural que comparten una estructura terciaria altamente conservada. La estructura básica de una serpina consta de un dominio central formado por 3 láminas u hojas β (A-C) y de 8 a 9 hélices α (A-I) [14], y presentan en la parte superior de la molécula un centro o *loop* reactivo móvil (RCL, del inglés “*reactive centre loop*”) (**Figura**

3). Este RCL tiene una secuencia aminoacídica específica en cada serpina y una nomenclatura propia. Así, el residuo que interacciona con la proteasa diana se denomina P1, y forma un enlace peptídico con P1'. En el caso de la antitrombina, el RCL engloba desde el residuo Glu-377 hasta el residuo Val-400, siendo el dipéptido P1-P1' Arg-393 y Ser-394 [15]. Desde estos residuos, la numeración de los componentes del RCL es sucesiva P2-P17 y P2'-P7', siendo para la antitrombina Glu-377 y P7' Leu-400.

Para realizar su papel inhibitorio, la antitrombina como el resto de las serpinas, presenta una conformación nativa metaestable, pero como característica propia de este anticoagulante, su RCL se encuentra parcialmente insertado en la parte superior de la lámina β central, formándose un puente salino entre el P1 (Arg-393) y el Glu-273 que permite el anclaje del RCL al núcleo de la molécula [16, 17]. En esta conformación, también se establecen interacciones entre los residuos P10-P11-P12-P13-P14-P15 y residuos de las hebras s5A y s3A [13]. En esta conformación nativa no activada, el residuo P1 queda poco accesible a la interacción proteína-proteína, especialmente a las proteasas diana. Por ello, la antitrombina nativa tiene una capacidad inhibitoria débil, probablemente para evitar una excesiva actividad anticoagulante y permitir una correcta respuesta procoagulante ante un estímulo protrombótico fisiológico.

El mecanismo de inhibición de las serpinas también es conocido como sistema de inhibición por suicidio. Durante el proceso, la serpina se une mediante su RCL a la proteasa diana, la cual corta la unión de los residuos P1-P1'. Esta ruptura provoca que el RCL cortado se internalice en el interior de la lámina β A de la serpina formando una nueva hebra β . Este movimiento, que requiere de una gran flexibilidad estructural y conformacional por parte de la molécula, de ahí su conformación metaestable, afecta de forma irreversible tanto a la serpina como a la proteasa. Por una parte, la serpina adquiere una configuración hiperestable (también denominada relajada), con mayor estabilidad estructural que la conformación nativa; y por otra parte, la proteasa unida al RCL roto de la serpina es translocada hacia el polo opuesto de la molécula, lo que provoca cambios estructurales en la proteasa que provocan la pérdida de su actividad proteolítica. Además, estos cambios estructurales provocan la formación de nuevas interacciones entre la serpina y la proteasa, que incluyen enlaces covalentes y que permiten la formación de un complejo prácticamente insoluble entre las dos moléculas, termodinámicamente estable que no se deshace incluso en condiciones desnaturalizantes, y que además se aclaran rápidamente de la circulación (**Figura 4**) [18].

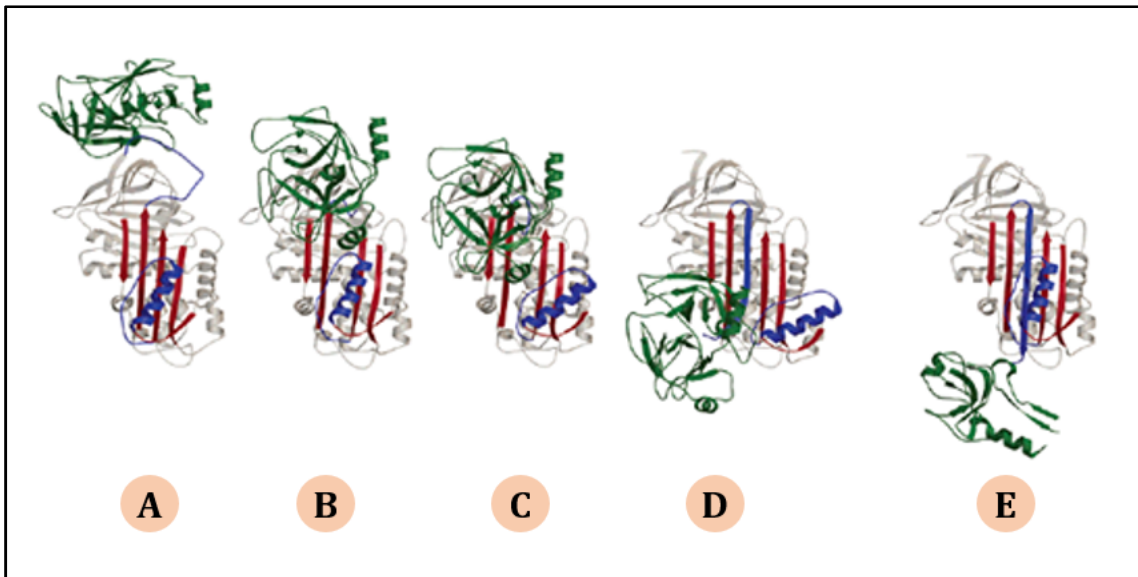


Figura 4. Mecanismo inhibitorio de las serpinas. (A) Forma nativa de la serpina (en gris) formada por 5 hebras sA (flechas rojas) unida a la serín-proteasa (en verde). Se le conoce con el nombre de conformación estresada. (B, C, D) Complejos intermedios de Michaelis. El centro catalítico de la proteasa reconoce y corta el enlace P1-P1' del centro reactivo. Siguiendo el mecanismo de proteólisis en dos fases, la proteasa queda unida al residuo P1' de forma covalente. La proteasa es translocada hacia el polo opuesto de la serpina y el centro reactivo roto se introduce espontáneamente en la zona central, creando una nueva hebra (flecha azul) en la lámina β A. (E) Complejo Serpina-Proteasa en su forma estable relajada. La zona central está formada por 6 hebras sA (flechas rojas y azul). Modificado de Chem. Rev. 2002;102:4751-4804.

Este mismo cambio conformacional también ocurre si el RCL se rompe proteolíticamente por proteasas que no sean dianas de la antitrombina, como la elastasa. En este caso, la serpina también adquiere una conformación hiperestable, que se denomina forma rota (**Figura 5 C**). Finalmente, el RCL puede integrarse en la lámina β central y formar una nueva hebra en la lámina central sin ruptura proteolítica. Dos conformaciones, ambas metaestables o relajadas, pueden ser resultado de esta internalización del RCL, dependiendo si se internaliza en la propia molécula generando la forma latente, o en otra molécula generando polímeros.

La transición a forma latente en la antitrombina se produce de forma espontánea ya que la forma latente puede representar un 5% del total de antitrombina circulante. Se piensa que la transformación a forma latente que ocurre en el plasma en condiciones fisiológicas es el resultado de un proceso de senescencia de la molécula, aunque también se acelera por condiciones como el aumento de temperatura o los cambios de pH [19-21]. Ciertas mutaciones o factores ambientales favorecen o provocan directamente la transición de la antitrombina a su conformación latente con la consiguiente pérdida de actividad anticoagulante (**Figura 5**) [22]. La internalización del RCL como nueva hebra en la lámina A implica dos moléculas de serpinas, en un proceso que permite la formación de polímeros y para el que se han planteado diferentes mecanismos [23, 24]. Como ocurre para la transición a latente, ciertos factores ambientales (aumento de temperatura, cambios de pH, etc.) y ciertas mutaciones favorecen la polimerización. Y al igual que ocurre con la forma rota o latente, los polímeros de antitrombina carecen de actividad anticoagulante.

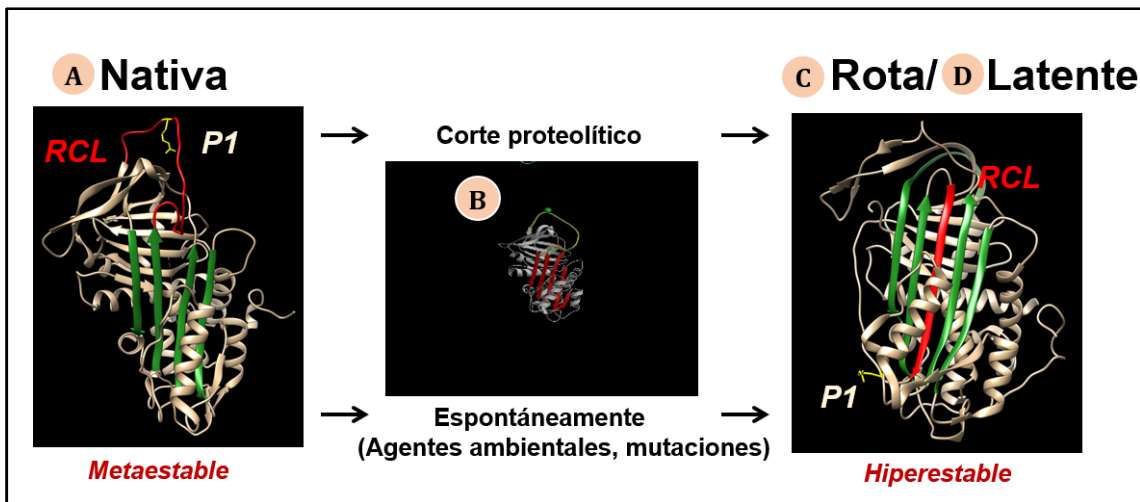


Figura 5. Principales conformaciones de antitrombina. El RCL se muestra en rojo y las hebras de la lámina A central en verde. La posición del residuo P1 queda señalada en todas las conformaciones. **(A)** Forma nativa, **(B)** complejo trombina-antitrombina, **(C)** Forma rota, **(D)** Forma latente.

Además del RCL, otra región clave en la función anticoagulante de la antitrombina es el sitio de unión a heparina, un dominio funcional definido en la estructura terciaria de la molécula y que se justifica por la baja actividad inhibitoria de la forma nativa con el RCL parcialmente expuesto [25]. Por ello, para conseguir una máxima actividad anticoagulante, la antitrombina requiere de la participación de un cofactor, la heparina. La antitrombina se une con gran afinidad a una secuencia pentasacáridica específica (DEFGH) presente en los heparán sulfatos de la microvasculatura, pero principalmente en las heparinas, un anticoagulante obtenido mediante hidrolizados de heparanos de animales [26]. Los residuos de la antitrombina que interactúan con el pentasacárido esencial de la heparina son: Pro41, Asn44, Arg129, Lys125, Arg46, Arg47, Lys11, Arg13, Lys114 y Glu113 (**Figura 6**). Existen además 3 aminoácidos adyacentes en el extremo carboxi-terminal que no se unen directamente a la heparina, pero participan en la unión de cadenas largas de heparina [27]. A su vez, estos residuos establecen interacciones con otros aminoácidos que intervienen de forma indirecta en el mantenimiento de la estructura y función del dominio de unión a heparina, como los que se establecen entre Lys125 y Glu414, situados en la hebra s4B; y entre Arg129 y Arg278, presentes en la hebra s3B. La unión de la heparina a la antitrombina provoca un sutil pero relevante cambio conformacional en la serpina que exagera su capacidad anticoagulante: provoca la formación de una nueva vuelta en la hélice D que cierra el espacio de la lámina β central A, y la exposición completa del RCL, logrando la activación de la antitrombina [28]. La forma activada de la antitrombina aumenta 100 veces la actividad anti-FXa y más de 17000 veces su actividad anti-FIIa, ya que las heparinas no fraccionadas actúan además de puente para la formación del complejo ternario entre serpina, proteasa y heparina, un complejo que sin duda favorece la inhibición de la trombina (**Figura 7**). Con estos datos, se entiende que este proceso de activación constituye un mecanismo de control de la acción anticoagulante de la antitrombina en el torrente circulatorio, limitando su actividad a aquellas zonas donde el endotelio está dañado y quedan expuestos los glicosaminoglicanos, capaces de unirse a la serpina. Además, este proceso de activación de la antitrombina es el

que sustenta el uso terapéutico de las diferentes modalidades de heparinas como potentes anticoagulantes.

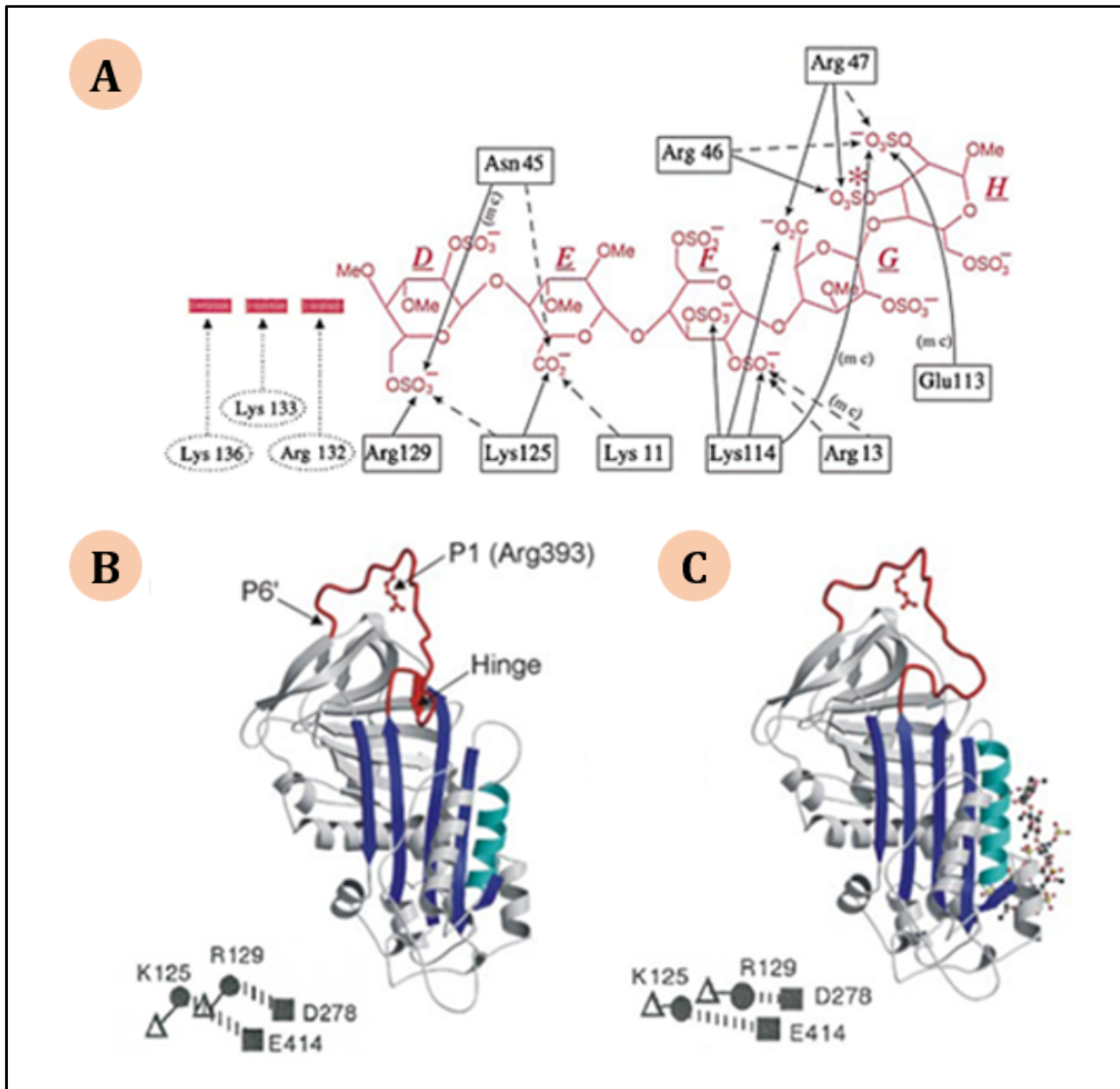


Figura 6. Activación de la antitrombina por el pentasacárido esencial de la heparina. (A) Esquema representativo de los enlaces por puente de hidrógeno que se establecen entre el pentasacárido DEFGH de la heparina y los aminoácidos de la antitrombina que forman el sitio de unión a heparina. **(B)** Forma nativa de la antitrombina. **(C)** Forma activada en la que la unión del pentasacárido de la heparina provoca una mayor exposición del centro reactivo. Se muestra además la evolución de los enlaces entre Lys125 y Glu414, y Arg129 y Asp278.

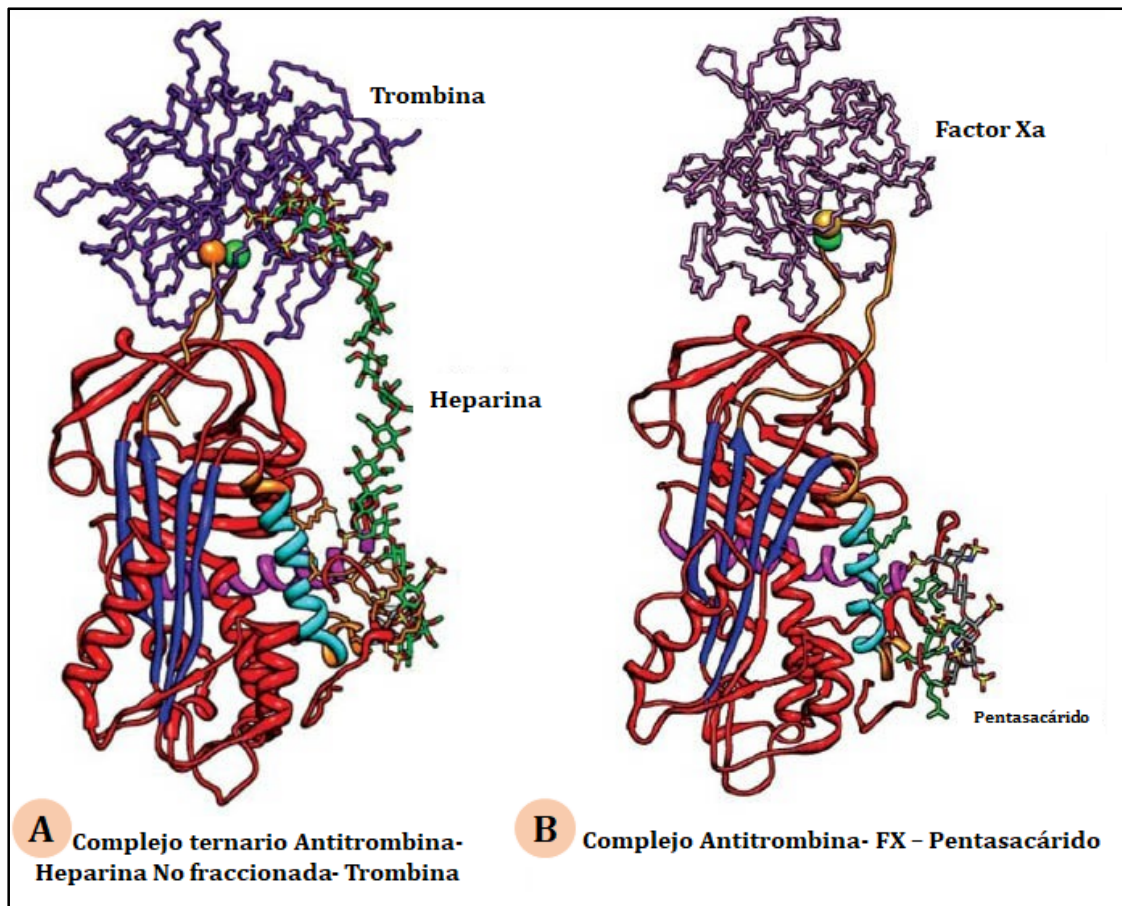


Figura 7. Diferencias estructurales en la inhibición de trombina (Factor II) y Factor X. Estructuras cristalográfica de los complejos Michaelis. (A) Complejo ternario antitrombina-heparina no fraccionada-trombina. La inhibición de la trombina implica una activación no alostérica que ocurre al interaccionar serpina y proteasa a través de la heparina, que actúa como puente del mecanismo de activación. **(B) Complejo antitrombina-FXa-pentasacárido.** La inhibición del no requiere de la formación de un complejo ternario, ya que la simple activación de la antitrombina inducida por el pentasacárido esencial de la heparina facilita la interacción de la antitrombina activa por el FXa. Por ello, la inhibición del FXa implica activación alostérica por el pentasacárido.

Otra región de enorme trascendencia estructural de la antitrombina es la zona de las hebras β centrales, en particular las hebras 3A y 5A, que definen junto a otros residuos un dominio denominado lanzadera, en inglés *shutter*, responsable de la alta flexibilidad conformacional de las serpinas, y que junto a las dos regiones bisagra o *hinge* en inglés, regulan el movimiento del RCL y los cambios conformacionales de la antitrombina (**Figura 3**). El alto grado de homología estructural que presentan estas regiones entre las diferentes serpinas es prueba de la enorme relevancia de estos residuos. En estas regiones se localizan hasta 22 aminoácidos de los 51 estrictamente conservados en la superfamilia de las serpinas [29].

La descripción de la estructura básica de la antitrombina nativa, así como los cambios estructurales que experimenta esta serpina durante su mecanismo de acción, reafirman la enorme flexibilidad estructural de esta molécula. Debido a ello, no es extraña la presencia de otras formas estructurales de antitrombina, todas ellas codificadas por el

mismo gen, con el mismo número de aminoácidos e incluso con la misma secuencia primaria pero que difieren en la forma de plegamiento. Hasta la fecha hay 32 estructuras cristalográficas de antitrombina descritas recogidas en la base de datos del “Protein Data Bank” (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

1.2.2 Deficiencia de antitrombina

En 1965, el hematólogo Olav Egeberg mostró por primera vez la asociación entre la deficiencia de antitrombina y la incidencia de trombosis venosa, al comprobar que los sujetos de una familia noruega con niveles reducidos de antitrombina desarrollaban episodios severos y tempranos de trombosis venosa [30]. Tras esta publicación, la trombofilia pasó a ser un área de investigación relevante y una disciplina clínica importante. En el año 1983 se describió la primera mutación en el gen codificante de antitrombina (*SERPINC1*) asociada con deficiencia de antitrombina, y desde entonces hasta el momento de la escritura de esta tesis, han sido identificadas en pacientes con deficiencia de antitrombina, un total de 323 mutaciones distintas, recogidas todas en la base de datos “Human Gene Mutation Database” (www.hgmd.cf.ac.uk/), la mayoría identificadas en estado heterocigoto [9].

Las deficiencias de antitrombina se pueden clasificar, dependiendo de la causa de la deficiencia, en: congénitas y adquiridas [30]. La deficiencia congénita de antitrombina, causada por alteraciones genéticas, se subclasifica a su vez en dos tipos (I-II) dependiendo principalmente de aspectos funcionales e inmunológicos [31].

La deficiencia tipo I, hasta la fecha únicamente identificada en estado heterocigoto, se caracteriza por una completa ausencia de la proteína mutada en plasma, lo que se traduce en un descenso paralelo tanto de los niveles antigénicos (en torno al 50%), como funcionales (50%) ya que como hemos dicho, estos casos presentan un alelo silvestre. La gran mayoría de los casos de deficiencia tipo I son causados por mutaciones puntuales que generan codones stop *nonsense*, deleciones o inserciones en el *SERPINC1* y suelen relacionarse con situaciones de alto riesgo trombótico [32]. También las grandes alteraciones genéticas y las que provocan cambios en el procesamiento de intrones se asocian con deficiencia tipo I. Pero también mutaciones que cambian un solo aminoácido (*missense*), pueden provocar deficiencia tipo I, mayoritariamente por las implicaciones conformacionales asociadas a la polimerización de esta serpina [33].

Por otra parte, las deficiencias tipo II se caracterizan por la secreción de la proteína mutada al plasma en concentraciones normales o ligeramente reducida con respecto a la forma normal. Por ello, los valores antigénicos no se encuentran muy o nada afectados, pero al tener la variante de antitrombina un defecto funcional, más o menos grave, se observa una actividad anticoagulante disminuida. La totalidad de las escasas mutaciones detectadas en homocigosis (en nuestro conocimiento, solo 3 mutaciones) provocan deficiencia de tipo II [34].

Estas deficiencias tipo II se clasifican a su vez en 3 subtipos dependiendo de la localización de la mutación y las consecuencias funcionales que provoca:

- 1) Las que afectan al centro reactivo (*Reactive Site*) también denominadas tipo IIa. Se caracterizan por una actividad disminuida, tanto en presencia como en ausencia de heparina. Estas deficiencias suelen estar asociadas con un fenotipo clínico severo, especialmente las que afectan al residuo P1, como veremos posteriormente.

2) Los defectos en el sitio de unión a heparina (*Heparin Binding Site*), también llamadas tipo IIIb. Estas mutaciones provocan una menor afinidad por heparina y/o una incorrecta activación por este cofactor. Suelen asociarse con menor riesgo trombótico [35].

3) Por último, la deficiencia funcional múltiple tipo IIc o defecto pleiotrópico (*Pleiotropic Effect*), incluye gran parte de mutaciones que afectan a la lámina C y que causan tanto defectos funcionales en la reactividad de la molécula, como defectos de activación por heparina. Los portadores de este tipo de déficit presentan gran variabilidad clínica [32, 36-38]. Recientemente, nuestro grupo ha propuesto que gran parte de las mutaciones pleiotrópicas provocan o facilitan la transición a forma latente [39].

Por otra parte, la deficiencia adquirida de antitrombina puede estar provocada por diversas situaciones patológicas o factores externos a través de diferentes mecanismos. Pueden deberse a una síntesis deficiente de proteínas, como es el caso de los pacientes cirróticos; a una pérdida de proteína, como ocurre en el síndrome nefrótico; a un hiperconsumo en el caso de sepsis, politraumatizados, tumores y grandes quemados; o ser inducida por fármacos, como la L-asparaginasa o la heparina [40].

1.2.3 Mecanismos patogénicos de la deficiencia de antitrombina en mutantes que afectan al residuo P1

La mayoría de las alteraciones genéticas en *SERPINC1* tienen consecuencias patogénicas derivadas de la pérdida de función asociada, bien porque la proteína no se secreta (deficiencia tipo I), bien porque no funciona correctamente (deficiencia tipo II). En este último grupo se incluyen las mutaciones que afectan al residuo reactivo P1 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Mutantes naturales que afectan al residuo P1 y sus implicaciones clínicas y biológicas.

Variante	Mutación	Implicaciones clínicas y biológicas
London	delArg393	Pérdida de función anticoagulante Aumento afinidad por heparina Polimerización
Glasgow	p.Arg393His	Pérdida de función anticoagulante
Pescara	p.Arg393Pro	Pérdida de función anticoagulante
Northwick Park/Milano	p.Arg393Cys	Pérdida de función anticoagulante

Las mutaciones que afectan el residuo P1, además de la pérdida de función total, también pueden provocar una ganancia de función que permite a la forma mutada disminuir la actividad de la molécula silvestre por al menos dos mecanismos diferentes: compitiendo en la unión a heparina (la forma mutada tiene mayor afinidad por heparina), o favoreciendo la infectividad de la forma silvestre a los polímeros que se generan con estas formas mutadas [41, 42]. Esto explica que los portadores de estas mutaciones tengan eventos tempranos y recurrentes, con alta prevalencia de trombosis arterial [41, 43].

Especial interés tiene la mutación responsable de la variante Northwick Park, también denominada Milano (p.Arg393Cys) que afecta al residuo P1, ya que es la única hasta la fecha en la que la mutación parece favorecer la interacción de la antitrombina con otra proteína, la albúmina, mediante un puente disulfuro gracias a la Cys que genera la mutación [44, 45].

1.2.4 Diagnóstico de laboratorio de la deficiencia de antitrombina

En el año 2003, el *European Communities Confederation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (ECA) Working Group on Guidelines for Investigation of Disease* elaboró las guías para el diagnóstico de las trombofilias en laboratorios clínicos [13]. A continuación, se resume los pasos indicados a seguir.

El estudio inicial de la deficiencia de antitrombina debe hacerse mediante un estudio funcional que mida la actividad anticoagulante. Se recomienda evaluar la actividad anti-FXa ya que la actividad anti-FIIa también evalúa la actividad de otra serpina que inhibe a la trombina, el cofactor II de heparina. Este estudio se realiza por métodos cromogénicos en una muestra de plasma citratado, que debe extraerse por venopunción, fuera del período agudo del episodio de trombosis. El resultado de este método se suele presentar como % relativo a un plasma de referencia control. El punto de corte que se establece para el diagnóstico de la deficiencia de antitrombina, aunque es conflictivo, se coloca por debajo del 80%, ya que el rango de valores de niveles normales en plasma observado en la población general oscila entre 112-140 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 80-120% en términos porcentajes, donde el 100% de antitrombina corresponde a 1 unidad de antitrombina en 1mL del plasma de referencia.

Diferentes factores podrían afectar al resultado obtenido por el método funcional y generar falsos positivos. El estudio no se debe realizar con muestras recogidas durante el evento agudo, ya que puede existir un consumo endógeno de antitrombina, o en pacientes tratados con anticoagulantes orales directos anti-FXa. Otros factores como la heparina, el embarazo, la terapia anticoagulante con cumarínicos o los anticonceptivos orales en estas pruebas, podrían tener efecto, aunque nunca deberían justificar una deficiencia funcional severa. También existen factores ambientales que provocan una deficiencia de antitrombina adquirida por diferentes mecanismos, como los grandes quemados, la disfunción hepática o el tratamiento con L-asparaginasa. Por ello, normalmente se recomienda repetir la prueba en una segunda muestra y realizar estudios familiares para verificar que la deficiencia de antitrombina identificada en un paciente tiene una base congénita. Cualquier muestra con un resultado menor del rango de normalidad (<80% de un plasma de referencia) debe ser confirmado en una nueva muestra del mismo paciente salvo que se haya identificado una deficiencia de antitrombina en algún familiar directo.

Sin embargo, un correcto y completo diagnóstico de la deficiencia de antitrombina requiere de estudios adicionales. Así, es recomendado realizar la determinación cuantitativa de la antitrombina a través de un ensayo antigénico, ya que este estudio permite diferenciar los defectos de tipo I de los de tipo II. De forma práctica, se establece como indicativo de deficiencia tipo I una determinación de antígeno en torno al 50% (niveles normales 112-140 $\mu\text{g/mL}$, 80-120%).

El estudio completo de la deficiencia de antitrombina implica determinación de niveles antigénicos (mediante ELISA o Laurell), afinidad por heparina (mediante cross-immunoelectroforesis cruzada en presencia de heparina) y análisis molecular.

Adicionalmente, la realización de una electroforesis bidimensional en presencia y en ausencia de heparina en los casos con deficiencia tipo II permite definir si existe aumento de la forma de antitrombina con baja afinidad por heparina y por tanto diagnosticar la deficiencia IIa, ya que no presenta aumento de formas con baja afinidad por heparina. Finalmente, la realización de una prueba funcional en ausencia de heparina (actividad progresiva) permite diferenciar entre las formas IIb (con actividad progresiva) y IIc (sin actividad progresiva), ambas con aumento de formas con baja afinidad por heparina.

En la rutina de diagnóstico de la deficiencia de antitrombina, desde hace pocos años, se ha incluido el estudio genético. La globalización de los sistemas de análisis molecular ha facilitado significativamente este estudio, que podría además aclarar casos de diagnóstico complicado, en los cuales las técnicas funcionales y antigénicas son dudosas, facilitando el cribado familiar y el consejo genético, contribuyendo al pronóstico de la deficiencia e incluso facilitando actitudes profilácticas o terapéuticas.

Las deficiencias tipo II son más prevalentes que las tipo I en la población general, mientras que entre los pacientes con eventos tromboticos es más frecuente encontrar deficiencias tipo I [46]. Así mismo, no se han encontrado diferencias en la incidencia de deficiencia de antitrombina entre hombres y mujeres, o entre diferentes razas [47].

1.2.5 Aspectos genéticos y elementos reguladores

El gen que codifica este potente anticoagulante (*SERPINC1*) se localiza en la región 23-25 del brazo largo del cromosoma 1 (q23-q25.1). *SERPINC1* tiene una extensión de 13,4kb y consta de 7 exones, denominados clásicamente 1, 2, 3a, 3b, 4, 5 y 6 [48-50] aunque actualmente se numeran de forma consecutiva del 1 al 7 (Figura 8).

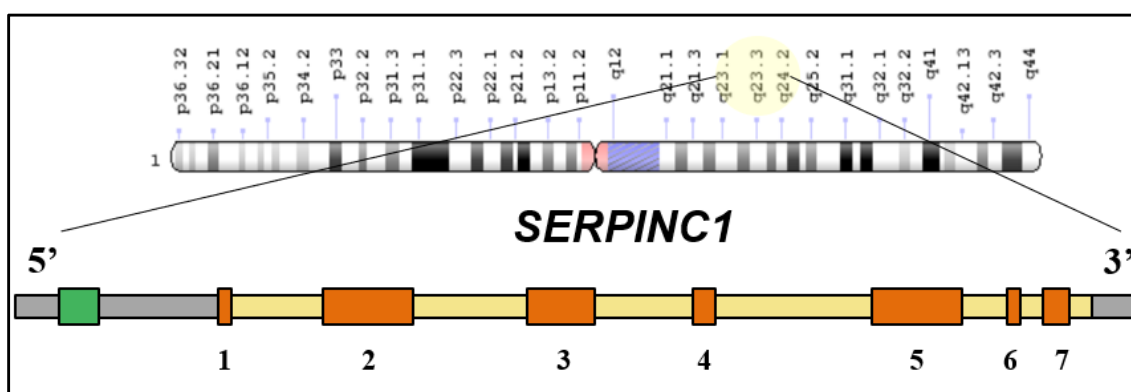


Figura 8. Representación esquemática del gen *SERPINC1* localizado en la región 23-25 del brazo largo del cromosoma 1. Se muestra la zona del promotor en color verde, los 7 exones en color naranja y las zonas intrónicas en amarillo.

La secuencia completa del gen fue determinada por Olds y colaboradores en el año 1992 [50]. De los 7 exones, el de mayor tamaño es el 5 con 396 pb y el más pequeño (de solo 42 pb) es el 1 (Tabla 2).

Tabla 2. Extensión de los 7 exones del gen *SERPINC1*.

Exón	Tamaño (en pb)
1	42
2	366
3	216
4	135
5	396
6	63
7	174

El RCL está codificado en el exón 7, y los aminoácidos que forman el dominio de unión a heparina se encuentran mayoritariamente distribuidos entre los exones 2 y 3.

Se conocen las secuencias implicadas en el procesamiento del ARNm que flanquean a cada exón en sus extremos 5' y 3'. Existen 4 procesamientos alternativos para el transcrito del gen de la antitrombina, aunque solamente se conoce producto proteico de dos de ellos: SERPINC1-001 con 7 exones, y SERPINC1-201 con 5 exones, siendo funcional sólo el primero. (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENS G00000117601;r=1:173903804-173917378)

Debido a su sensibilidad conformacional y funcional, incluso pequeñas modificaciones en la secuencia de *SERPINC1* pueden tener consecuencias patológicas [51]. La mayoría de los pocos polimorfismos presentes en este gen son neutros, ya que las variaciones genéticas que tengan consecuencias *missense* suelen asociarse con un incremento más o menos grave, en el riesgo de sufrir trombosis [46].

El 70-80% de los pacientes portadores con deficiencia de antitrombina son portadores de alguna mutación o delección en *SERPINC1* [52, 53]. Los estudios genéticos en pacientes con deficiencia de antitrombina han servido para caracterizar dominios funcionales y estructurales de este anticoagulante [54].

Sin embargo, poco se conoce acerca de la regulación del gen *SERPINC1*. No se han descrito la existencia de elementos TATA o regiones ricas en GC en la región promotora [50, 55]. Dos trabajos independientes muestran que la zona cercana al inicio de traducción (5' potencial región promotora) contiene regiones a las que se unen elementos reguladores, y por tanto con potencial relevancia en el control transcripcional [56, 57]. También se ha sugerido que en las primeras 55 pb localizada 5' del codón ATG pudieran existir dos elementos potenciadores (**Figura 9**) [58].

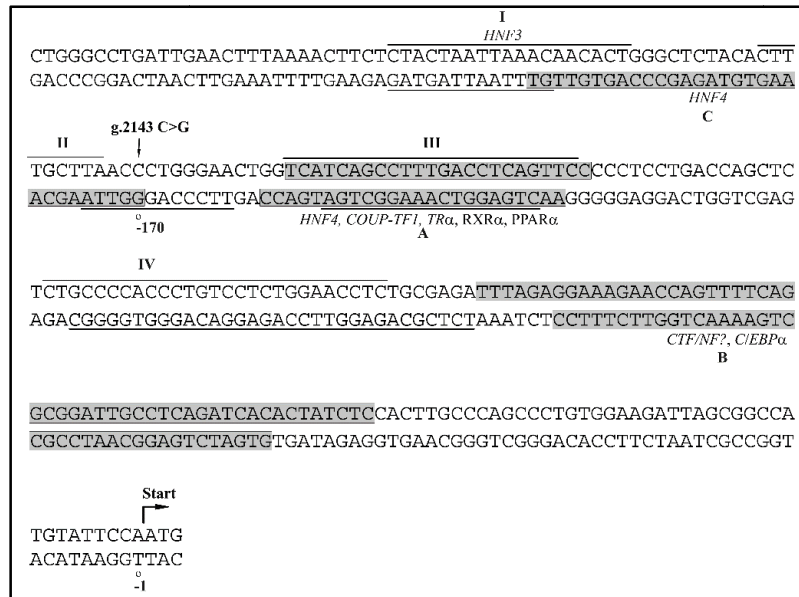


Figura 9. Localización de las potenciales regiones reguladoras del gen *SERPINC1* en la región 5'UTR, identificadas en ensayos de protección de DNasa. Las secuencias subrayadas en gris (A-C) fueron descritas por Fernandez-Rachubinski y colaboradores [56] mientras que las regiones indicadas con números romanos (I-IV) fueron descritas por Tremp y colaboradores [57]. Los factores de transcripción identificados están indicados en itálica.

Una característica particular del gen *SERPINC1* es la alta proporción de elementos repetitivos *Alu*, todos localizados en intrones, que cubren el 22% de la secuencia intrónica del gen. También es destacada la presencia de dos regiones de repeticiones de tripletes ATT en los extremos de los exones 5 y 6. Finalmente, como indicamos anteriormente, el gen *SERPINC1* es muy poco polimórfico, especialmente en las regiones codificantes. Tan solo se han descrito tres polimorfismos relativamente prevalentes, todos silenciosos y un polimorfismo de tamaño en la región 5' del gen (**Figura 10**).

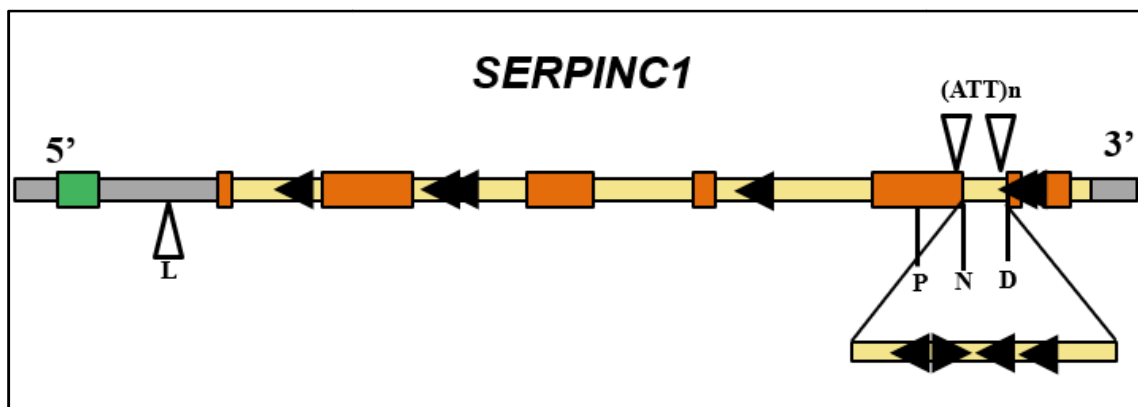


Figura 10. Localización de secuencias repetidas en el gen *SERPINC1*. Las puntas de flechas negras representan las secuencias *Alu*. La localización de las repeticiones ATT (ATT)_n queda también reflejada. Finalmente, las letras P N D muestran las zonas polimórficas más frecuentes identificadas en la región codificante del gen (los exones se marcan en naranja) y la letra L, el polimorfismo de tamaño que afecta a la región 5' del gen.

Al secuenciar la zona del promotor de la antitrombina situada entre -92 y -54, se identificó la presencia de unos elementos de respuesta a hormonas (HRE) formados por 3 repeticiones de una secuencia consenso de 6 nucleótidos (AGGTCA), la cual es reconocida por miembros de la superfamilia de las hormonas tiroides-esteroides y receptores nucleares [56, 59].

Por otra parte, el empleo de modelos celulares que someten a genes de referencia (*genes reporter* como la cloranfenicol acetil transferasa-CAT-) al control transcripcional del promotor de la antitrombina, identificó regiones cuya delección causaba un descenso de los niveles de CAT [59]. En este mismo trabajo mostraron que la trans-activación del promotor de la antitrombina por el receptor del ácido retinoico α (RXR α) o el receptor de la hormona tiroidea β (TR β -del inglés *Thyroid hormone receptor*) sólo se observa cuando el promotor contiene la región -167/+57 [59]. Estos resultados muestran indicios que avalan un posible papel de la ruta de la vitamina D/A en la regulación transcripcional del gen *SERPINC1*.

Esta hipótesis se sustenta con otras evidencias bibliográficas. Así, los ratones deficientes en el receptor de vitamina D (VDR) muestran una reducción de niveles plasmáticos de antitrombina, además de observar que el tratamiento de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) con ácido trans-retinoico (ATRA), la forma activa de vitamina A, incrementa los niveles de antitrombina [59, 60].

Nuestro grupo identificó la primera mutación en la región promotora del gen *SERPINC1* asociada con deficiencia de antitrombina en una familia (**Figura 11**) [49]. El estudio de las regiones reguladoras potencialmente implicadas por este cambio reveló que la mutación g.2143 C>G (*c.1-171 C>G*) alteraba radicalmente un potencial elemento de respuesta a vitamina D (VDRE) y reducía drásticamente la probabilidad de unión de este complejo de regulación transcripcional (**Figura 11**).

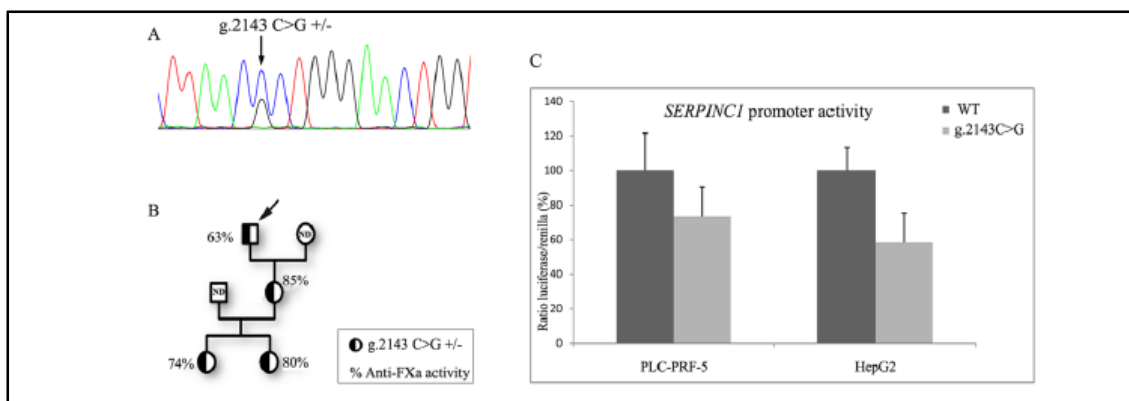


Figura 11. Identificación y caracterización funcional de la alteración g.2143 C>G en *SERPINC1*. **A)** Electroferograma de la mutación identificada. **B)** Árbol genético de la familia. El probando se marca con una flecha. ND: No determinado. Los niveles de actividad anti-FXa de la antitrombina plasmática de cada sujeto quedan reflejados. **C)** Ensayos que evalúan la actividad de luciferasa controlado por el promotor del gen *SERPINC1* con secuencia silvestre (WT) o con la mutación identificada (g.2143G) en las líneas celulares hepáticas HepG2 y PLC-PRF-5.

Por otra parte, el polimorfismo relativamente común rs2227589, localizado en el intrón 1, se ha asociado con un riesgo trombotico moderado con consecuencias funcionales sutiles en los niveles de antitrombina en plasma pero desconociéndose el mecanismos implicado [61].

La **Figura 12** muestra de forma resumida los potenciales elementos reguladores identificados hasta la fecha en el gen *SERPINC1*.

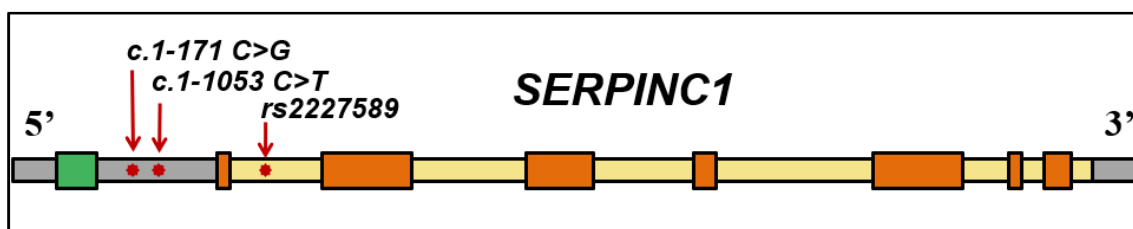


Figura 12. Potenciales elementos reguladores en el gen *SERPINC1*.

El análisis de casos con deficiencia de antitrombina en los cuales no existen defectos en exones y regiones flanqueantes de *SERPINC1* pueden servir como una aproximación excelente para identificar nuevos mecanismos asociados con deficiencia de este anticoagulante. Y entre los potenciales nuevos mecanismos, los defectos regulatorios podrían explicar algunos de los casos cuya causa de deficiencia es aún desconocida y de esta forma poder identificar nuevas regiones claves en el control transcripcional de este potente anticoagulante.

1.3 Vitamina D

1.3.1 Descubrimiento de la vitamina D

La historia de la vitamina D va ligada a la historia del raquitismo. En 1919, el pediatra Kurt Huldschinski observó que los niños afectados de esta enfermedad mejoraban cuando se exponían durante varios meses a la radiación producida por una lámpara de mercurio, afirmando así que esta exposición era un tratamiento efectivo [62]. En 1920, Edward Mellanby atribuyó la causa del raquitismo a deficiencias dietéticas y observó que ciertas grasas ejercían un efecto preventivo y curativo [63]. En un primer momento pensó que esa sustancia que servía de factor antirraquítico era la vitamina A, pero tres años más tarde, Elmer V McCollum publicó un estudio en el que demostró la existencia de una sustancia distinta que facilitaba el depósito de calcio, a la que denominó vitamina D [64, 65].

Años más tarde, la vitamina D fue aislada y su estructura esteroídica conocida, pero tuvieron que pasar más de 30 años desde su descubrimiento para que su mecanismo de acción quedara definido. No fue hasta la década de los 70 cuando su estructura química quedó establecida, y se logró progresar en la comprensión del proceso metabólico de la vitamina D y su actividad fisiológica. Estos descubrimientos hicieron posible sintetizar vitamina D en grandes cantidades, lo que se tradujo también en un control del raquitismo.

Hoy en día, el conocimiento de la implicación de la vitamina D en diferentes sistemas biológicos ha aumentado, aunque se sigue buscando mejorar sus aplicaciones clínicas.

1.3.2 Estructura y metabolismo de la vitamina D

La vitamina D se puede obtener en el organismo a través de la síntesis epidérmica, que representa entre un 60 y un 85% del aporte, o incorporarse a través de la ingesta alimentaria de origen vegetal (ergocalciferol o vitamina D_2 - $C_{28}H_{44}O$) u origen animal (colecalfiferol o vitamina D_3 - $C_{27}H_{44}O$). Los precursores de la vitamina D_2 y D_3 son el ergosterol y el 7-dehidrocolesterol, respectivamente (**Figura 13**) [66].

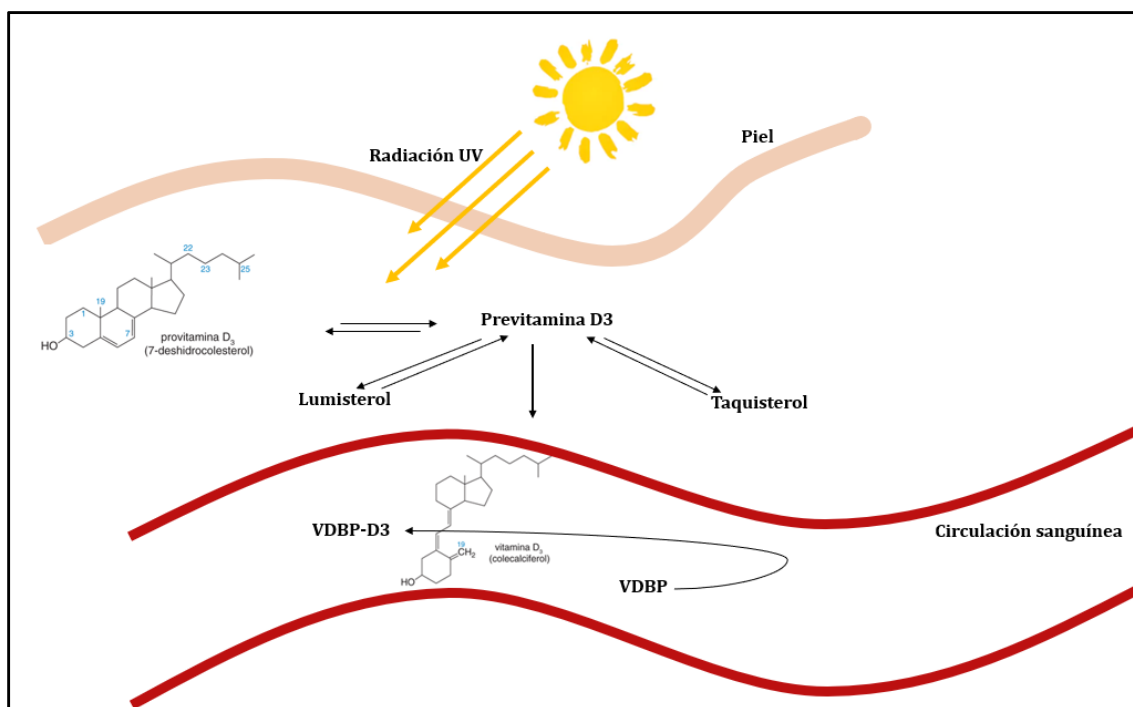


Figura 13. Síntesis de vitamina D₃ en la piel. Conversión de 7-dehidrocolesterol D₃ en previtamina D₃, lumisterol y taquisterol provocada por rayos UVAB en la piel. Conversión de previtamina D₃ a Vitamina D₃ y su transferencia al flujo sanguíneo junto a la proteína de unión VDBP.

La vitamina D₃ se produce en la epidermis por la acción de la radiación ultravioleta B (UVAB) procedente del sol que provoca la conversión del 7-dehidrocolesterol en pre-vitamina D₃, seguida de una isomerización química en vitamina D₃, en un proceso dependiente de temperatura [67-69]. Esta producción está altamente regulada, de manera que cuando se alcanzan concentraciones suficientes, la isomerización se da a formas inertes (lumisterol o taquisterol) y la vitamina D en exceso se degrada a formas inactivas biológicamente (**Figura 13**) [70].

La vitamina D₃ es precursora de otros metabolitos. Se almacena en el tejido adiposo, pero podemos encontrarla en la circulación sanguínea en forma libre (0,05%), unida a albúmina (10-20%), o unida a una proteína de unión llamada *Vitamin D Binding Protein* (VDBP) (80-90%) [71]. La VDBP es una glicoproteína transportadora específica, estructuralmente formada por una única cadena polipeptídica (α -globulina) con afinidad preferencial para las formas 25-hidroxisas (**Figura 13**) [69, 72].

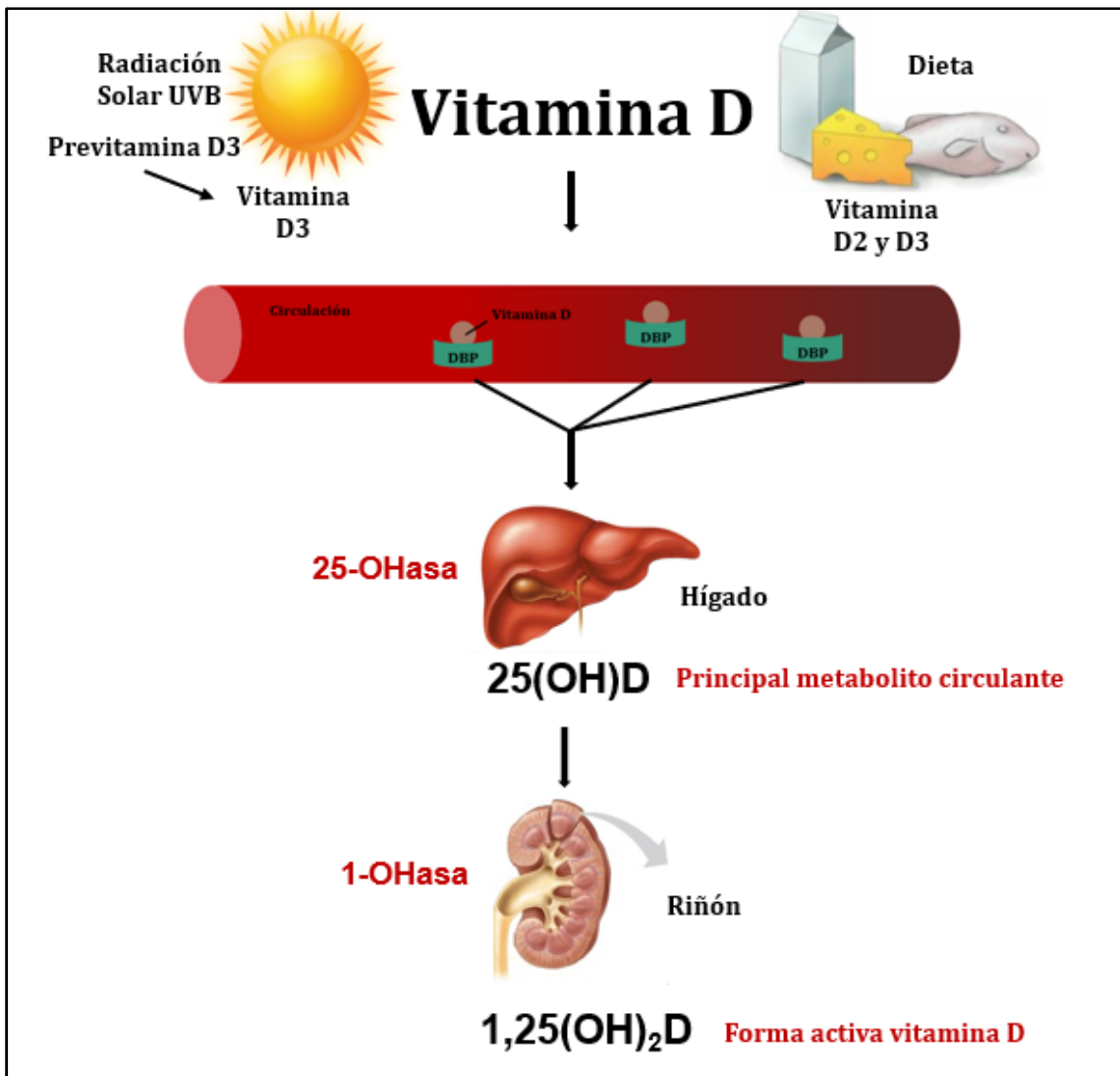


Figura 14. Metabolismo de la vitamina D. La vitamina D se hidroxila a 25(OH)D en el hígado- metabolito circulante más abundante. La 25(OH)D es transformada en el riñón en 1,25(OH)₂D- metabolito activo.

La presencia en sangre de la vitamina D3 unida a VDBP es breve, ya que es la encargada de transportarla rápidamente hasta el hígado. Es aquí donde tendrá lugar la primera hidroxilación del carbono 25. Esta reacción está mediada por la enzima hepática 25α-hidroxilasa que forma parte de un sistema enzimático dependiente del citocromo P-450 (CYP27B1) presente en las mitocondrias y microsomas hepáticos. Tras este proceso se genera 25-hidroxivitaminaD 25(OH)D, que aunque no tiene actividad biológica, es el metabolito circulante más abundante y su vida media es de aproximadamente 3-4 semanas, por lo que su cuantificación se emplea para evaluar el estatus corporal de vitamina D [73]. La 25(OH)D es transportada nuevamente por la VDBP hasta el riñón, donde es filtrada por el glomérulo renal y captada por las células del túbulo renal. Las células tubulares poseen dos enzimas hidroxilasas: 1α-hidroxilasa (CYP27B1), encargada de transformar la 25(OH)D en 1,25 dihidroxivitaminaD 1,25(OH)₂D, metabolito hormonalmente activo responsable de la actividad biológica de la vitamina D, y la enzima 24α-hidroxilasa (CYP24A1) que realiza la transformación de la forma 25(OH)D en la 24,25

dihidroxitaminaD 24,25(OH)₂D, que, aunque inactivo, es el metabolito dihidroxilado más abundante en el suero (**Figura 14**) [74].

Por lo tanto, para que la vitamina D₃ pueda ser biológicamente activa se requieren dos hidroxilaciones en secuencia, la primera tiene lugar en el hígado y la segunda en el riñón (**Figura 14**). Es por esta razón que la vitamina D tiende a ser considerada una hormona, ya que debe sufrir una serie de transformaciones en diferentes órganos, hasta alcanzar su forma activa que será la responsable de actuar sobre distintos órganos diana [75].

La forma 1,25(OH)₂D también es conocida como calcitriol. Este metabolito activo es transportado por la VDBP hasta las células dianas que disponen de receptores específicos. En estas células, el calcitriol actúa sobre el VDR y mediante la regulación transcripcional de genes a través de los VDREs, regula diferentes procesos.

En cuanto a los niveles de vitamina D₃, debemos mencionar que cualquier factor que afecte a la radiación UVAB incidente, estación del año y latitud geográfica, hora del día, fenómenos atmosféricos, altitud, fototipo de piel, etc., va a tener consecuencias sobre su producción endógena. De hecho, durante el invierno, en toda la península ibérica los rayos solares inciden en la atmósfera con una inclinación que hace que los rayos UVAB pierdan su actividad foto-conversora, de tal modo que la síntesis de vitamina D₃ es poca o nula.

Además de estos factores, la propia regulación de la síntesis de vitamina D depende de varios elementos. Los más importantes son los depósitos de vitamina D, el papel de la hormona paratiroidea (PTH), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) y los niveles de calcio y fósforo plasmáticos, que actúan a través de diferentes mecanismos de retroalimentación [76].

Aunque es más común encontrarnos con casos de deficiencia, también es posible prevenir un exceso de vitamina D₃. Existe una vía de inactivación de metabolitos que tiene lugar a través de una hidroxilación adicional que realiza la CYP24A1 presente en los microsomas de las células hepáticas.

1.3.3 Acciones genómicas y no genómicas de la vitamina D

La vitamina D ejerce su efecto biológico a través de dos mecanismos: en el núcleo (vía genómica) o a nivel de membrana (vía no genómica) (**Figura 15**).

La proteína transportadora DBP (*Vitamin D Binding Protein*) participa en la interiorización celular del 1,25(OH)₂D, responsable del paso desde el citoplasma al núcleo.

La vía genómica es semejante a la de los esteroides, y para que se ejerza regulación transcripcional, es necesario que la hormona forme antes un complejo con el receptor intracelular. La vitamina D₃ se une a su receptor VDR, forma un complejo activado y entra al núcleo donde se une al receptor RXR dando lugar a un heterodímero VDR-RXR. Este heterodímero se une a su secuencia específica del DNA denominada VDRE (**Figura 15 y 16**).

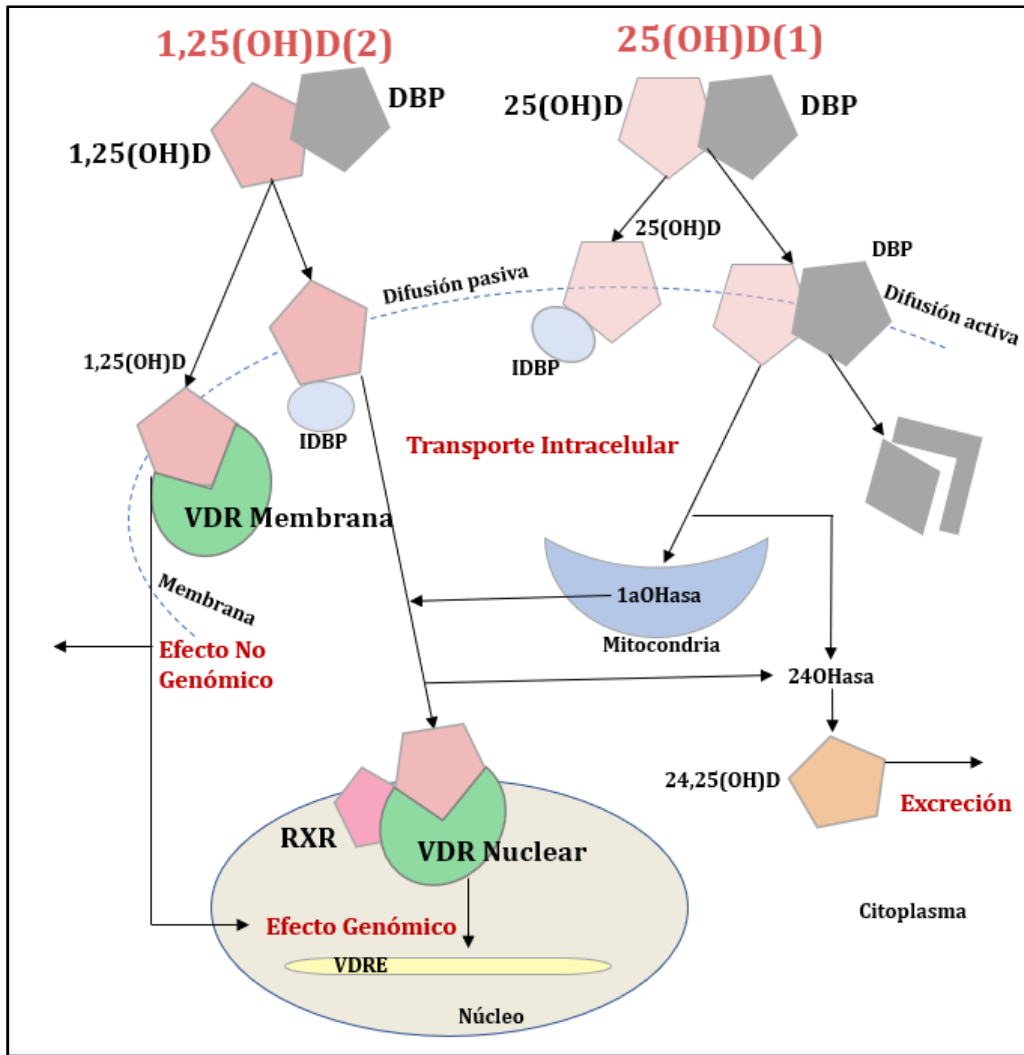


Figura 15. Representación esquemática de vías genómicas y no genómicas de la vitamina D.

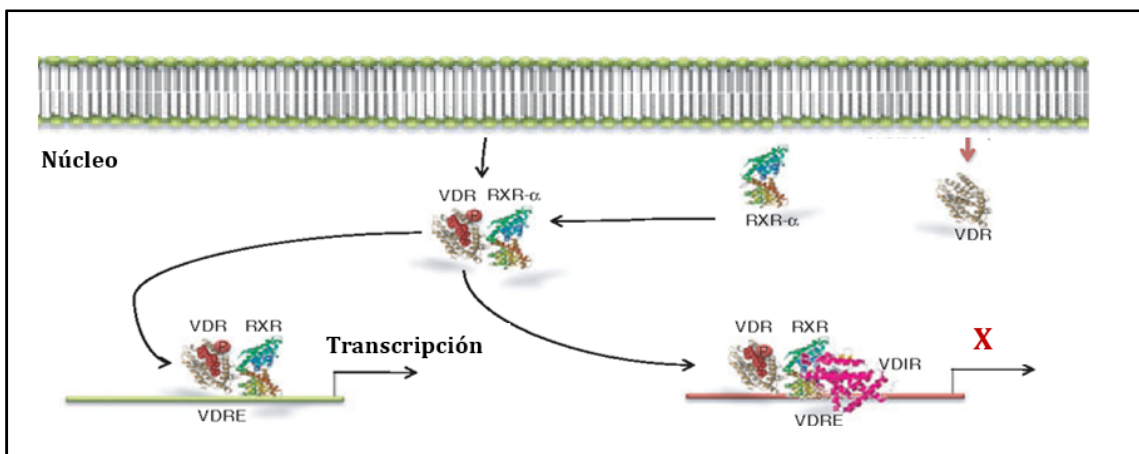


Figura 16. Acción genómica de la vitamina D a través de su receptor nuclear VDR tras unirse a elementos de respuesta a vitamina D en su gen diana. VDR: receptor de vitamina D; RXR: receptor X del ácido retinoico; VDRE: elemento de respuesta a vitamina D. Imagen modificada de "Vitamin D3: an ever green molecule" Di Rosa M et al., 2013. Frontiers in Bioscience.

Esta unión al ADN tiene efectos sobre la tasa transcripcional del gen como activador o represor, dependiendo del entorno en el que los elementos VDRE estén presentes. Por todo ello, la vitamina D va a poder afectar la tasa de síntesis de las proteínas codificadas por genes que contienen estos elementos [77].

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ también puede unirse a los VDR presentes en membranas para dar lugar a respuestas no genómicas, produciendo segundos mensajeros. La absorción de Ca^{+2} en el duodeno, la apertura de los canales de Cl^- y la secreción de insulina por células pancreáticas β , son algunos ejemplos de respuestas rápidas mediadas por la vitamina D₃. La regulación de la homeostasis calcio-fósforo a través de acciones y órganos diana tradicionales se denominan funciones clásicas de la vitamina D.

Además de estas funciones clásicas, la vitamina D tiene multitud de funciones denominadas no clásicas, que a través de acciones auto y paracrinas ejercen un papel importante en otros órganos y sistemas. Podría tener implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas en distintas enfermedades inmunes, cáncer y enfermedad vascular, entre otras, como la inmunomodulación, control de la secreción hormonal, inhibición del crecimiento celular y la inducción de la diferenciación celular [78, 79].

Las respuestas genómicas son por lo tanto lentas, y son necesarias horas o días en hacerse notar, a diferencia de la vía no genómica o a nivel de membrana que da lugar a respuestas más rápidas.

1.3.4 Estructura del receptor de la vitamina D

El receptor de la vitamina D, pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares, y dentro de ésta a la subfamilia que incluye los receptores de las hormonas tiroideas, los receptores retinoides y los receptores activados del proliferador de peroxisomas [80]. EL VDR actúa como factor de transcripción respondiendo a la forma activa de la vitamina D [81]. La afinidad del VDR por la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ es alrededor de tres veces mayor que la que tiene por los demás metabolitos de la vitamina D, por lo que en condiciones fisiológicas estos otros metabolitos no estimulan las acciones dependientes del receptor [82].

En humanos, el VDR es un polipéptido intracelular que contiene 427 aminoácidos y un peso molecular de 50 kDa codificado por un gen compuesto por 9 exones y varias regiones no codificantes en posición 5', localizado en el cromosoma 12 (12q13.11) (**Figura 17**) [83]. Se han descrito distintos polimorfismos del gen en las regiones no codificadoras, pudiendo modificar su funcionalidad sin alterar la estructura final del receptor [84].

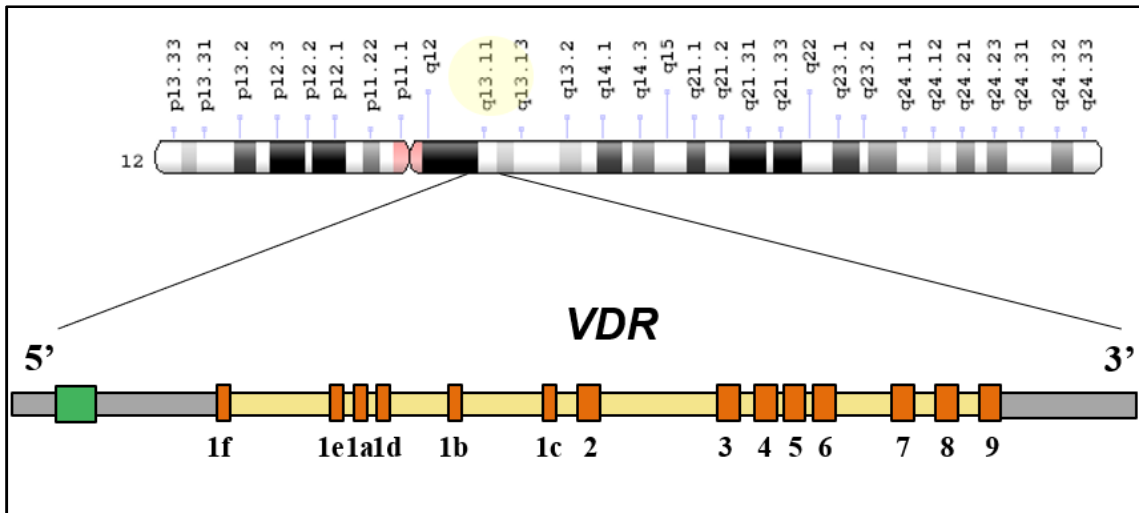


Figura 17. Localización cromosómica del gen *VDR*, organización genómica y dominios funcionales. Se muestra la zona del promotor en color verde, los 9 exones en color naranja y las zonas intrónicas en amarillo.

El *VDR* presenta varios dominios funcionales: dominio de unión a ligandos (LBD-*Ligand binding domain*) responsable de la unión a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, de la dimerización y la activación de la transcripción; regiones de heterodimerización con el receptor RXR, dominio de unión al ADN (DBD-*DNA binding domain*) y lugar de unión a proteínas nucleares co-reguladoras (**Figuras 17 y 18**) [85, 86]. En el dominio de unión al ADN se localizan los motivos denominados dedos de zinc, responsables de la interacción de alta afinidad con los VDREs de la región promotora de los genes diana de la vitamina D (**Figura 18**) [78, 87].

Estos VDREs se caracterizan por una secuencia consenso que está formada por repeticiones directas de 6 bases separadas por 3 o 9 bases. El hexámero presenta una secuencia con dos posiciones variables [88]. Análisis de varias líneas celulares humanas han identificado más de 100 genes que presentan regiones VDREs [89, 90].

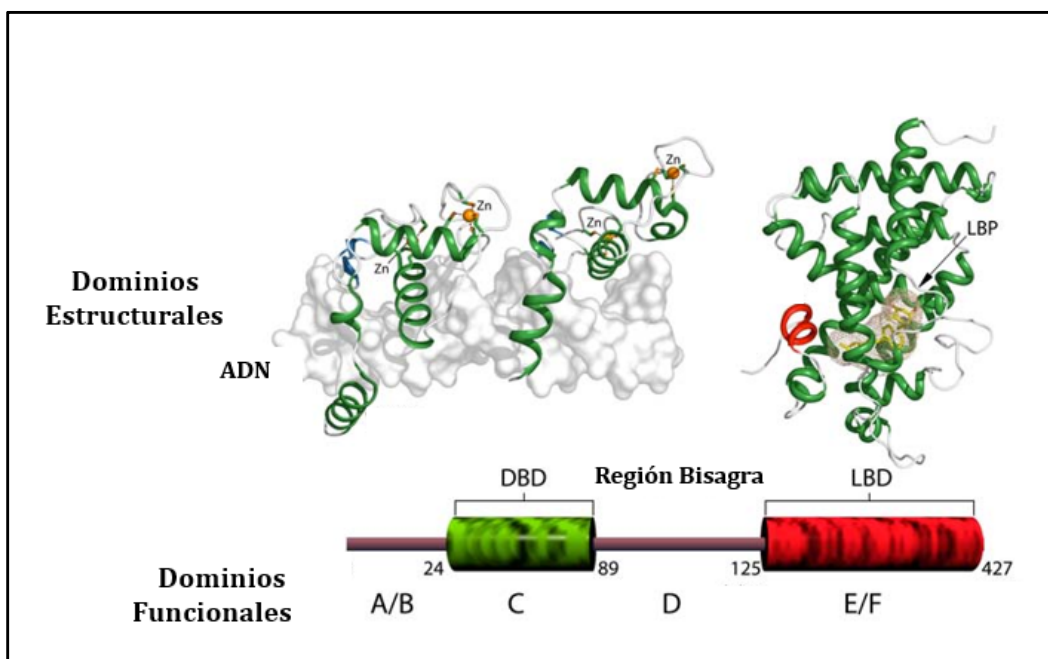


Figura 18. Dominios estructurales y funcionales del receptor nuclear VDR. Representación de los dominios estructurales: DBD-dominio de unión al ADN, LBD-dominio de unión a ligando, unidos a través de la región bisagra. La secuencia primaria de aminoácidos del VDR está dividida en 5 dominios funcionales, representados con letras de A-F. La región N-terminal o A/B contiene el dominio de activación. La región C consiste en el dominio de unión al ADN. La región D o bisagra conecta al DBD con la región E/F que contiene el dominio de unión al ligando (LBD). Modificado de Carlberg y Ferdinand Molnár et al.,2012 [91].

El gen que codifica el VDR tiene una longitud aproximada de 100 kb y está formado por 9 exones (**Figura17**). Los exones 1f, 1e, 1a, 1d, 1b, 1c forman la parte 5' no codificante (5'-UTR). Por ello, el polipéptido que se produce es resultado de 8 exones (exones 2-9) [92]. La existencia de tres posibles promotores que varían según el tipo celular que expresa el VDR, junto al procesamiento alternativo, da lugar a la generación de hasta 14 transcritos específicos identificados en diferentes tejidos en humanos [92, 93].

Numerosos trabajos han estudiado la importancia fisiológica y patológica de diferentes polimorfismos que afectan la región 5'-UTR, la región codificante y la región 3'-UTR del gen *VDR*. A continuación, mostramos aquellos dos con mayor evidencia de su efecto funcional:

rs2228570: Fok1

El polimorfismo rs2228570 consiste en un cambio de una base T por una C que genera una secuencia reconocida por la enzima de restricción Fok1. El cambio afecta a la metionina iniciadora (Met1) en el exón 2. Cuando la variante C está presente, el codón de inicio de traducción desaparece, aunque la proteína se puede sintetizar, ya que la traducción se inicia en la Met4, por lo que genera una proteína más corta, que sin embargo presenta mayor actividad transcripcional [94, 95].

rs4516035: Bsr1

Es conocido también como GATA debido a que el cambio de una base A por G afecta a la secuencia GATA del promotor. El genotipado de este polimorfismo se realiza empleando la enzima de restricción Bsr1. El alelo polimórfico G elimina el sitio de reconocimiento de GATA, reduce la actividad transcripcional del promotor *VDR* y se asocia con menores niveles de expresión [96].

El *VDR* se expresa en altos niveles en tejidos implicados en la homeostasis del calcio, como el intestino, los osteoblastos, la paratiroides, las células de los túbulos proximal y distal del riñón. También existen receptores en otros tejidos como la epidermis, tejido adiposo, el músculo, el páncreas y los órganos reproductores [97]. La presencia de expresión de *VDR* en tantos tejidos diferentes, refleja la acción pleiotrópica de la vitamina D, siendo esta presencia necesaria para ejercer las acciones metabólicas clásicas o no clásicas [98].

1.4 Ácidos biliares

1.4.1 Aspectos generales de los ácidos biliares

Los ácidos biliares (ABs) son moléculas anfipáticas de tipo esteroide que constituyen los principales componentes de la bilis y que derivan de la bioconversión o modificación química del colesterol en los hepatocitos [99]. La formación y correcta composición de la bilis es esencial para una normal digestión y absorción de lípidos a nivel intestinal, el mantenimiento de la homeostasis del colesterol y una correcta excreción hepática de sustancias. La bilis secretada está compuesta principalmente por aproximadamente un 67% de sales biliares, de las cuales la mayoría son eficientemente reabsorbidas a lo largo del intestino delgado, devueltas al hígado mediante la circulación portal y secretadas de nuevo a la bilis. Este flujo continuo de sales biliares es denominado circulación enterohepática, y asegura que del total de sales biliares de un humano adulto únicamente se pierda un 5% mediante excreción fecal. Esta pérdida es compensada por la síntesis de nuevas sales biliares hepáticas a partir del colesterol [100].

1.4.2 Estructura de los ácidos biliares

Los ABs, a diferencia del colesterol cuyo esqueleto esteroide presenta 27 átomos de carbono, sufren un acortamiento de la cadena lateral durante su proceso de síntesis dando lugar a ABs de 24 átomos de carbono que se diferencian entre ellos en el número, posición y orientación de los grupos hidroxilo y en determinadas situaciones por la presencia de dobles enlaces [101]. El núcleo esteroide es un anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno que consta de 3 anillos de 6 átomos de carbono (A, B y C) y uno de 5 carbonos (D). Una característica estructural común a todos los ABs es la presencia de 3 grupos metilo situados en las posiciones 10, 13 y 20. En el carbono 17 tienen una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono que finaliza en un grupo carboxilo. Los ABs pueden estar saturados, mono o polihidroxilados y el grupo carboxilo de la cadena lateral suele estar conjugado con glicina o taurina (**Figura 19**) [102].

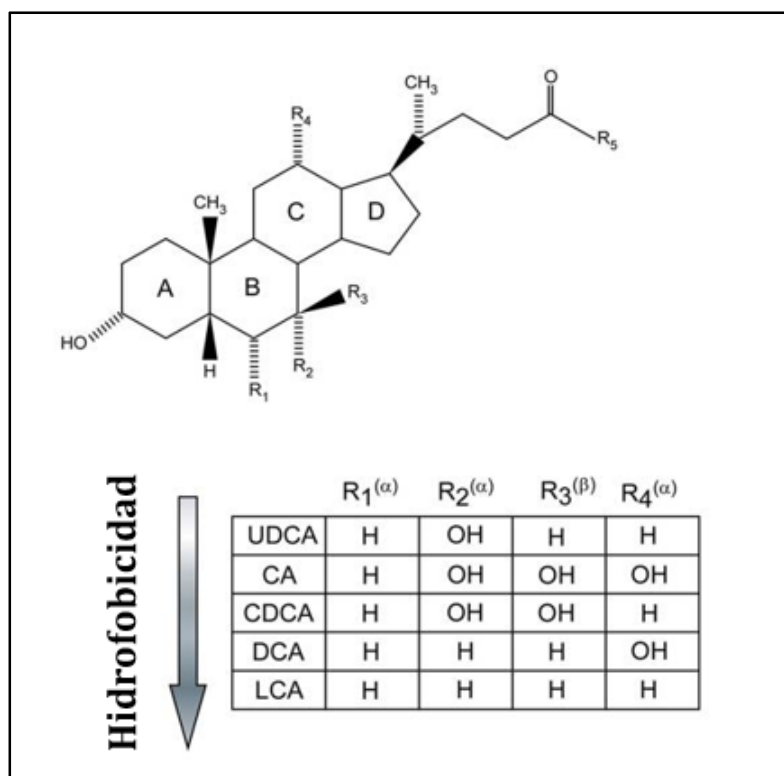


Figura 19. Estructura y perfil de hidrofobicidad de los ácidos biliares (ABs). El ácido cólico (CA), el ácido quenodesoxicólico (CDCA) y el ácido ursodesoxicólico (UDCA) son ABs primarios, mientras que el ácido desoxicólico (DCA) y el ácido litocólico (LCA) son ABs secundarios. Los grupos hidroxilo en orientación α se localizan por debajo del núcleo esteroide y son axiales con respecto al plano del núcleo esteroide. Los grupos hidroxilo en orientación β se localizan por encima del núcleo esteroide y son ecuatoriales al plano del núcleo esteroide. Los ABs ordenados de menos a mayor hidrofobicidad: UDCA, CA, CDCA, DCA, LCA.

Los ABs pueden dividirse en tres grupos: primarios, secundarios y terciarios. El ácido cólico (ácido $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihidroxi- 5β -colanoico) (CA) y ácido quenodesoxicólico (ácido $3\alpha,7\alpha$ -dihidroxi- 5β -colanoico) (CDCA), sintetizados directamente por el hígado, obtenidos directamente a partir del colesterol, se denominan AB primarios. Los AB secundarios, como son el ácido desoxicólico (ácido $3\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colanoico) (DCA) y el ácido litocólico (ácido 3α -hidroxi- 5β -colanoico) (LCA), se obtienen de la conversión de los ácidos primarios mediante dos posibles vías de síntesis, que más adelante explicaremos con más detalles [103].

Las modificaciones químico/bacteriana que experimentan en el hígado o en el intestino los ABs secundarios dan lugar a los denominados ABs terciarios, entre los que se encuentra el ácido ursodesoxicólico (UDCA), que es la forma epimérica en la posición 7 del CDCA. Esta última sal biliar posee diversas aplicaciones terapéuticas, empleándose como fármaco debido a que disminuye el contenido de colesterol. En su presencia, la bilis se hace más fluida y el riesgo de formación de cálculos biliares se reduce significativamente. Actualmente se utiliza en el tratamiento de la cirrosis biliar primaria y como terapia adyuvante en diversos tipos de enfermedades colestáticas hepatobiliares [104].

1.4.3 Biosíntesis de los ácidos biliares

La transformación del colesterol en ABs implica varias modificaciones estructurales y múltiples pasos enzimáticos catalizados por enzimas expresadas predominantemente en el hígado.

Estas transformaciones que ocurren tanto en el núcleo del esteroide como en la cadena, pueden tener lugar mediante dos rutas metabólicas: la ruta clásica o la alternativa. Los productos inmediatos de las vías de síntesis de ABs son los denominados ABs primarios y los pasos que dan lugar a su formación incluyen: la hidroxilación del colesterol en la posición C7 del anillo esteroide o en las posiciones 24, 25 y 27 de la cadena lateral, diversas modificaciones del anillo esteroide y, por último, un acortamiento de la cadena lateral.

En la primera etapa de la denominada ruta clásica de biosíntesis de ABs, el paso de hidroxilación es catalizado por la enzima microsomal colesterol 7 α -hidroxilasa CYP7A1. Esta reacción produce 7 α -hidroxicolesterol, y es la etapa limitante sujeta a complejos mecanismos de control que regulan su actividad. Esta modificación del núcleo del esteroide y la ruptura oxidativa de la cadena lateral da lugar a la formación del CA y DCA en cantidades similares. Al final de esta ruta se produce una conjugación con los aminoácidos glicina o taurina [105].

Las moléculas de colesterol hidroxiladas en las posiciones 24, 25 y 27 de la cadena lateral pueden servir de sustratos para la síntesis de ABs, pero sólo la síntesis a partir de 27-hidroxicolesterol tiene lugar en cantidades relevantes por medio de lo que se conoce como ruta alternativa o ácida.

En la ruta alternativa, el anillo esteroide sufre modificaciones y se forman metabolitos intermedios ácidos. El oxisterol es sintetizado por la esterol 27-hidroxilasa mitocondrial CYP27A1 en una reacción considerada como la etapa limitante de esta ruta. Para su conversión en AB, el 27-hidroxicolesterol debe sufrir 7 α -hidroxilación por la enzima microsomal CYP7B1. El principal producto de esta vía es el CDCA (**Figura 20**) [103].

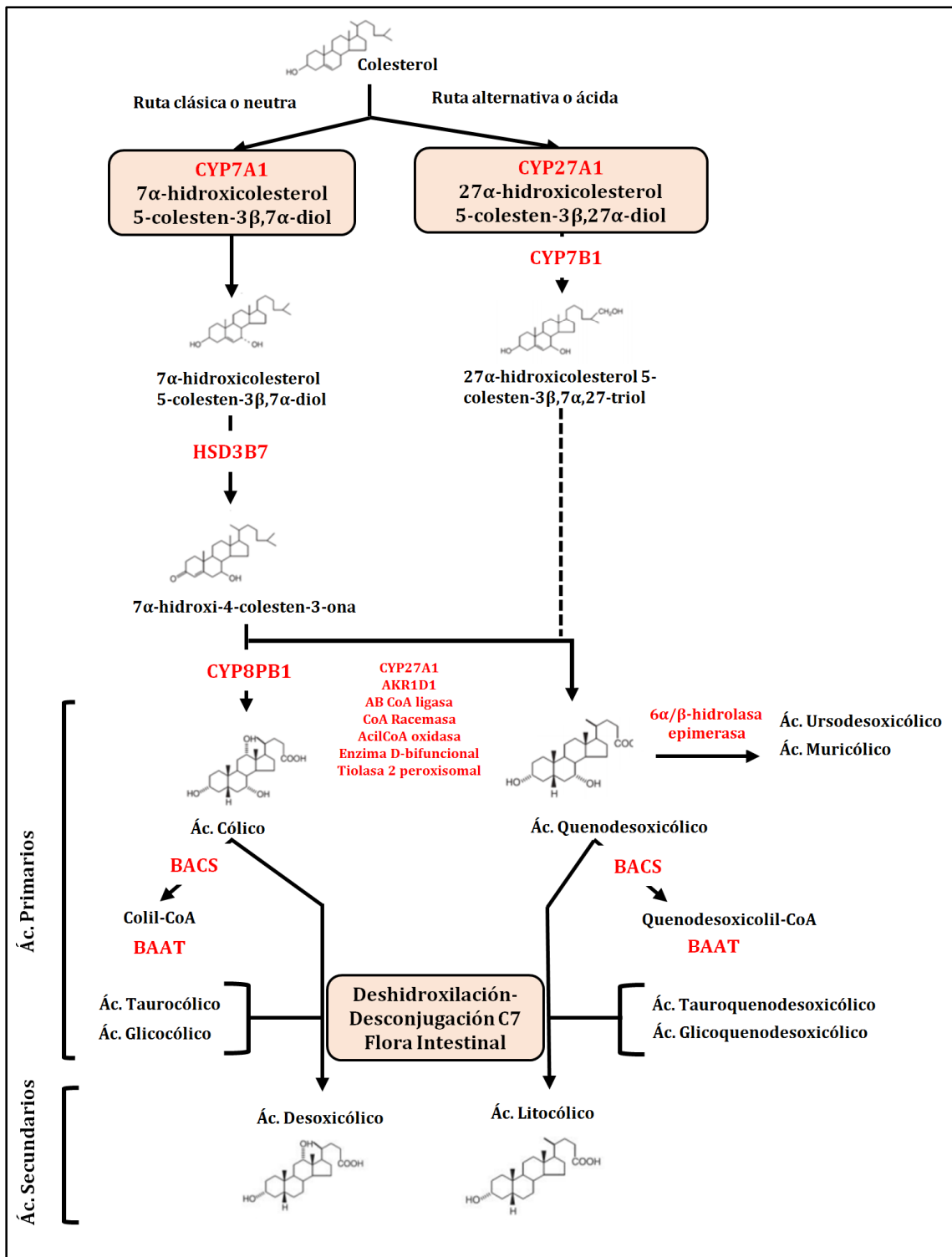


Figura 20. Rutas de la síntesis de ABs en humanos. Se muestran las principales reacciones enzimáticas que tienen lugar en el hígado durante la síntesis de ABs a partir del esqueleto de colesterol, en la ruta clásica y alternativa. Las enzimas que participan se señalan en color rojo.

Los intermediarios 7 α -hidroxi formados por CYP7A1 y CYP7B1 son modificados por la enzima 3-beta-hidroxi-delta-5-C27 (HSD3B7). Los productos de esta reacción pueden seguir dos rutas dando lugar a CA o CDCA, dependiendo de si interaccionan con la enzima 12 α -hidroxilación CYP8PB1 o no. De esta forma, la actividad de esta enzima

determina la proporción en que los ABs primarios están siendo formados y por lo tanto influye en las propiedades biológicas y fisicoquímicas del *pool* de ABs [106].

Tras estas modificaciones, los siguientes pasos en la cascada biosintética implican la oxidación y acortamiento progresivo de la cadena lateral. En el proceso de acortamiento actúa la enzima CYP27A1 mitocondrial y varias enzimas localizadas en los peroxisomas. En humanos el producto final de esta ruta es el CA y CDCA. Sin embargo, en el ratón y en el oso, el CDCA es convertido en ácidos muricólicos y UDCA, respectivamente.

Parece ser que la vía clásica es la mayoritaria en la biosíntesis de ABs en condiciones fisiológicas. Sin embargo, la vía alternativa puede adquirir un papel fundamental en pacientes con algunas enfermedades hepáticas, y es la vía predominante durante la vida fetal [106].

La presencia de estos ABs en un medio de pH superior a su pKa provoca la transformación a las correspondientes sales biliares con propiedades surfactantes y cuya acumulación puede volverse potencialmente tóxica, ya que las membranas biológicas que están compuestas de una gran cantidad de fosfolípidos y colesterol, pueden llegar a ser solubilizadas provocando una pérdida de su capacidad de permeabilización [107]. Aunque realmente son pocos los estudios que analizan cómo una modificación del balance hidrófilo-hidrófobo de las sales biliares puede tener consecuencias en sus propiedades asociativas, lo que sí se ha comprobado es que los ABs tienen una gran tendencia a la autoasociación, originando diferentes estructuras, como pueden ser micelas, fibras, geles y nanotubos [108].

1.4.4 Conjugación de los ácidos biliares

Antes de ser secretados al lumen del canalículo biliar, los ABs son conjugados en sus cadenas laterales con taurina o glicina, con el objetivo de mejorar su hidrofiliidad. En este proceso están implicadas las enzimas AB-CoA sintetasa (BACS) y AB CoA: aminoácido N-aciltransferasa (BAAT) [109]. Esta reacción de conjugación es muy eficiente, estando prácticamente todos los ABs en la bilis conjugados [105].

1.4.5 Papel fisiológico y enfermedades por acumulación de ácidos biliares

En el hígado, la secreción de ABs genera el flujo biliar y estimula la contracción canalicular que colabora en el bombeo de la bilis hacia los conductos colectores del sistema biliar. Además, inducen la secreción de lípidos biliares, principalmente fosfolípidos y colesterol, modulando la síntesis de éste. El flujo de ABs a través del hepatocito, determinará también la cantidad de los receptores de membrana para las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En la bilis, los ABs forman micelas que transportan sustancias hidrofóbicas y actúan como tampones para el calcio. Una vez presentes en el intestino, estas micelas emulsionan las grasas y vitaminas liposolubles de la dieta, facilitando así su absorción, modulando la actividad de proteasas, induciendo la secreción de agua y electrolitos, activando lipasas intestinales y provocando la secreción de hormonas gastrointestinales [110].

Las sales biliares juegan también un papel en la homeostasis energética inhibiendo la obesidad inducida por la dieta y previniendo el desarrollo de resistencia a la insulina

[111]. Se ha demostrado su participación en el control de la proliferación y apoptosis en los tejidos donde estas moléculas se encuentran en concentraciones elevadas [112].

Por otro lado, se ha estudiado su posible acción genotóxica observándose que los ABs secundarios, generados por la transformación bacteriana, tienen un poder genotóxico mayor que los ABs primarios producidos por el hígado, lo que parece que puede estar relacionada con el mayor o menor carácter hidrofóbico de las distintas especies de ABs [113].

Las sales biliares juegan así un papel importante en gran variedad de enfermedades. Cuando se produce la obstrucción del flujo de la bilis hablamos de desajustes colestáticos en el hígado, la presencia de cálculos biliares se traduce en colecistitis, y una inflamación del páncreas provocada por problemas en las vías biliares provoca pancreatitis.

La colestasis es una condición patológica caracterizada por una reducción o ausencia del flujo biliar, que puede deberse a defectos funcionales en el proceso de formación de la bilis a niveles de los hepatocitos o colangiocitos, o a obstrucciones del flujo biliar a nivel de los conductos biliares, debida a la presencia de cálculos biliares o a tumores. La principal consecuencia de la alteración del flujo biliar es la acumulación de productos potencialmente tóxicos que provocan un proceso de inflamación y fibrosis hepática que puede desembocar en cirrosis, cáncer o fallo hepático.

En el caso de las colestasis obstructivas, la cirugía es una terapia efectiva. Sin embargo, en las no obstructivas el único tratamiento farmacológico reconocido hasta el momento es el uso de UDCA, el cual reduce la hidrofobicidad y toxicidad del *pool* de ABs [104, 114]. Esta escasez de tratamientos eficaces ha hecho que la investigación en este campo centre en la búsqueda de fármacos que reduzcan la hidrofobicidad y el tamaño del *pool* de ABs. La reciente identificación de receptores nucleares implicados en la regulación de los ABs ha provocado que estemos ante una nueva diana terapéutica para el manejo de esta patología [115].

1.4.6 Ácidos biliares como moduladores genéticos

Además de su ya conocido papel en la absorción de lípidos, los ABs se han considerado en los últimos años como moléculas de señalización metabólica y potentes reguladores de la transcripción génica, actuando como hormonas que a través de receptores nucleares modulan la expresión de proteínas [116-119]. Los ABs adoptan así un papel hasta ahora desconocido en el control de la expresión génica, involucrándose en multitud de procesos biológicos y jugando un papel en la homeostasis celular, más allá de su clásica función detergente.

Se sabe que muchos de los genes codificantes para proteínas implicados en la síntesis, metabolismo y transporte en la circulación enterohepática están estrictamente controlados por estos compuestos a través de la activación de receptores nucleares y sus cascadas de señalización. También, los ABs, tienen funciones más específicas actuando como integradores metabólicos en el control de la utilización de las grasas, los azúcares y en el metabolismo energético, a través de la modulación de la expresión génica [120].

1.5 Receptores nucleares

1.5.1 Aspectos generales y mecanismo de acción de los receptores nucleares

Los receptores nucleares (RNs) actúan como factores de transcripción activados por ligando, modulando la expresión de diferentes genes diana e interviniendo en multitud de procesos como la diferenciación, apoptosis, crecimiento y el metabolismo, entre otros [31, 121].

Se trata de una superfamilia de más de 150 proteínas solubles, de las cuales 48 tipos distintos se han identificado en humanos [122]. Son responsables de mediar entre las señales extracelulares y la respuesta transcripcional y actúan uniéndose al ADN de sus genes diana mediante elementos de respuesta a hormonas (HREs) [123]. En general, estos elementos de respuesta son hexámeros cuya secuencia es AGGTCA, pero la manera de unirse varía de un tipo de receptor a otro. La forma en la que aparecen estos elementos de respuesta, muestra la especificidad de la unión del receptor nuclear al ADN del gen diana. Los hexámeros de los elementos de respuesta de los RNs que forman homodímeros o heterodímeros pueden presentarse como secuencias DR (*direct repeats* AGGTCA_nAGGTCA), ER (*everted repeats* TGACCT_nAGGTCA) o IR (*inverted repeats* AGGTCA_nTGACCT) donde “n” es el número de nucleótidos [124]. Otra diferencia en cuanto a la estructura de los RNs es que podemos encontrarlos formando monómeros, homodímeros o heterodímeros [125].

De acuerdo a las características de sus ligandos, orientación del ADN y su modo de acción, los RNs se subdividen en cuatro grupos [126] (**Figura 21**).

El primer grupo está representado por los clásicos RNs esteroides cuyo ligando son hormonas esteroideas. Entre los conocidos: glucocorticoides (GR), mineralcorticoides (MR), estrógenos (ER), andrógenos (AR) y progesteronas (PR). Esta clase de receptores se unen al ADN, a secuencias con repeticiones IR, como homodímeros. Sus ligandos se sintetizan exclusivamente en sistemas endocrinos regulados por el control de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis, y se distribuyen hasta sus tejidos diana uniéndose con alta afinidad a sus receptores.

El segundo grupo lo forman los RNs de tipo II que funcionan como heterodímeros juntos al RXR. Entre estos receptores se encuentran los receptores para los ácidos grasos (PPARs-Receptor activado por proliferador de peroxisoma), oxisteroles (LXRs-Receptor X del hígado), ácidos biliares (FXR-Receptor X farnesoide), esteroides y xenobióticos (SXR/PXR-Receptor pregnano X y CAR-Receptor constitutivo de androstano), la hormona tiroidea (TR), el ácido retinoico (RAR) y la vitamina D (VDR). Se unen a sus ligandos, que suelen ser de tipo lipídico, con menor afinidad y cuyas concentraciones varían por la ingesta dietética.

El tercer tipo de receptores son similares a los de tipo I, ya que ambos se unen al ADN en forma de homodímeros. Sin embargo, al contrario de lo que sucede con los del primer tipo, los receptores tipo III se unen a repeticiones del tipo DR en el ADN. Se denominan receptores huérfanos debido a que sus ligandos aún son desconocidos.

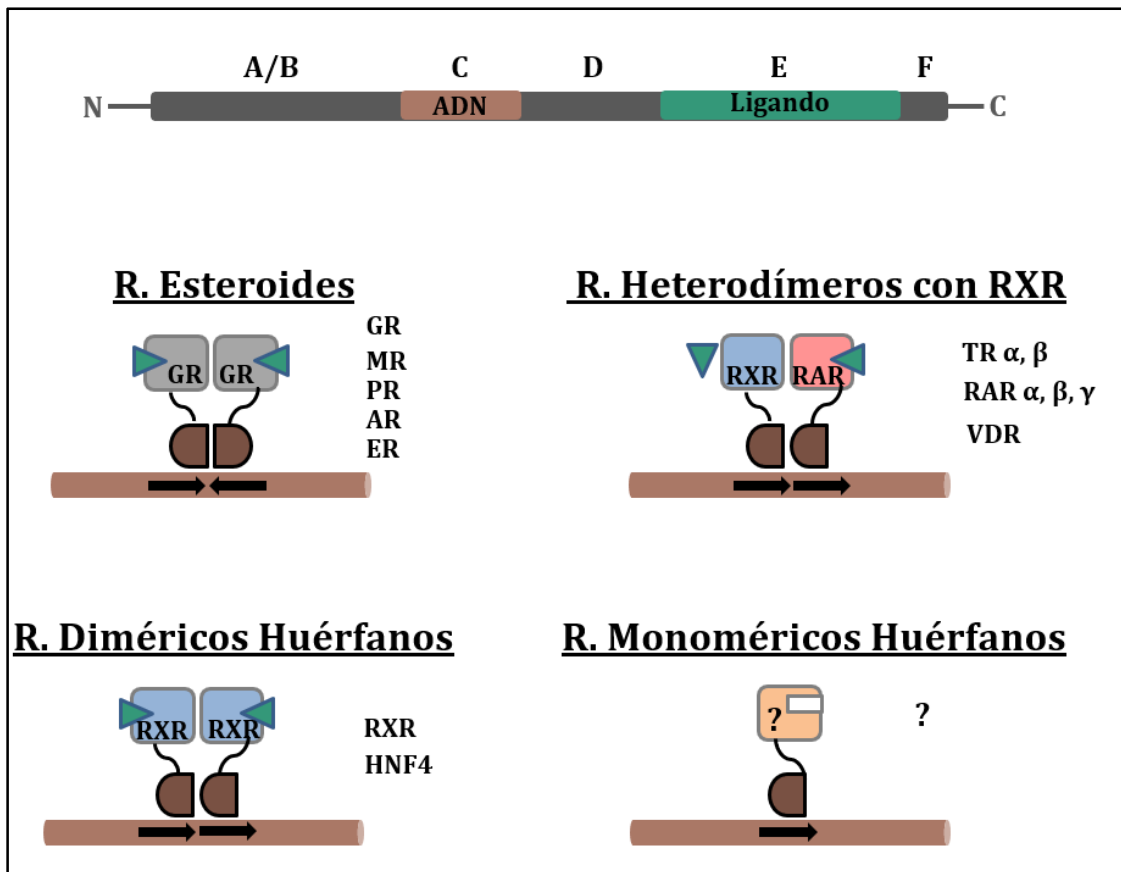


Figura 21. Estructura y tipos de receptores nucleares. (A) Representación esquemática de los dominios funcionales de los receptores nucleares representados con letras de A-F: región N-terminal (A/B) que contiene el dominio de activación transcripcional AF-1, región conservada de unión a ADN o DBD, (C), región bisagra (D), región conservada de unión a ligando o LBD (E), región C-terminal que contiene el segundo dominio de transactivación AF-2 (F). **(B)** Clasificación de receptores nucleares según su unión a ligando, ADN o dimerización: Receptores esteroides, Receptores Heterodímeros con RXR, Receptores Diméricos Huérfanos, Receptores Monoméricos Huérfanos.

Hay un cuarto tipo de receptores nucleares llamados también receptores huérfanos de ligando, que se unen al ADN en forma tanto monomérica como dimérica, pero sólo uno de los dominios de unión a ADN se une a la mitad de la secuencia del HRE [127]. Incluyen miembros de la mayoría de subfamilias de RNs.

Sin embargo, el mecanismo de acción de los RNs no está totalmente definido. La hipótesis clásica defiende que los RNs cambian su conformación cuando se unen a su ligando en el citosol, lo que permite su translocación al núcleo, la unión a su gen diana, permitiendo su transcripción [128]. Otros estudios defienden que el RN ya está previamente unido al ADN de sus genes diana junto a correpresores, y es el ligando el encargado de liberarlos, permitiendo el reclutamiento de coactivadores [129]. A continuación, vamos a definir las dos vías de señalización conocidas.

1.5.2 Vías de señalización genómica de los RNs

La vía de señalización genómica o clásica de los RNs comienza cuando el ligando se une al dominio LBD. Como resultado de esta interacción, ocurre un cambio conformacional en los RNs que permite la disociación de proteínas que los mantienen en un estado inactivo en el citoplasma, y favorece su acumulación en el núcleo celular. En el interior nuclear, los RNs, como monómeros, homodímeros o heterodímeros, se pueden unir a secuencias específicas en el ADN y reclutar proteínas correguladoras transcripcionales, las cuales se unen a través de los dominios de transactivación AF-1 y AF-2. Estas proteínas pueden ser coactivadores o correpresores. Los coactivadores están asociados a la relajación de la cromatina, por poseer o reclutar proteínas con actividad de acetilación de histonas, mientras que los correpresores están asociados a la compactación de la cromatina, por poseer actividad de desacetilación de histonas. De esta forma, los correguladores de los RNs modulan la compactación o descompactación de la cromatina para reprimir o inducir la expresión génica. Para mantener un estado fisiológico normal, la actividad espacial y temporal de los receptores nucleares debe ser estrechamente controlada a través de la expresión específica del tejido de los receptores y de la disponibilidad de ligando [130].

1.5.3 Vías de señalización no genómica de los RNs

A pesar de que la mayoría de los RNs son conocidos por sus funciones genómicas actuando como factores de transcripción, en los últimos años se han descritos efectos no genómicos de hormonas, mediadas por sus receptores ocurridos de forma rápida [131]. En general, estos efectos no genómicos rápidos, son aquellos mediante los cuales los RNs de prácticamente todas las hormonas esteroideas y las no esteroideas, son capaces de regular otras vías de señalización molecular, desencadenando cascadas de señalización intracelulares.

Estas vías rápidas de transducción de los RNs no relacionadas con sus funciones transcripcionales son conocidas como vías no genómicas, o no clásicas.

Debido a su protagonismo en la parte experimental de esta tesis doctoral, a continuación, vamos a definir algunas características de estos tres tipos de RNs: receptores glucocorticoides, FXR y de hormonas tiroideas [132].

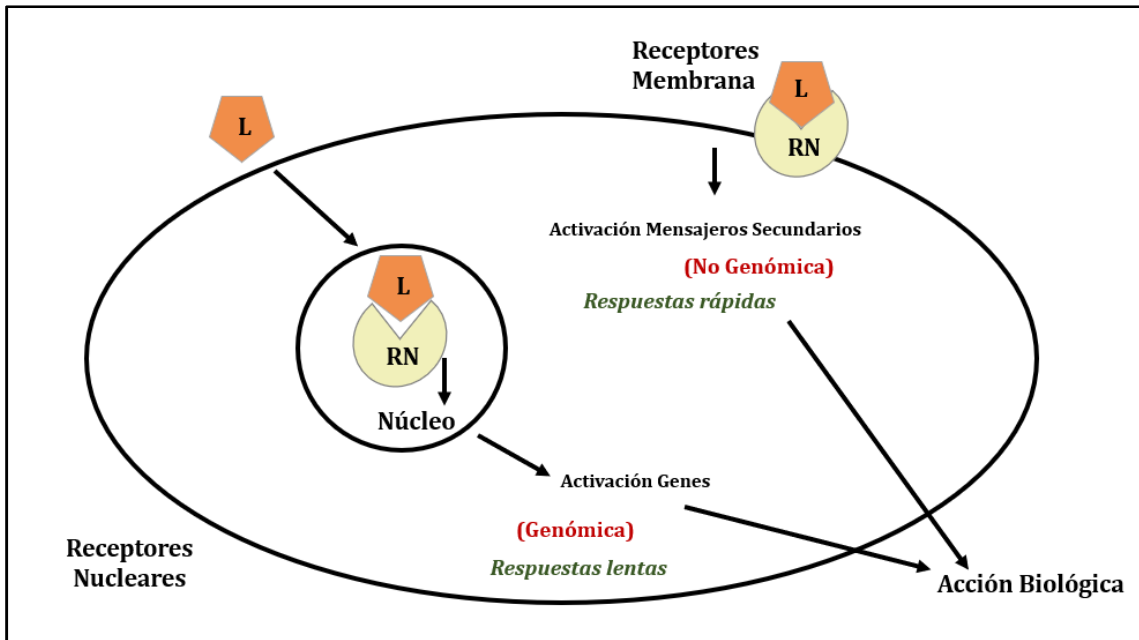


Figura 22. Efectos genómicos y no genómicos de los receptores nucleares. Representación esquemática de las acciones genómicas resultantes de la activación de genes (respuestas lentas) y no genómicas (respuestas rápidas) a través de receptores de membrana.

1.5.4 Receptores glucocorticoides

El receptor de GRs (RG) es una proteína modular de 92 kDa compuesta por un dominio de transactivación N-terminal (NTD), un dominio DBD y un dominio C-terminal LBD, cuya función antiinflamatoria se debe a acciones genómicas y no genómicas que se traducen en la activación de la transcripción de genes antiinflamatorios y la represión de moléculas proinflamatorias [133, 134]. Se estima que los GR influyen, directa o indirectamente, en la transcripción de aproximadamente el 1% del genoma [135].

Los RGs se encuentran en el citoplasma junto con otras proteínas, formando un complejo multiproteína. Los GRs difunden por la membrana plasmática y se unen al RG liberándolo del complejo y translocándolo al núcleo. En el núcleo puede actuar mediante dos mecanismos: acción directa uniéndose al ADN, o acción indirecta reconociendo a otros factores de transcripción pudiendo provocar la represión o activación de la expresión de los genes diana [136].

El RG parece encontrarse en casi todos los tipos celulares, por lo que su ligando natural regula una gran diversidad de sistemas fisiológicos. De hecho, los GRs endógenos poseen funciones indispensables en varios sistemas, como el endocrino, el renal, el inmune y el neuronal. Esta hormona ayuda a mantener la homeostasis durante situaciones de estrés como hemorragias, infecciones, desórdenes metabólicos e incluso ansiedad [137].

Por ello, se han diseñado GRs sintéticos de gran importancia farmacológica. La prednisona, prednisolona, triamcinolona, betametasona, hidrocortisona o dexametasona (DEXA) son algunos ejemplos de los más utilizados en la clínica.

1.5.5 Receptores FXR

EIFXR es el receptor fisiológico de los ABs y su activación inhibe la transcripción de la enzima limitante en la biosíntesis de estos compuestos, la colesterol 7 α -hidroxilasa [117].

Se expresa predominantemente en el hígado e intestino delgado, y aunque se conoce la existencia de dos genes FXR, denominados FXR α y FXR β , sólo el primero está conservado y es funcional en humanos. Las 4 isoformas de este receptor se expresan de forma específica en función del tejido.

Dado su efecto represor sobre la síntesis de sales biliares, desde el descubrimiento de los ABs como ligandos endógenos, se han encontrado nuevos moduladores que activen o repriman la actividad de este RN a concentraciones fisiológicas. Puesto que estos ligandos naturales no muestran una fuerte selectividad por este RN, se han desarrollado moléculas sintéticas que mejoran este aspecto.

Uno de los compuestos sintéticos iniciales fue el TTNPB - 4-(2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl)benzoic acid), un retinoide con baja afinidad por FXR, a partir del cual se sintetizaron una serie de derivados del estilbeno, de entre los cuales destaca el compuesto denominado GW9047 que mostró una buena selectividad. Se realizaron una serie de modificaciones y se desarrolló finalmente el GW4064 (**Figura 23**), que además de tener alta selectividad presentaba una potente capacidad activadora de FXR, aunque requiere de la presencia del receptor nuclear RXR para conseguir su máxima eficacia [70, 138].

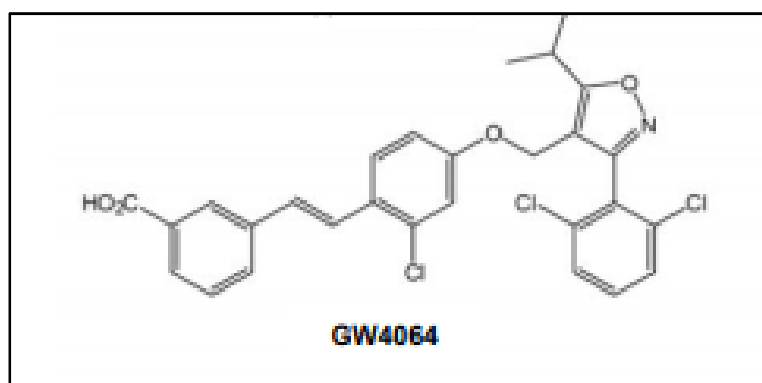


Figura 23. Estructura del ligando sintético del FXR: GW4064

1.5.6 Receptores de hormonas tiroideas

Los TRs se localizan predominantemente en los núcleos celulares, siendo las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) sus principales ligandos [139-141].

Los TRs están codificados por los genes *THRA* y *THRB*. El gen *THRA*, por procesamiento alternativo de intrones, puede originar distintas isoformas: TR α 1, TR α 2, TR α 3, TR Δ 1 y TR Δ 2; de las cuales solo TR α 1 une a T3. En cambio, el gen *THRB* produce 2 isoformas con unión a T3: TR β 1 y TR β 2. Las diferentes isoformas tienen patrones de expresión que varían según el tejido y la etapa de desarrollo, esto significa que existen variaciones en la distribución tisular de los diferentes tipos de TRs para T3. Así, el TR de T3 existe predominantemente en el sistema nervioso central y en menor concentración en otros tejidos, pero no en hepatocitos.

Los TRs presentan una estructura modular con diferentes dominios funcionales. El modelo general de acción de la T3 se basa en la activación de la transcripción génica mediante su unión a los TRs. Sin embargo, los TRs también puede reprimir la transcripción génica de manera dependiente de ligando.

El denominado DBD, altamente conservado, interacciona con secuencias específicas de ADN de los genes diana de hormonas tiroideas, conocidos como elementos de respuesta a T3 (del inglés *Thyroid Response Element*, TRE) [142]. Aunque los receptores pueden unirse al TRE como homodímeros, la heterodimerización con el RXR incrementa su eficiencia de unión al ADN y la activación transcripcional. El LBD presenta una región AF-2 que constituye un dominio de activación transcripcional dependiente de ligando. El LBD une T3 de manera reversible con alta afinidad, y adicionalmente, media la dimerización del receptor e interacciona con proteínas nucleares co-reguladoras que poseen actividades enzimáticas capaces de reprimir o activar la transcripción génica [143, 144].

Además de la variedad en cuanto a localización, los TRs presentan alta especificidad, con una afinidad para T3 de 4 a 10 veces mayor que para T4. Si bien ambos tipos de receptores existen simultáneamente, su nivel relativo de expresión puede variar sustancialmente en cada tipo celular, lo que puede traducirse en diferentes acciones farmacológicas. Las perspectivas de futuro es buscar análogos selectivos de las hormonas tiroideas capaces de activar o bloquear acciones individuales [145].

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El análisis de casos con deficiencia de antitrombina ha permitido identificar diferentes dominios funcionales de este potente anticoagulante, así como el desarrollo de terapias anticoagulantes. Sin embargo, hasta la fecha el esfuerzo a la hora de caracterizar casos con deficiencia de antitrombina se ha centrado en alteraciones que afectan a las regiones codificantes y que provocan defectos de pérdida de función. Tampoco se ha prestado atención a la información que se pudiera obtener sobre este anticoagulante del estudio de pacientes en los que los niveles de antitrombina fueran superiores a la normalidad. Así pues, la hipótesis de este trabajo es:

El estudio de pacientes con deficiencia de antitrombina, pero sin mutaciones en regiones codificantes, y el análisis de pacientes con niveles inusualmente altos de antitrombina, podrían ser fuente de información sobre elementos reguladores de la expresión de esta proteína.

De igual forma, el estudio de pacientes con formas de antitrombina inusuales puede identificar nuevos mecanismos trombóticos asociados con este anticoagulante.

2.2 Objetivos

Por lo tanto, el **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral fue identificar nuevos mecanismos implicados en la regulación de los niveles de antitrombina y determinar su implicación fisiopatológica.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Identificar mutaciones en regiones reguladoras del gen *SERPINC1* en pacientes con deficiencia de antitrombina sin mutaciones o deleciones de los exones.
2. Estudiar pacientes con niveles anormalmente elevados de antitrombina para identificar elementos reguladores de este anticoagulante.
3. Determinar los elementos que tengan mayor efecto transcripcional sobre *SERPINC1* y los mecanismos implicados en la regulación. Establecer nuevas evidencias que sustenten el papel de la vitamina D, sales biliares y hormonas en la regulación de los niveles de antitrombina.
4. Estudiar un caso con deficiencia de antitrombina con una mutación, p.Arg393Cys, que presenta dos variantes mutadas; y las consecuencias de esta mutación en el gen *SERPINC1*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y Controles

Para el desarrollo de esta tesis se analizaron varios grupos de pacientes y controles:

- Como grupo control estudiamos una población de 307 sujetos sanos caucásicos donantes de sangre de Murcia-España (138 varones/169 mujeres).
- De una cohorte de 158 pacientes con enfermedad tromboembólica, remitidos a nuestro grupo durante los últimos 10 años por diferentes hospitales, fundamentalmente españoles, para la caracterización de la deficiencia de antitrombina identificada mediante sistemas funcionales, se seleccionaron 30 sujetos con deficiencia confirmada de antitrombina que no presentaban mutaciones en los exones o regiones flanqueantes, ni grandes deleciones del gen *SERPINC1*. Estos pacientes tampoco presentaban trastornos de glicosilación, un defecto que ya demostró nuestro grupo explicaba la deficiencia de antitrombina en hasta el 27% de los casos sin mutación en *SERPINC1* [146].
- Se analizaron 5 sujetos con insuficiencia renal sometidos a diálisis que fueron tratados con paricalcitol (2µg/mL de paricalcitol 3 veces por semana), el metabolito activo de la vitamina D.
- Se estudiaron 3 pacientes con atresia biliar incluidos en lista de espera de trasplante hepático, que presentaban niveles plasmáticos de antitrombina elevados.
- Se analizó una familia con historia trombótica, portadora de una variante de antitrombina con efecto dominante negativo sobre la proteína silvestre, con reducción significativa de la actividad anticoagulante. El probando, un varón que sufrió un evento trombótico (TVP+TEP) espontáneo con 20 años de edad, y su madre asintomática.

Todos los sujetos dieron su consentimiento informado para formar parte del estudio, aprobado por el comité ético del hospital universitario Reina Sofía de Murcia, de acuerdo con la declaración de Helsinki, aprobada en Edimburgo en el año 2000.

3.2 Extracción y preparación de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se extrajeron mediante punción venosa en tubos de citrato trisódico (1:10 V/V) (*Vacutainer*, Becton Dickinson, Francia). Se procesaron inmediatamente, mediante centrifugación a 4°C durante 20 minutos a 2200xg. El plasma pobre en plaquetas se alicuotó y almacenó a -70°C. La capa de células (*Buffy coat*) se empleó para purificar DNA genómico utilizando un sistema comercial (*Puregene® Blood Core Kit B*, QIAGEN®) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.3 Métodos Bioquímicos

3.3.1 Estudio de los niveles de antitrombina

Los niveles de antitrombina en plasma se determinaron evaluando la actividad funcional mediante un método cromogénico. Analizamos la actividad inhibitoria sobre el FXa utilizando un sistema comercial (*HemosIL® Liquid Antithrombin 0020002500 Instrumentation Laboratory® Italia*) que emplea FXa, heparina y sustrato cromogénico S-2765. La actividad residual del FXa se determinó mediante cuantificación (OD 405nm) de la paranitroanilina liberada del S-2765 por la actividad enzimática de la proteasa no inhibida por la antitrombina, empleando un lector de placas (*Synergy® HT -BioTek®*). Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al resultado de un pool de plasma de referencia generado con 100 sujetos sanos (100%).

3.4 Métodos Moleculares

3.4.1 Determinación de otras trombofilias

Las demás trombofilias conocidas: deficiencia de proteína C, deficiencia de proteína S, factor V Leiden (FVL) y mutación G20210A de la protrombina (PT20210A) se analizaron en todas las muestras de pacientes. Las deficiencias de proteína C y proteína S se analizaron mediante ensayos funcionales. La identificación de los polimorfismos protrombóticos FVL y PT20210A se realizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de curvas de disociación, siguiendo la metodología descrita previamente [147].

3.4.2 Estudios de grandes deleciones o inserciones en las regiones codificantes del gen *SERPINC1* mediante *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)*

La identificación de grandes alteraciones génicas en *SERPINC1* fue evaluada por MLPA (*Multiplex Ligand-dependent Probe Amplification*), método de PCR múltiple que permite la detección de un número de copias anormal hasta en 50 secuencias de ADN diferentes, empleando el kit SALSA® MLPA® Kit P227 *SERPINC1 (MRC -Holland, Amsterdam, Holanda)* siguiendo los protocolos previamente descritos [148].

3.4.3 Amplificación de los exones del gen *SERPINC1*

Los 7 exones, los intrones y más de 1500 pb de la región 5' potencialmente promotora del gen *SERPINC1*, se amplificaron mediante PCR, empleando los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 3** y la **Figura 24**.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *SERPINC1*. AT: Antitrombina, E: Exón, I: Intrón, F: Primer directo (forward), R: Primer inverso (reverse). El tamaño del amplicón en pares de bases (pb) también se indica.

Amplicón	Oligo	Secuencia oligonucleótido (5'→3')	Tamaño (pb)
Región 5'	AT_-1F	GGACCTTATTAACATCTGAC	743
	AT_-728R	CCAAGTTCACAGGGCGCATG	
	AT_-660F	GGAGTCCTTGATCACACAGCA	
	AT_IN1R	GTCTTTGACTGTAACACTACCAG	
	AT_0,5F	GGCTACTGTTCACTGCACATG	
	AT_1R	GAAAGCTCACCCCTCTTAC	
Exón1-	AT_1F	CTGTCCTCTGGAACCTCTGCGAGA	2880
Exón2	AT_2R	GGTTGAGGAATCATTGGACTTG	
Intrón1	AT_19F	ATCCGGAAGAGAGCAAATGC	1200
	AT_31R	CTCAAAACAGCAACAACAAC	
Exón2-	AT_2F	TGCAGCCTAGCTTAACTTGGCATT	3180
Exón3	AT_3aR	AGAGGAAGAACTCGGAGGTCAGG	
Exón3-	AT_3aF	AACTAGGCAGCCCACCAAACCC	1410
Exón4	AT_3bR	GAAGAGCAAGAGGAAGTCCCT	
Exón4-	AT_3bF	TTGAATAGCACAGGTGAGTAGGTT	1380
Exón5	AT_4R	AAGGGAGGAAACTCCTTCTCTAG	
Exón5	AT_4F	TGTGTTCTTACTTTGTGATTCTCT	391
	AT_4R	AAGGGAGGAAACTCCTTCTCTAG	
Exón5-	AT_4F	TGTGTTCTTACTTTGTGATTCTCT	2521
Exón6	AT_5R	CATGCATCTCCTTTCTGTACCC	
Intrón5-	AT_95F	TGGAGAGGAATTTGAAAG	1800
Exón6	AT_5R	CATGCATCTCCTTTCTGTACCC	
Intrón5	AT_95F	TGGAGAGGAATTTGAAAG	1080
	AT_106R	AACATCTTTCTTTCCAGTCTG	
Exón6-	AT_5F	TTCTCCCATCTCACAAGAC	3660
Exón7	AT_6R	AGAGGTGCAAAGAATAAGAA	
Intrón6	AT_130F	GGGAGACTAGGGTGTGTA	1200
	AT_142R	CAGATCTAGAGGGAAACACC	
Intrón6-	AT_130F	GGGAGACTAGGGTGTGTA	1860
	AT_6R	AGAGGTGCAAAGAATAAGAA	
Región 3'	AT_130F	GGGAGACTAGGGTGTGTA	2860
	AT_159R	ACACACAAGTAATAACATCCAC	
	AT_3'F	TTATCTTCATGGGCAGAGTAGC	
	AT_159R	ACACACAAGTAATAACATCCAC	1000

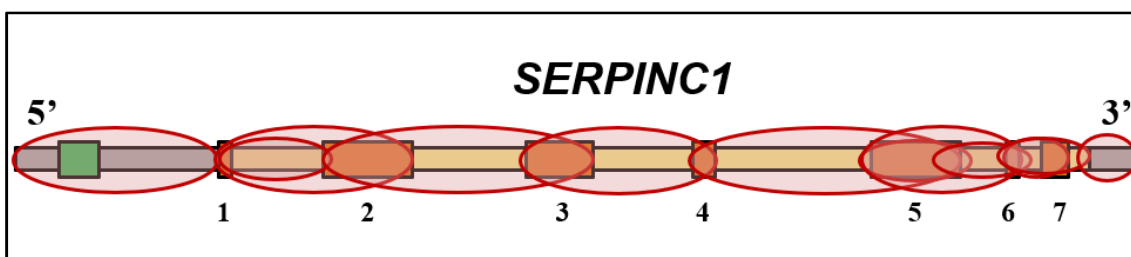


Figura 24. Localización de los amplicones empleados para estudiar el gen *SERPINC1*.

Para la amplificación se usó un termociclador (*Thermo*®, Madrid España) con las siguientes condiciones:

- Un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos.
- Treinta y cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación a 50-60°C durante 20 segundos y extensión a 72°C durante 20 segundos-5 minutos.
- Un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos.

3.4.4 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1% (*Pronadisa*®, Madrid España) en tampón TAE 10X (TRIS base 0,4 M, ácido acético 0,2 M, EDTA 0,01 M), a pH 8,3. La separación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando cubetas de desarrollo horizontal (*Vari-gel*®). Los amplicones se visualizaron gracias al compuesto intercalante *GelRed*TM (0,5 µg/µL) y posterior exposición en una lámpara ultravioleta de 312 nm de longitud de onda.

3.4.5 Purificación del producto de PCR

Después de amplificar correctamente el fragmento de ADN, se purificaron los productos de PCR siguiendo el protocolo especificado en el kit *MSB*® *SPIN PCR*apace (*Invitek*® GmbH, Alemania).

3.4.6 Reacción de secuenciación

Tras purificar el producto de PCR y analizarlo nuevamente en un gel de agarosa, se procedió a la secuenciación. La reacción de secuenciación se llevó a cabo mediante el uso de terminadores marcados, y por extensión enzimática de *AmpliTaq*® DNA Polymerase, incluida en el kit *BigDye*® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kit (*Applied Biosystems*®, Madrid, España).

Se mezclaron 2µL del producto de PCR purificado, 1µL de oligonucleótido y 2µL de la mezcla *BigDye*®, y se sometieron a una reacción de secuenciación en un termociclador con las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos
- 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Los productos de secuenciación se purifican mediante las columnas *Performa*® DTR Gel Filtration Cartridges (*EdgeBio*®, Gaithersburg, EEUU) según protocolo. El ADN purificado se desnaturalizó añadiendo 10µL de formamida y calentando a 94°C durante 3 minutos.

3.4.7 Electroforesis capilar automática

Las secuencias de los exones y de los fragmentos de amplificación por MLPA fueron determinadas con el secuenciador automático 3130xl (*Applied Biosystems*®, Madrid, España).

Durante la electroforesis capilar, los productos se inyectaron electrocinéticamente y se introdujeron en capilares rellenos de polímero. La aplicación de alto voltaje permitió que los fragmentos cargados negativamente se introduzcan en el interior del polímero y migren hacia el electrodo positivo. Antes de alcanzar el polo positivo los fragmentos marcados fluorescentemente y separados por tamaños, son alcanzados por un láser que excita los fluoróforos. La fluorescencia emitida por los diferentes fragmentos fue detectada por un dispositivo óptico. El software de recolección de datos convirtió la señal de fluorescencia en datos digitales.

El análisis de las secuencias se realizó con el programa SeqScape® (*Applied Biosystems*®, Madrid, España), el cual permitió convertir los datos crudos en imágenes en color de los correspondientes nucleótidos y representarlos en un electroferograma. Además, este software compara la secuencia obtenida con la secuencia de referencia indicando las variaciones existentes. La secuencia de referencia del gen *SERPINC1* se cargó en el programa desde la base de datos NCBI (NM_000488.3).

3.4.8 Genotipado mediante electroforesis capilar de la inserción

IVS1+1179insTTGA* del gen *SERPINC1

Para genotipar la inserción *IVS1+1179 insTTGA* en 307 controles se amplificó el intrón 1 del gen *SERPINC1* empleando los oligos in1F5'GGCGACTATTA AAAAT TCCAGGCA 3' y el in1R, este último marcado con FAM 5' [FAM] CTCCTCCTCATT TAGTCAAACCCCA 3'. Como marcador de tamaño específico, se amplificó el intrón 1 del paciente portador de la inserción utilizando los oligos in1FROX, marcado con ROX 5' [ROX]GGCGACTATTA AAAAT TCCAGGCA 3' y el in1R 5' CTCCTCCTCATT TAGTCAAACCCCA 3'. Los productos amplificados se corrieron por electroforesis capilar empleando el secuenciador automático (3130 *Applied Biosystems*®, Madrid, España), analizando los fragmentos con el software del equipo (3130 *Applied Biosystems*®, Madrid, España).

3.4.9 Genotipado del polimorfismo rs146692719 del intrón 1 del gen

SERPINC1

El genotipado del polimorfismo rs146692719 situado en el intrón 1 del gen *SERPINC1* se realizó mediante análisis PCR-ASRA, amplificando el producto de PCR con los oligonucleótidos 5'GGCGACTATTA AAAAT TCCAGGCA3' (Forward) y 5'CTCAAACAGCAACAACAAAC3' (Reverse), empleando la enzima de restricción *TfiI* (*New England Biolabs*, Madrid, España) sensible a la mutación.

3.4.10 Búsqueda *in silico* de secuencias VDRE en el gen *SERPINC1*

La búsqueda de potenciales VDREs en el gen *SERPINC1* se realizó *in silico* mediante el software JASPAR (<https://jaspar.genereg.net/>), empleando la matriz 74.1 RXR::VDR y fijando un umbral de exigencia del 80 y 70%, Genomatix (<https://genomatix.de/>) y PROMO (https://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) empleando la versión 8.3 de TRANSFAC.

3.4.11 Genotipado de polimorfismos funcionales en VDR

Los polimorfismos seleccionados (rs2228570 y rs4516035) se genotiparon en la población control mediante análisis de los fragmentos generados con enzimas de restricción sensibles al polimorfismo *Fok1* y *Bsr1* (*New England Biolabs*, Madrid, España) a partir de productos de amplificación específicos generados con los oligonucleótidos y condiciones indicados en la **Tabla 4**. Los productos de PCR se digirieron con las endonucleasas específicas (0,5 U/ μ L) a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos de restricción obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa (0,8%-2%) y se analizaron en un trans-iluminador de luz UV, o en geles de acrilamida al 5% los cuales fueron revelados con tinción de nitrato de plata.

Tabla 4. Oligonucleótidos y enzimas utilizadas para la amplificación del gen VDR y genotipado de los polimorfismos funcionales. F: secuencia directa (forward); R: secuencia inversa (reverse). El tamaño del amplicón y el del patrón de restricción (en pares de bases -pb) correspondiente a cada genotipo también se muestran.

Polimorfismo (alteración)	Enzima	Oligo (5'-3')	TA*	Tamaño PCR (pb)	Productos PCR-RFPL (pb)**
rs2228570 Fok1 (T/C)	Fok1	VDR1FoKF GGGATGAGGCTGGGGGT VDR1R TGGAAGGGAGGGAGAA GAAGC	58°C	190	(TT) FF 183, 63, 28, 16 (TC) Ff 246, 183, 63, 28, 16 (CC) ff 246, 28, 16
rs4516035 Bsr1 (A/G)	Bsr1	VDR1Bsr1F AGCTCTCAGAAATGGTTCA VDR1Bsr1R TCACCTGTCCTCTAGCAGA T	55°C	387	(AA) BB 322, 65 (AG) Bb 322, 163, 159, 65 (GG) bb 163, 159, 65

*TA: Temperatura de anillamiento

**Patrón de restricción (PCR-RFLP: *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*)

3.4.12 Análisis de haplotipos

El análisis de los diferentes haplotipos generados según los polimorfismos rs2228570 y rs4516035 del gen *VDR*, así como su asociación con los niveles de anti-FXa de antitrombina se realizó mediante el software online SNPStats [149].

3.4.13 Secuenciación del gen *VDR*

Los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación y secuenciación empleadas para analizar el gen *VDR* se encuentran detallados en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones empleadas para la amplificación del gen *VDR*. F: secuencia directa (forward); R: secuencia inversa (reverse). El tamaño del amplicón (en pares de bases -pb) también se muestran.

Primer	Oligo (5'-3')	TA	Tamaño PCR (pb)
VDR-PF	GAAGCGGGTATCCGCACCTAT	60	431
VDR-PR	CTCAGGCCCGGTATCCCA		
VDR-1F	GGGATGAGGCTGGGGT	60	290
VDR-1R	GCTTCTTCTCCCTCCCTTCC		
VDR-2F	GGGGGCCAGAAAGACAGGTCT	60	282
VDR-2R	GTGGCCAAGGCCTTCCCTGA		
VDR-3-4F	GGAAGGTTTCCTGGAGGAGCT	60	710
VDR-3-4R	CCACCTCCTCCATCCAGCA		
VDR-5F	GCCAGGGCACACCAGGTTT	58	348
VDR-5R	GGTGGATGAGTGATCTCCAACCT		
VDR-6-7F	GCCCAGCAGGTGTATACCTGTCA	60	958
VDR-6-7R	CCATCTCTCAGGCTCAAAGT		
VDR-8F	GGGGCCAGGCAGTGGTAT	60	1330
VDR-8R	CACTGCTTCTCCAGACCCT		

3.4.14 Extracción de ARN

La purificación de ARN se realizó utilizando el reactivo RNAzol® RT (*Molecular Research Center*, Cincinnati, EEUU) siguiendo el protocolo de extracción del fabricante. Para extraer el ARN de los hígados de ratones tratados con diferentes sales biliares se utilizaron las columnas del kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (*Zymo Research*, Irvine, EEUU).

La concentración y ratio 260/280 se determinó usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer (*ThermoScientific*, Madrid, España). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.4.15 Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 100ng de ARN obtenido de cada experimento, siguiendo las instrucciones del fabricante y empleando SuperScript III RT (*Invitrogen*, Madrid, España). El cDNA obtenido se amplificó empleando un termociclador en tiempo real-LightCycler 480 (*RocheDiagnostics GmbH*, Madrid, España), y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos. Se analizaron mediante sondas TaqMan®, los genes *SERPINC1* (sonda Hs0016654m1) y *VDR* (sonda Hs01045840m1). La expresión de β -Actina ($\text{Act}\beta$), considerada como un gen constitutivo, se empleó como control endógeno (sonda Hs99999903m1). Tras la amplificación se tomaron los valores C_t de cada marcador, teniendo en cuenta como criterio de calidad las desviaciones estándar de los triplicados menores de 0,3. El análisis de la expresión del gen de interés se realizó mediante el software de cuantificación de LightCycler. La cuantificación se hizo relativa al gen constitutivo β -actina empleando el cálculo del ΔC_t ($\Delta C_t = 2^{(C_{\text{actina}} - C_{\text{gen}})}$).

3.4.16 Análisis de antitrombina mediante Western Blot

Los niveles y características electroforéticas de la antitrombina plasmática o secretada al medio de cultivo se evaluaron mediante *Western blot*. Tras la separación electroforética mediante diferentes condiciones (desnaturalizante con SDS, o Nativas en presencia o ausencia de Urea – 6M) siguiendo protocolos desarrollados por nuestro grupo [150], las proteínas plasmáticas fueron transferidas a membranas de polivinildenofluoruro (PVDF) (*Amersham Hybond™ GE™ Healthcare*, Barcelona, España). Para la inmunodetección de la antitrombina se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-antitrombina humana (A 9522 anti-human policlonal rabbit, *Sigma Aldrich*, Madrid, España), evitando la unión inespecífica con una solución de bloqueo PBS Tween 1X suplementado con 5% de leche desnatada en polvo. La membrana se lavó tres veces con PBS con el propósito de eliminar el anticuerpo no unido a la proteína. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (A-0185 anti-Rabbit *ECL™ Amersham*, Barcelona, España). Tras 3 nuevos lavados con PBS Tween 1X se detectó la peroxidasa con un sistema de quimioluminiscencia (*GE™ Healthcare Amersham™ ECL™*, Barcelona, España) en un equipo ImageQuant LAS4000mini (*Exon Biotec, GE Healthcare*, Barcelona, España), utilizando el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (*GE Healthcare*, Barcelona, España). La densidad de las bandas se cuantificó con el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Los resultados fueron expresados como intensidad relativa, con respecto a los observados en un grupo control (densidad del 100%).

3.4.17 Predicciones *in silico* y modelado estructural de la variante de antitrombina

El modelado de la estructura de la variante p.Arg393Cys de antitrombina se construyó mediante los programas informáticos *Swissmodel* (<https://swissmodel>.

expasy.org/) y se visualizaron empleando *UCSF Chimera* (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Se analizaron y representaron gráficamente los cambios predecibles en las estructuras secundaria y terciaria.

3.5 Métodos experimentales

3.5.1 Agentes moduladores de la expresión de *SERPINC1*

Para los experimentos realizados en el modelo celular y animal se emplearon distintas dosis y combinaciones de los siguientes agentes moduladores: DEXA, GW4064, T3, CDCA, CA, UDCA, LCA (*Sigma-Aldrich*, Madrid, España) y Paricalcitol (*Zemplar*®, Madrid, España).

3.5.2 Cultivos celulares

Para evaluar el papel regulador de los distintos los agentes potencialmente moduladores de *SERPINC1* se utilizó la línea celular derivada de carcinoma hepatocelular humano, HepG2 (ATTC®). Los experimentos se llevaron a cabo en cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica y química clase II. Los cultivos celulares se mantuvieron en incubadores de CO₂ en unas condiciones de temperatura y humedad controladas (5% de CO₂, 80% de humedad y 37°C de temperatura) y se siguieron las indicaciones de cultivo establecidas por la ATCC®. El medio de cultivo empleado DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium (*Invitrogen*, Madrid, España) fue suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal, glutamina (1mM), penicilina (120µg/mL), estreptomycin (100µg/mL) y glucosa (1µg/mL). Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se tripsinizaron y subcultivaron en un medio renovado, para mantener las células en una fase exponencial y asegurar así la viabilidad y estabilidad genética y fenotípica. Se repitió este proceso cada 48-72h. Para todos los experimentos se utilizaron células con pase de laboratorio inferior a 40, que fueron congeladas en las condiciones indicadas por el proveedor y almacenadas en depósitos de nitrógeno líquido, lo que garantiza la preservación de las características de la línea celular original. El control de micoplasmas se realizó mediante PCR utilizando el kit VenorGeM Mycoplasma Detection Kit (*Minerva Biolabs*, Berlín, Alemania).

Antes de realizar los diferentes tratamientos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (*Thermo Fisher Scientific*®, Madrid, España), a una densidad de 140.000 células/pocillo y en un volumen 0,5 mL/pocillo. Se utilizó el contador de células automático TC10 (*Bio-Rad Laboratories*, Madrid, España) que proporciona un recuento de células totales y de células vivas por mL. Pasadas 24h tras la siembra, las células se lavaron con PBS y se añadió CD-CHO (*Invitrogen*, Madrid, España) junto a diferentes agentes

moduladores para evitar la contaminación de la antitrombina presente en el suero bovino fetal.

Al finaliza el tratamiento, se retiró el medio de cultivo, que tras centrifugar se alicuotó y congeló a -80°C . Las células, tras lavarse con PBS se lisaron para su análisis proteico y su estudio molecular.

3.5.3 Modelos animales

Para realizar los experimentos de esta tesis doctoral, se utilizaron dos cepas distintas de ratones: Swiss y C57BL/6J.

Los ratones machos de la cepa Swiss fueron distribuidos en 5 grupos con 5 animales por grupo con el objetivo de analizar en ellos el efecto dosis dependiente de la sal biliar que mejor resultados dio en los experimentos celulares: CDCA. El primer grupo, utilizado como grupo control, fue tratado solamente con aceite de maíz (0,8 mL/kg de peso/día), empleado como vehículo. Al segundo grupo se le inyectó 6mg/kg de CDCA, al tercero 12,5 mg/kg de CDCA, al cuarto grupo 25mg/kg de CDCA y al último, la dosis más elevada: 50mg/kg. En todos los casos, el CDCA fue disuelto en etanol y diluido en aceite de maíz a un volumen final de 100 μL de aceite de maíz/inyección. Estas inyecciones se realizaron de manera intraperitoneal una vez al día durante 3 días a lo largo de una semana. Los animales fueron sacrificados a las 24h de la última dosis.

También se emplearon ratones C57BL/6J heterocigotos deficientes de antitrombina: ratones (Serpinc1^{+/-}). En este caso se analizó la efectividad *in vivo* del CDCA a la dosis de 25mg/kg, comparándolo con un grupo control de ratones silvestre. Cada grupo estaba formado por 5 animales. Durante los 4 días del tratamiento, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 100 μL de CDCA, y únicamente aceite de maíz en el caso del grupo control. Los animales fueron sacrificados 24h tras recibir la última dosis. En el momento 0 y a las 48h se recogieron muestras mediante el método de extracción de sangre de seno retro-orbital en tubos citratados para analizar los valores de antitrombina plasmática. Las muestras se centrifugaron y el plasma obtenido se almacenó a -80°C hasta su uso.

Tras el sacrificio del animal por dislocación cervical, se recogieron muestras de hígado que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la extracción de ARN.

Los distintos ensayos de experimentación animal se llevaron a cabo en la Universidad de Murcia en la Sección de animales de laboratorio, cumpliendo con las directrices legales establecidas por la Directiva Europea 86/609/CEE de 24 de noviembre respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre y la Ley 32/2007 de 7 de noviembre que regulan la experimentación con animales en España.

3.5.4 Evaluación de factores ambientales y suplementación con albúmina

Para evaluar las consecuencias que los cambios conformacionales producidos por el calor provocaban en la variante p.Arg393Cys, el plasma del probando portador de esta mutación y controles sanos se incubaron a 42°C. Las consecuencias sobre la antitrombina plasmática se analizaron por *Western Blot*.

La suplementación del medio de cultivo con albúmina humana al 20% (*Grifols*, Barcelona, España) se realizó para confirmar la formación de complejos con la variante p.Arg393Cys y analizar el tipo de unión generada.

3.6 Purificación de antitrombina

La antitrombina del plasma y del medio de cultivo fue purificada por cromatografía de afinidad por heparina a pH 7,4, empleando columnas de heparina *HiTrap® Heparin* de 1mL en un equipo de cromatografía líquida FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) (*ÄKTA® Purifier*, *GE Healthcare®*, Barcelona, España) siguiendo protocolos previamente descritos [45]. De forma previa a la purificación, las columnas fueron equilibradas con tampón TrisHCl 0,05M pH 7,5, y las muestras se trataron con dextrano 10% y CaCl₂ 5M durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante se diluyó 1:1 usado para equilibrar la columna (Tris-HCL 100 mM, Ácido Cítrico 10 mM y NaCl 150 mM). A continuación, la muestra fue inyectada en el equipo (flujo 1 mL/min), en el que se llevó a cabo un gradiente escalonado de 0 a 3 M de NaCl. Las fracciones que contenían antitrombina (identificadas mediante *Western Blot*) se unificaron y se dializaron con membranas de diálisis (*Sigma-Aldrich*, Madrid, España) durante 12 horas, y se almacenaron a -80°C hasta su análisis electroforético.

Adicionalmente, para la antitrombina secretada al medio en el modelo celular recombinante, se empleó un segundo paso de purificación mediante la técnica del Gel filtración siguiendo el método de McKoy en el equipo *ÄKTA Purifier* (*GE Healthcare®*, Barcelona, España). Se compararon los perfiles del sobrenadante generado con el plásmido silvestre y con el plásmido que contiene la variante p.Arg393Cys, y se analizaron empleando distintas condiciones electroforéticas.

3.7 Análisis estadístico

La distribución normal de las variables continuas se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los valores de variables continuas con distribución normal se expresaron como media±desviación estándar (SD). La comparación entre medias se realizó usando distintos test estadísticos según correspondía: la prueba *t de Student* o el test

χ^2 , utilizando el programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS versión 15.0, EEUU). Los estudios de correlación se realizaron mediante regresión lineal. Se consideró significancia estadística diferencias con $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Vitamina D y antitrombina

4.1.1 Identificación de secuencias VDRE en *SERPINC1*

Nuestro grupo, analizó años atrás la totalidad del gen *SERPINC1*, incluyendo 1500pb del promotor, en pacientes con deficiencia moderada de antitrombina. No detectamos alteraciones relevantes en la zona codificante ni en regiones flanqueantes. Sin embargo, identificamos 3 polimorfismos en la zona promotora: rs3138521, rs61827938 y rs2227588; y 2 alteraciones, *g.1091C>T* y *g.2143 C>G*, localizados a 1052 y 170pb del codón de iniciación ATG, respectivamente. El genotipado por *PCR-ASRA* de estas variaciones en 100 sujetos sanos reveló que el cambio *g.1091C>T* era un polimorfismo de baja frecuencia, mientras que la variación *g.2143 C>G (c.1-171 C>G)* no se detectó en esta población sana [49].

Los 4 polimorfismos del promotor no afectaban los niveles anti-FXa en nuestra población control, lo que descartó cualquier efecto funcional. En cambio, la variación *g.2143 (c.1-171 C>G)* se asociaba con niveles bajos de antitrombina en estudios familiares. Evidencias adicionales que sustentan el efecto funcional de esta mutación fueron la presencia de la deficiencia moderada de antitrombina con la presencia de la mutación en los 4 miembros de la familia portadora de la misma [49]. Además el estudio reporter luciferasa realizado en un modelo celular con 2 líneas celulares hepáticas distintas, PLC-PRF-5 y HepG2, mostró como la presencia de la mutación reducía la actividad transcripcional y los niveles de ARN de *SERPINC1* eran 30-50% menores que cuando se empleó el alelo silvestre [49]. Finalmente, estudios previos ya habían sugerido que la región afectada por la mutación tenía importantes funciones reguladoras de la actividad transcripcional del gen [56, 57]. Esta alteración, que consiste en un cambio de una base C por una base G en heterocigosis, se encuentra próxima a un potencial elemento de respuesta al receptor heterodimérico RXR α /VDR, con probabilidad de unión a VDR (definido como *score*). Es el primer indicio que tuvimos de la posible implicación del eje de la vitamina D en la regulación de los niveles de antitrombina. Además, esta alteración también podría afectar las secuencias de unión de elementos reguladores transcripcionales como el factor nuclear de hepatocito 4 α (HNF4 α), el TR α , el factor de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo I (COUP-TFI) además del ya comentado RXR α /VDR [49]. Como existían indicios adicionales realizados en células HepG2 y modelos animales que sugieren un papel de la vitamina D en la regulación de los niveles de antitrombina [59], el primer objetivo de este capítulo fue realizar búsquedas *in silico* para identificar nuevos elementos RXR/VDR en el gen *SERPINC1*.

Empleando el sistema de predicción *in silico* JASPAR, identificamos 2 elementos VDREs adicionales en el gen *SERPINC1*, ambos en el intrón 1a 200pb del codón de inicio de traducción ATG (hebra: -1 AAGTTTTAAAGTTCA; hebra: -1, GGGGAACTGAGGTCA) y con mayor *score* que el identificado anteriormente en el promotor. El valor de estos *scores* fue confirmado por el posterior análisis con PROMO y Genomatix (**Figura 24**).

Estos primeros resultados, junto a las evidencias que respaldaban un papel de la vitamina D en el control de *SERPINC1* [60], impulsaron la búsqueda de nuevos VDREs en el gen *SERPINC1* empleando de nuevo el software JASPAR, pero fijando un umbral del 80% para la detección de dichas secuencias. Con esta aproximación, detectamos 3 regiones

con elementos VDREs. Destacamos en primer lugar que la región promotora presentaba una concentración destacada de 3 elementos VDRE en tándem. Además, identificamos dos elementos VDRE en el intrón 1 y uno en el intrón 2 con *scores* elevados (**Figura 25**).

El polimorfismo rs2227589 localizado en el intrón 1 y asociado a riesgo trombótico fue el primero en evaluarse. Su localización no alteraba de forma directa ninguna secuencia VDRE encontradas en este intrón.

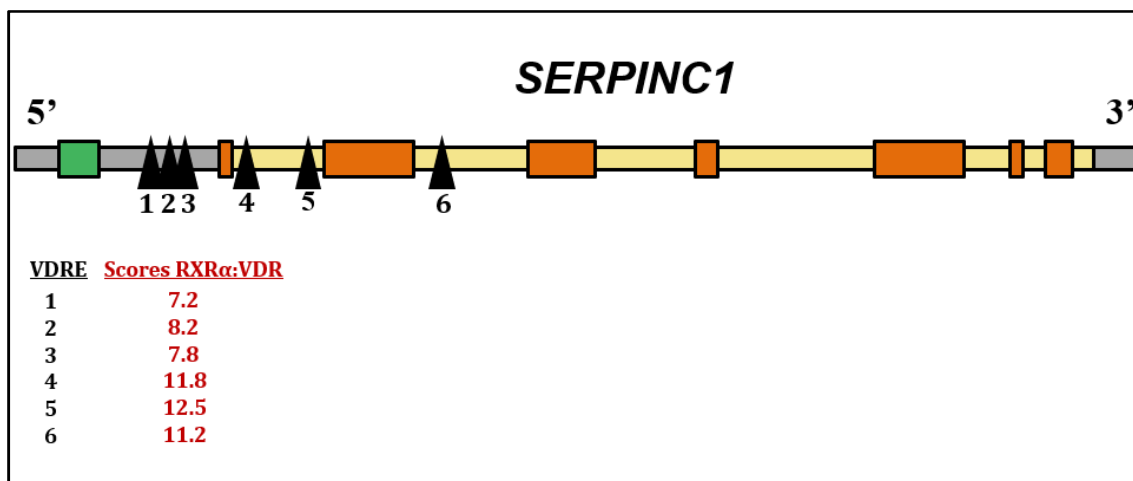


Figura 25. Localización VDREs en el gen *SERPINC1* identificados *in silico* empleando el software JASPAR. Los triángulos representan los VDREs y en la leyenda quedan desglosados sus scores RXRα:VDR.

4.1.2 Búsqueda de nuevas alteraciones en regiones reguladoras del gen *SERPINC1* asociadas con deficiencia de antitrombina

De nuestra cohorte de 158 pacientes no relacionados con deficiencia de antitrombina (actividad anti-FXa <80% relativa al plasma de referencia), confirmada en al menos dos determinaciones realizadas en diferentes muestras, seleccionamos 30 casos que no presentaban mutaciones ni grandes alteraciones moleculares en las regiones codificantes de *SERPINC1*. La mayoría de estos casos presentaron eventos trombóticos. Por lo tanto, se excluyeron 127 pacientes que presentaban alguna delección o inserción en las regiones codificantes. También se eliminaron del estudio 8 casos que, aunque no presentaban mutación en el gel *SERPINC1*, tenían un patrón de hipoglicosilación de antitrombina aberrante que justificaba la deficiencia observada.

Tras los primeros resultados obtenidos *in silico*, decidimos secuenciar en estos 30 pacientes las regiones que contienen elementos VDREs. Se analizaron las 1500pb de la región promotora, así como el intrón 1 y 2 del gen *SERPINC1*. Las nuevas variantes genéticas identificadas en este estudio fueron registradas en la base de datos de ácidos nucleicos DDBJ (Japón) con los siguientes códigos de acceso: LC127223, LC127224, LC127225, LC127226.

Detectamos una mutación *c.1-1053C>T* en heterocigosis localizada en la zona del promotor, a 1053pb del codón de inicio ATG. Se trataba de una mujer (P1) con deficiencia

de antitrombina moderada (73%) que había sufrido un episodio de trombosis cerebral a la edad de 27 años (**Tabla 6**). La mutación *c.1-1053C>T*, que no alteraba ningún elemento VDRE, se genotipó en 307 sujetos sanos donantes de sangre. Este estudio reveló que se trataba de un nuevo polimorfismo de baja prevalencia, identificado en heterocigosis en 5 de los 307 sujetos sanos (MAF:0,008) sin efecto funcional sobre los niveles de antitrombina en plasma. La actividad anti-FXa fue de un $96,3 \pm 7,5\%$ en portadores frente al $97,5 \pm 6,6\%$ en no portadores; $p=0,729$. El bajo valor de MAF de este polimorfismo requiere de estudios más amplios, con un mayor número de casos analizados, para definitivamente descartar cualquier posible efecto funcional.

También en la región promotora encontramos de nuevo la mutación *c.1-171 C>G* en otro caso de esta nueva serie. Se trataba de una mujer (P2) con deficiencia de antitrombina moderada (69%) que sufrió un tromboembolismo pulmonar (TEP) bilateral idiopático a la edad de 63 años. Este caso, no presentaba ninguna relación familiar ni geográfica con el ya descrito anteriormente, que presentaba la misma mutación [49]. Destacamos que esta mutación distorsiona significativamente el score de predicción de VDRE para la segunda secuencia VDRE localizada en la región promotora de *SERPINC1* (**Figura 26**).

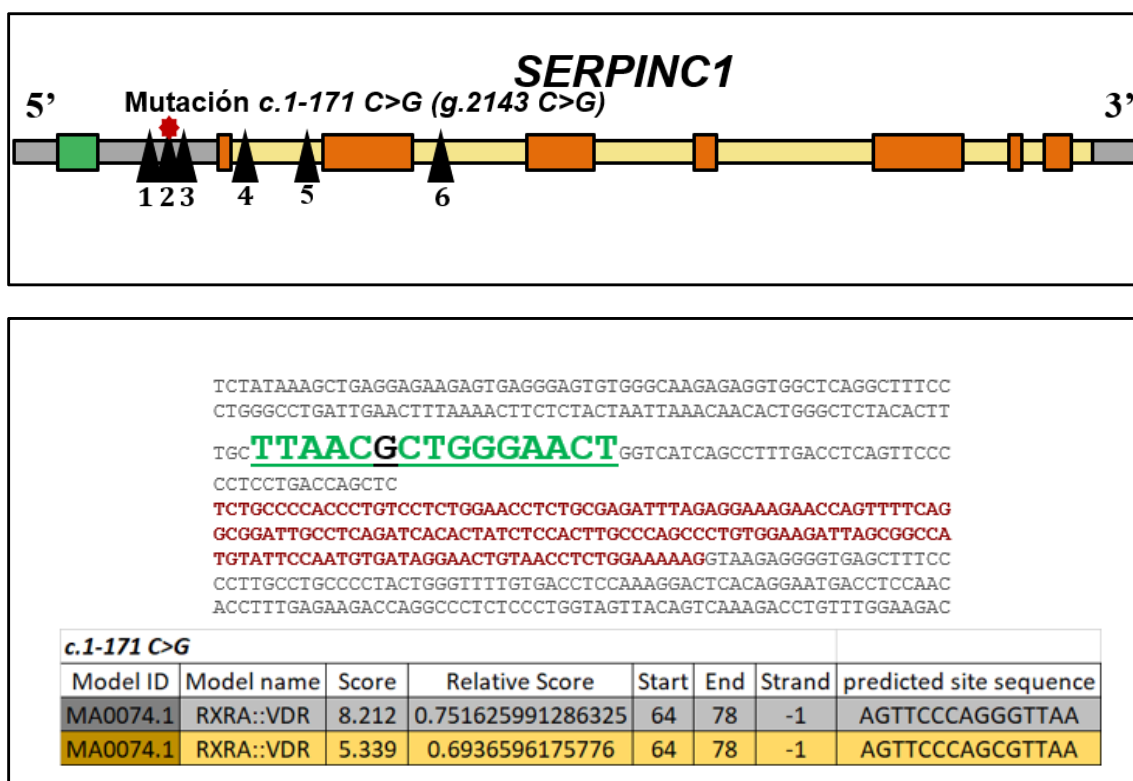


Figura 26. Localización de la mutación *c.1-171 C>G* en la región promotora de *SERPINC1*. La secuencia VDRE predicha por JASPAR se muestra en verde, y el nucleótido mutado en negro. Los nucleótidos marcados en rojo corresponden al exón 1. La figura también muestra el resultado del score de predicción realizada por JASPAR para secuencias RXR α /VDR en la secuencia silvestre (8,212) y mutado (5,393).

Ninguno de los 30 pacientes analizados presentaba alteraciones genéticas relevantes en el intrón 2 del gen *SERPINC1*.

Sin embargo, el análisis del intrón 1 reveló dos nuevas interesantes variaciones en nuestra cohorte.

Identificamos en un individuo (P3) una duplicación de 4 nucleótidos en heterocigosis: *c.42-1060_-1057dupTTGA*. Se trataba de un varón con una actividad anti-FXa del 68% que sufrió un ictus cardioembólico a la edad de 88 años. Esta duplicación alteraba el segundo elemento VDRE identificado en el intrón 1, el de mayor *score*. El programa JASPAR predijo una reducción del 52% de la probabilidad de interacción con RXR α /VDR en el alelo mutado comparado con el *score* del alelo silvestre (**Figura 27**).

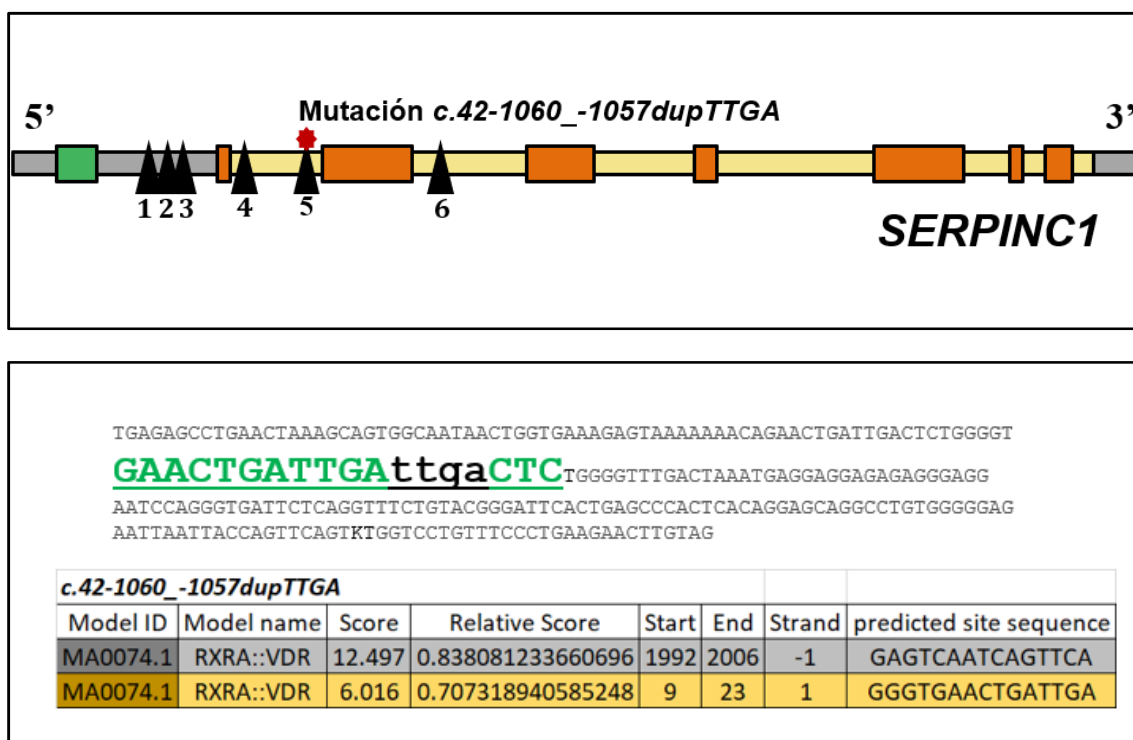


Figura 27. Localización de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA* en el intrón 1 de *SERPINC1*. La secuencia VDRE predicha por JASPAR se muestra en verde, y los nucleótidos duplicados en negro. La figura también muestra el resultado del *score* de predicción realizada por JASPAR para secuencias RXR α /VDR en la secuencia silvestre (12,497) y mutado (6,016).

Realizamos el estudio de esta mutación en los dos hijos de este paciente, pero ninguno de ellos era portador, y presentaban una actividad anti-FXa de 100 y 90%.

Al tratarse de una mutación no descrita, y con la finalidad de validar su efecto funcional, decidimos desarrollar un método de genotipado rápido y barato mediante electroforesis capilar que discriminaba perfectamente los alelos silvestre y mutado (**Figura 28**).

Este método se aplicó a los 307 sujetos sanos. La duplicación *c.42-1060_-1057dupTTGA* fue detectada en 8 muestras, siempre en heterocigosis. En los 8 casos el genotipado positivo fue confirmado posteriormente por secuencia.

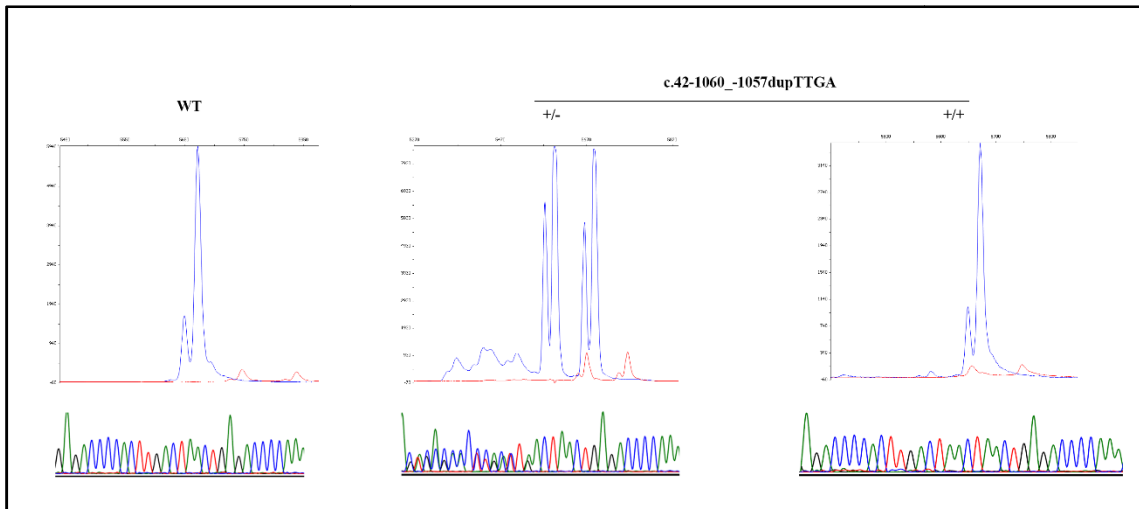


Figura 28. Genotipado de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA*. El marcador ROX, empleado como control para realizar la lectura de tamaños de alelos, produce señal en color rojo. La señal del marcador FAM, que representan los fragmentos de DNA analizados, se observa en color azul.

Los resultados observados en nuestro estudio otorgan una frecuencia para el alelo minoritario (duplicación) de 0,014 (MAF: 0,014). Se trata por lo tanto de un nuevo polimorfismo con una baja prevalencia en nuestra población. En cuanto a la actividad anti-FXa, aunque la disminución en la actividad que se detectaba en portadores de esta mutación era ligera, las diferencias con los valores observados en no-portadores fueron estadísticamente significativas ($p=0,04$): $90,7\pm 6,5\%$ en no-portadores frente al $96,4\pm 7,5\%$ de portadores (**Figura 29**). Esta diferencia es incluso más significativa ($p=0,03$) tras ajustar por edad, sexo, y el genotipo del polimorfismo funcional de *SERPINC1* rs2227589, situado en el intrón 1.

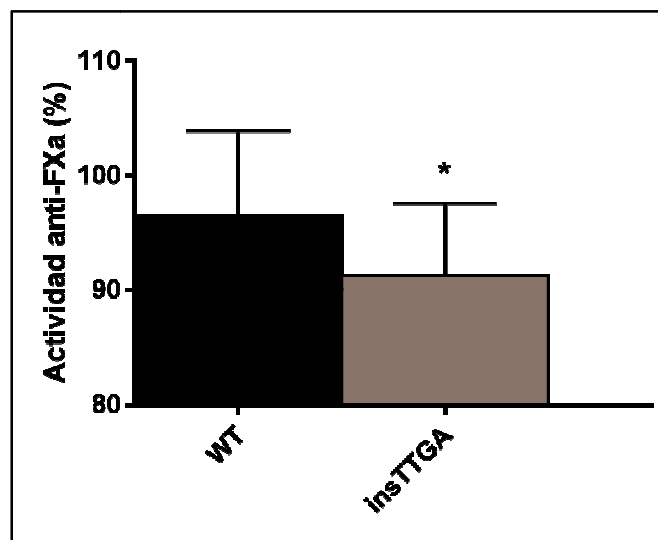


Figura 29. Actividad anti-FXa en plasma de portadores (*insTTGA*) y no portadores (WT) de la mutación *c.42-1060_-1057dupTTGA* del gen *SERPINC1*. * $p < 0,05$.

Como se trataba de un polimorfismo, decidimos genotipar esta duplicación *c.42-1060_-1057dupTTGA* en los 127 casos que presentaban deficiencia de antitrombina justificada por algún defecto genético en los exones o regiones flanqueantes del gen *SERPINC1*. Una mujer de 32 años con una actividad anti-FXa del 52%, y recurrentes episodios de tromboflebitis, era portadora de este polimorfismo en heterocigosis combinado con una mutación patogénica, la delección de 3 pares de bases en el exón 5 que provoca la eliminación del ácido glutámico en posición 344 (p.Glu344del) manteniendo la fase de lectura en el resto de la molécula, alteración ya descrita previamente (CD930907) en un paciente con deficiencia de antitrombina tipo I [151].

Por último, entre nuestra serie de 30 casos con deficiencia de antitrombina y ausencia de mutaciones en regiones codificantes, identificamos una nueva alteración molecular que afectaba a una secuencia VDRE. También se trataba de una duplicación, esta vez de 19pb: *c.42-1087_-1068dup*, también identificada en heterocigosis en una mujer africana (P4), con deficiencia de antitrombina moderada (actividad anti-FXa del 78%) y que tuvo un episodio de tromboembolismo pulmonar y trombosis venosa asociada a cáncer a los 42 años de edad, tras recibir quimioterapia por un carcinoma ductal invasivo. Esta duplicación afecta al mismo elemento VDRE que la mutación anterior, en el intrón 1, pero en esta ocasión JASPAR predijo que la presencia de la duplicación daba lugar a la aparición de un nuevo elemento VDRE adicional (**Figura 30**).

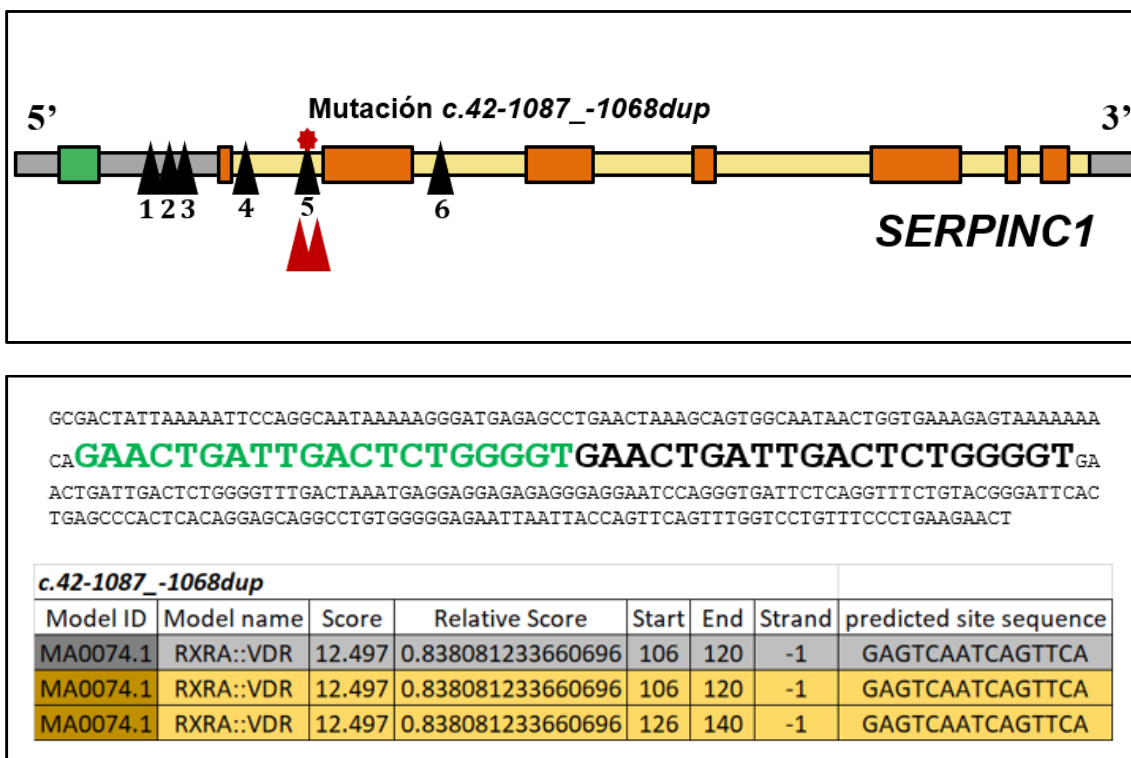


Figura 30. Localización de la mutación *c.42-1087_-1068dup* en el intrón 1 de *SERPINC1*. La secuencia VDRE predicha por JASPAR se muestra en verde, y los nucleótidos duplicados en negro. Los nucleótidos marcados en rojo corresponden al final e inicio de los exones 1 y 2. La figura también muestra el resultado del score de predicción realizada por JASPAR para secuencias RXR α /VDR en la secuencia silvestre (12,5) y mutado (12,5+12,5).

Hemos analizado esta mutación en nuestra población de 307 sujetos sanos caucásicos, pero no la hemos encontrado en ninguno de los individuos. Desafortunadamente, no hemos sido capaces de estudiar esta mutación en población africana. Tampoco fue posible realizar estudios familiares en P4, para validar el efecto funcional de esta nueva mutación.

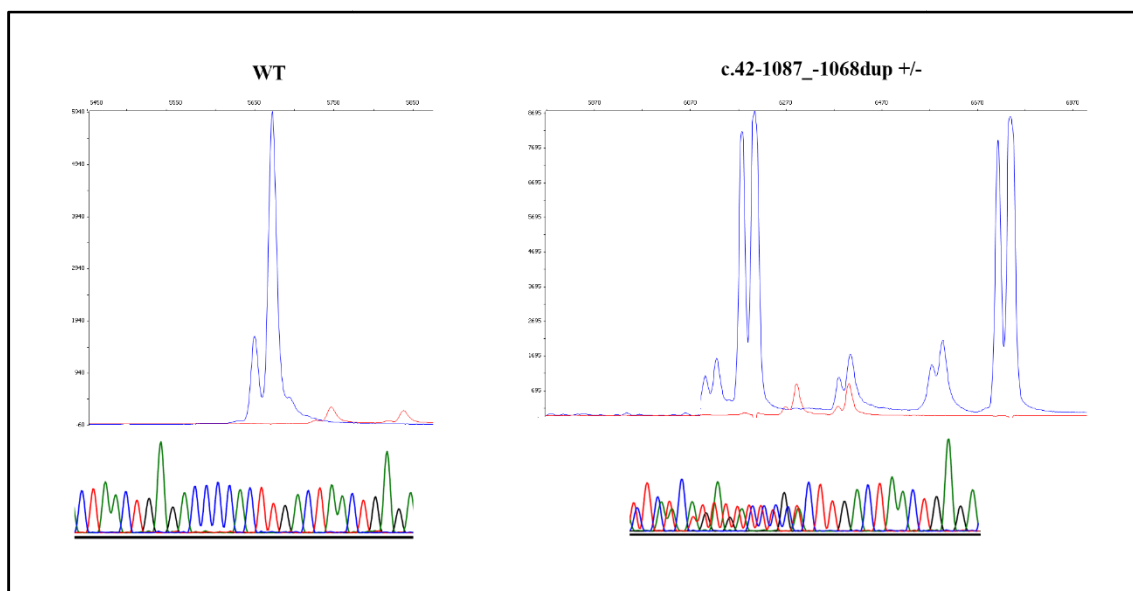


Figura 31. Genotipado de la mutación *c.42-1087_-1068dup*. El marcador ROX, empleado como control para realizar la lectura de tamaños de alelos, produce señal en color rojo. La señal del marcador FAM, que representan los fragmentos de DNA analizados, se observa en color azul.

Tabla 6. Características demográficas, clínicas, analíticas y genéticas de los pacientes con deficiencia de antitrombina y alteraciones en las secuencias regulatorias de *SERPINC1*.

	Sexo	Edad Trombosis	Tipo Trombosis	Factores Riesgo	Hª Familiar Trombosis	Actv. Anti-FXa	Defectos Genéticos
P1	M	30 (27)	Cerebral	-	No	73	c.1-1053C>T
P2	M	64 (63)	TEP	Obesidad	No	69	c.1-171 C>G
P3	V	90 (88)	IC	FA-HT	No	68	c.42-1060_-1057dupTTGA
P4	M	44 (42)	TEP-TVP	Cáncer	No	78	c.42-1087_-1068dup

TEP-Tromboembolismo pulmonar. IC-Ictus cardioembólico. TVP-Trombosis venosa profunda. *Entre los factores de riesgo incluidos están: Trombofilia (FV Leiden, PT G20210A, Deficiencia de Proteína S y Proteína C), anticuerpos antifosfolípidos, Adquiridos: Fumar, Obesidad, FA-Fibrilación auricular, HT-Hipertensión, Hipercolesterolemia, Diabetes o Cáncer.

Nuevos estudios en sujetos con un mismo fondo genético de esta cuarta alteración genética que afecta a una secuencia VDRE son necesarios realizarse para definir la prevalencia, efecto funcional y consecuencias patológicas.

La búsqueda de variaciones genéticas en el gen *SERPINC1* que afectaran a potenciales VDREs, se realizó también entre las alteraciones genéticas descritas en *SERPINC1*, tanto en bases de datos de mutaciones patogénicas como de variabilidad genética (www.ensembl.org). Esta última aproximación descubrió que el polimorfismo rs146692719 (*c.42-1056G>A*), altera el VDRE de mayor *score* del intrón 1 y afectaba al *score* de predicción realizado por JASPAR (**Figura 32**).

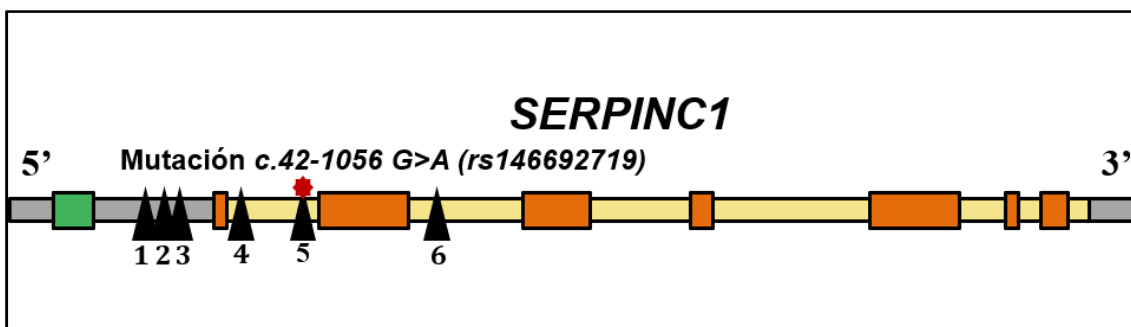


Figura 32. Localización de la mutación *c.42-1056 G>A* rs146692719 en el intrón 1 de *SERPINC1*. La secuencia VDRE predicha por JASPAR se muestra en verde, y los nucleótidos duplicados en negro. Los nucleótidos marcados en rojo corresponden al final e inicio de los exones 1 y 2. La figura también muestra el resultado del *score* de predicción realizada por JASPAR para secuencias RXR α /VDR en la secuencia silvestre (12,5) y mutado (8,5).

Esta alteración genética presentaba un MAF bajo (A:0,0034) ya que solo se identificó en 17 casos del proyecto 1000 genomas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=146692719). Desgraciadamente, este polimorfismo no se podía genotipar por sistemas relativamente sencillos y baratos (PCR-ARSA), y el ensayo TaqMan disponible no podía ser validado al no disponer de ningún control positivo. La secuenciación de 80 controles sanos de nuestra población, no lo detectó en ningún caso. Planteamos que si realmente fuera funcional, este cambio podría detectarse con mayor frecuencia en pacientes con trombosis. Por ello, analizamos este polimorfismo en 83 casos con trombosis venosa y los 80 controles en los que teníamos secuenciado el intrón 1. Desgraciadamente no se detectó en ningún caso o control.

4.1.3 Secuenciación del gen VDR

La secuenciación del gen *VDR* en 17 pacientes, con deficiencia de antitrombina y sin mecanismo molecular conocido, identificó 10 polimorfismos. La frecuencia del alelo minoritario de todas estas alteraciones genéticas era muy parecida en la cohorte de pacientes con deficiencia de antitrombina a la descrita en el HapMap, y en ningún caso fue mayor (**Tabla 7**).

Tabla 7. Frecuencia alélica para los polimorfismos del gen *VDR* identificados en los 17 pacientes con deficiencia de antitrombina (def AT) sin base molecular conocida y la descrita en el HapMap.

Polimorfismo	Alelo	Pacientes def AT	HapMap
rs11568820	G	0,82	0,77
	A	0,18	0,23
rs4516035 (BsrDI)	A	0,59	0,57
	G	0,41	0,43
rs2228570 (FokI)	C	0,53	0,60
	T	0,47	0,40
rs12721367	G	0,94	0,98
	A	0,06	0,02
rs11574106	-	0,97	0,96
	+G	0,03	0,04
rs1544410	G	0,56	0,60
	A	0,44	0,40
rs11574114	G	0,97	0,96
	A	0,03	0,04
rs7975232	G	0,63	0,45
	T	0,37	0,55
rs731236	T	0,63	0,60
	C	0,37	0,40
rs10783218	C	0,97	0,98
	T	0,03	0,02

4.1.4 Genotipado de los polimorfismos funcionales del gen *VDR*

Seleccionamos los polimorfismos capaces de variar la tasa transcripcional del gen *VDR*, rs4516035 y rs2228570, para evaluar su potencial efecto funcional sobre los niveles de antitrombina en nuestra población de sujetos sanos. Estos polimorfismos se genotiparon mediante restricción enzimática (**Figuras 33 y 34**).

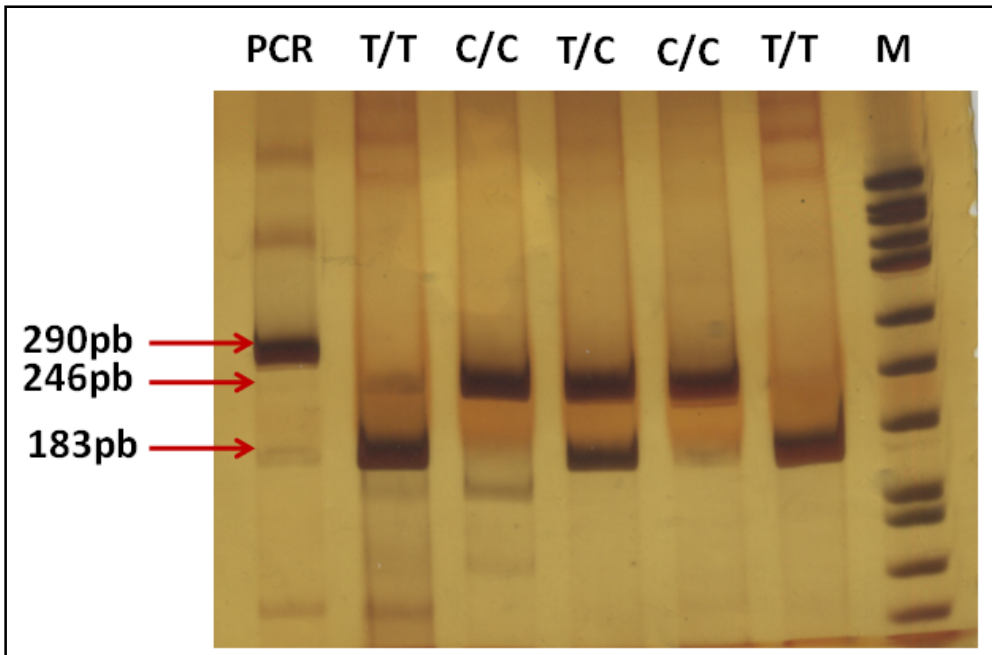


Figura 33. Patrón de restricción con la endonucleasa Fok1 de portadores de los tres posibles genotipos del polimorfismo rs2228570 del gen *VDR*. M: marcador de tamaño. PCR amplicón sin digerir.

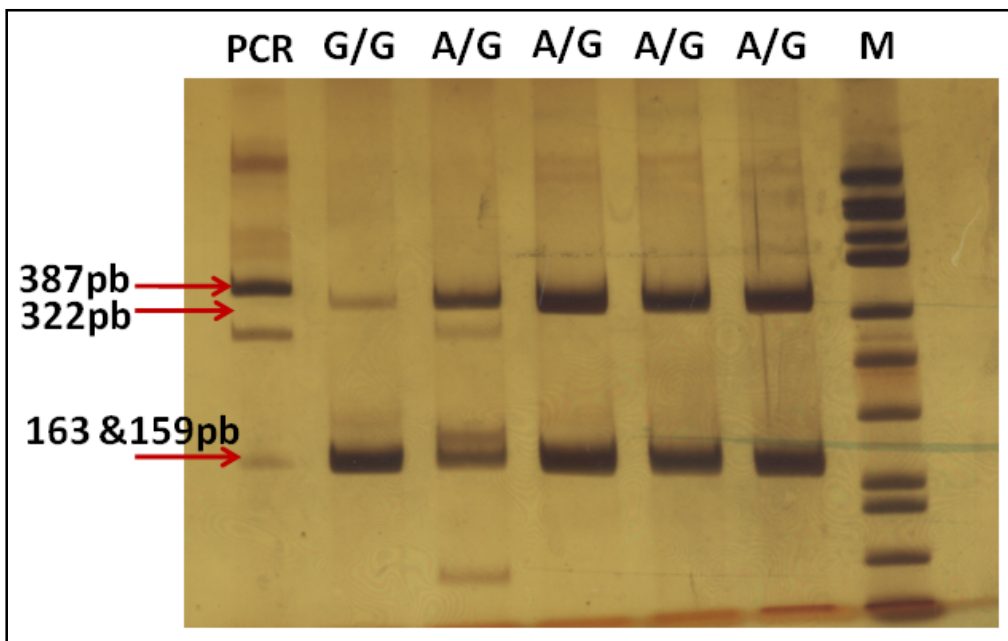


Figura 34. Patrón de restricción con la endonucleasa BsrD1 de portadores de dos de los tres posibles genotipos del polimorfismo rs4516035 del gen *VDR*. M: marcador de tamaño. PCR amplicón sin digerir.

Ambos polimorfismos cumplieron el equilibrio Hardy-Weinberg y las frecuencias del alelo minoritario fueron muy parecidas a las descritas en HapMap (**Tabla 7**). Además, en la **Tabla 8** podemos ver que ninguno de los polimorfismos se asoció de forma significativa con los niveles de antitrombina para la población y el tamaño muestral analizado.

Tabla 8. Frecuencia alélica y asociación de los polimorfismos rs2228570 y rs4516035 con la actividad anti-FXa de antitrombina en la población general. El análisis estadístico se realizó mediante la t-Student utilizando el modelo dominante.

Polimorfismo	Frecuencia Alélica	Genotipos (N)	Actividad Anti-FXa (%) Media±SD	p
rs2228570 Fok1	T: 0,32 C: 0,68	C/C (35)	92,64±6,8	0,41
		T/C (44)	93,81±7,9	
		T/T (5)	95,63±6,5	
rs4516035 Bsrd1	A: 0,57 G: 0,43	A/A (38)	93,81±6,8	0,24
		A/G (53)	95,54±7,7	
		G/G (23)	95,29±5,9	

Sin embargo, el análisis de los haplotipos definidos por ambos polimorfismos e identificados con el programa SNPstat (<https://www.snpstats.net/start.htm>) reveló que uno de los haplotipos (haplotipo 3), se asociaba de forma significativa con mayores niveles de antitrombina (**Tabla 9**).

Tabla 9. Identificación de haplotipos del gen VDR definidos por los polimorfismos rs2228570 y rs4516035. La asociación de cada haplotipo con la actividad anti-FXa de antitrombina también se muestra.

	rs2228570	rs4516035	Frecuencia	Diferencia(95% CI)	P
1	C	A	0,410	0,000	-----
2	C	G	0,259	3,220 (-0,230 – 6,670)	0,073
3	T	A	0,179	6,970 (2,740 – 11,210)	0,002
4	T	G	0,150	-0,270 (-4,880 – 4,350)	0,910

Asociación global con respuesta p: 0,91

4.1.5 Efecto *in vitro* de la vitamina D en el control transcripcional de *SERPINC1* en la línea celular HepG2

Para determinar mejor el papel de la vitamina D en el control transcripcional del gen *SERPINC1*, empleamos un modelo celular. La línea celular hepática HepG2, que expresa *SERPINC1*, fue incubada durante 24h con distintas dosis de paricalcitol (40, 80 y 106 ng/m). La expresión del gen *SERPINC1* se analizó mediante qRT-PCR. El tratamiento con paricalcitol provocaba un aumento de la expresión de *SERPINC1* estadísticamente significativo ($p < 0,01$). Además, este aumento transcripcional era dosis dependiente, de forma que las dosis de 106 ng/ml prácticamente duplicaban los niveles de ARNm de *SERPINC1* que presentan las células no tratadas (**Figura 35**).

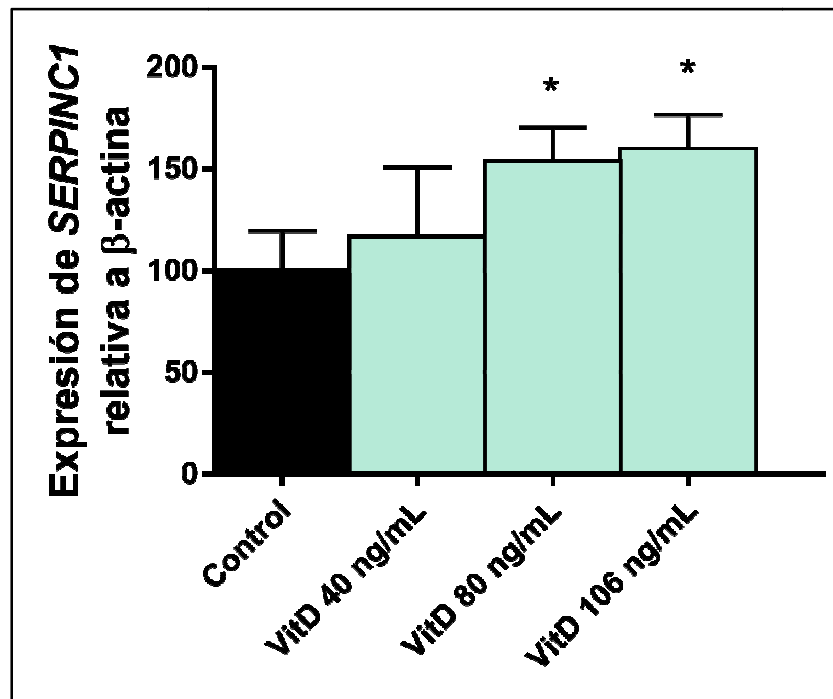


Figura 35. Expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con diferentes dosis de paricalcitol durante 24 horas. Los valores de las células no tratadas se muestran como el valor de referencia (100%).

Este aumento transcripcional se correlaciona con un aumento paralelo de la antitrombina secretada al medio. Para la dosis más alta, se confirma un aumento de 1.5 veces en los niveles de antitrombina secretada al medio de cultivo (**Figura 36**). Sin embargo, los niveles de protrombina secretados al medio de cultivo no se ven afectados como consecuencia del tratamiento con paricalcitol (**Figura 35**).

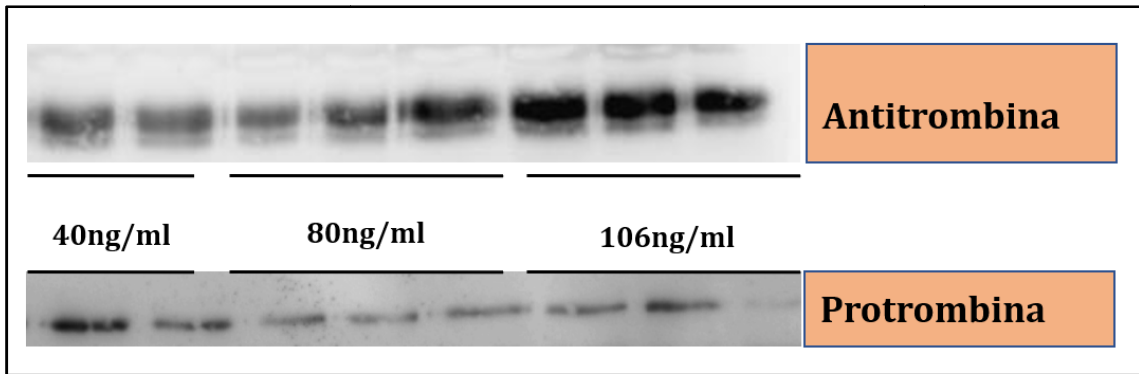


Figura 36. Efecto del paricalcitol, análogo de la vitamina D, en los niveles de antitrombina y protrombina secretadas al medio de cultivo de células HepG2 y detectadas mediante Western Blot.

Finalmente, es interesante destacar que el tratamiento con paricalcitol también modificaba significativamente, y de nuevo, dosis dependiente, los niveles de expresión del gen *VDR* en células HepG2, de forma que las dosis más elevadas (80 y 106 ng/ml) duplicaban los niveles de ARNm de este gen respecto a los valores observados en células no tratadas (Figura 37).

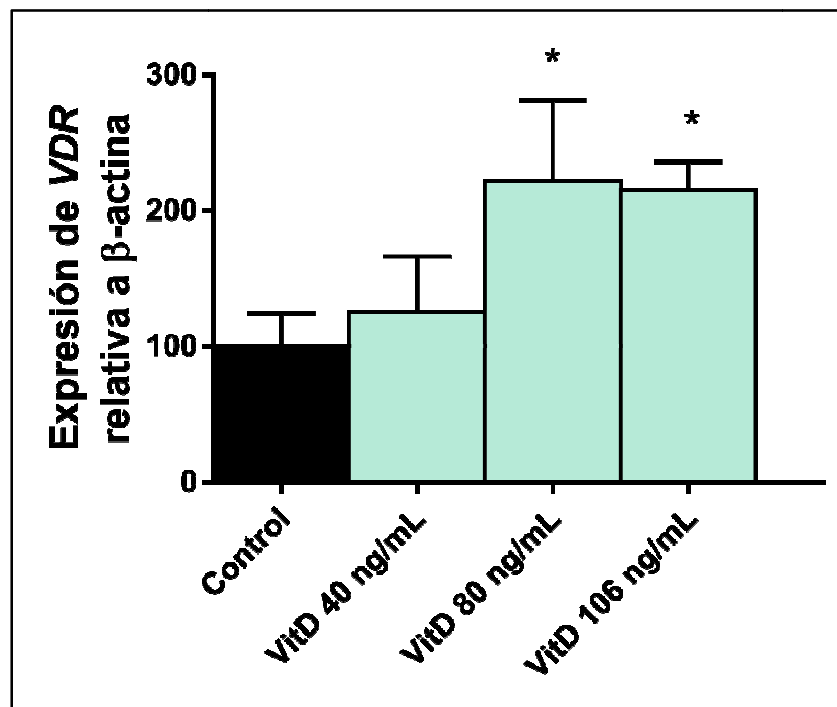


Figura 37. Expresión de *VDR* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con diferentes dosis de paricalcitol durante 24 horas. Los valores de las células no tratadas se muestran como el valor de referencia (100%).

4.1.6 Efecto de la forma activa de la vitamina D sobre la antitrombina en pacientes con insuficiencia renal

Cinco pacientes, con insuficiencia renal crónica y niveles elevados de PTH, iniciaron el tratamiento con paricalcitol, 2 μ g/mL en cada sesión de diálisis. Se tomaron muestras pre y post-diálisis al inicio del tratamiento 0, en los días +2, y +4. Evaluamos los niveles de antitrombina (anti-FXa) en plasma en las muestras Pre y Post diálisis.

Como está descrito, los pacientes con insuficiencia renal presentan una ligera reducción de los niveles de antitrombina plasmática, si los comparamos con los valores observados en la población general. Sin embargo, el tratamiento con paricalcitol no aumentó los niveles de antitrombina de forma significativa (**Figura 38**). Con el tratamiento parece que los valores basales pudieran subir, pero no alcanzan significación estadística y tras 40 días de tratamiento con paricalcitol, los valores anti-FXa pre-diálisis son similares a los del momento pre-diálisis sin tratamiento. Si analizamos los niveles de proteína en los diferentes momentos, observamos un aumento con el tiempo del tratamiento (**Figura 38**).

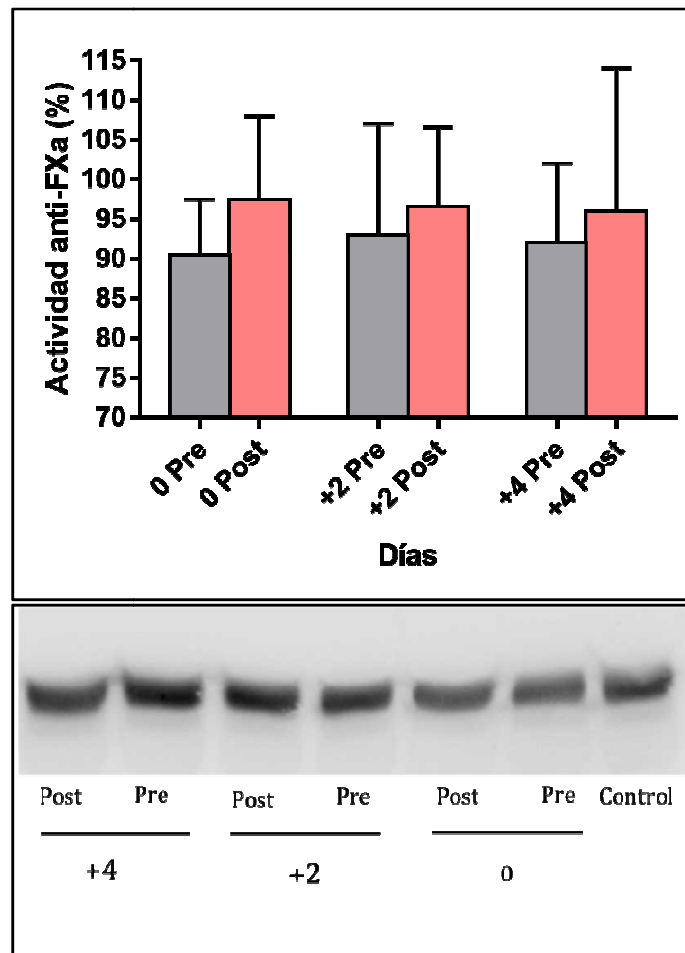


Figura 38. Efecto del paricalcitol(2 μ g/mL/día)sobre la antitrombina plasmática de 5 pacientes con insuficiencia renal crónica en tres momentos del tratamiento: basal, día +2 y día +4. (A) Actividad anti-FXa. En gris se muestran los valores obtenidos en la muestra tomada pre-diálisis, en tono coral la muestra en momento post-diálisis. (B) Antitrombina plasmática, identificada por *Western Blot* en un paciente representativo.

4.2 Ácidos biliares y antitrombina

4.2.1 Datos clínicos y funcionales de pacientes con niveles inesperadamente elevados de antitrombina

Estudiamos tres pacientes no emparentados entre sí, procedentes del Hospital Universitario y Politécnico de la Fe de Valencia, incluidos en lista de espera de trasplante hepático, que sorprendentemente presentaban niveles de antitrombina inesperadamente elevados (anti-FXa: 150-190%). Los detalles demográficos, características clínicas y valores de los parámetros bioquímicos de los probandos, se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características demográficas, clínicas y parámetros bioquímicos de las pacientes con niveles de antitrombina (AT) sorprendentemente elevados para la insuficiencia hepática que presentaba. BT: Bilirrubina total (0,1-1,1); **AST:** Aspartato transaminasa (10-30); **ALT:** Alanina transaminasa (5-30); **GGT:** Gamma glutamil transpeptidasa (7-32); **ALP:** Fosfatasa alcalina (35-290). Los valores entre paréntesis de los parámetros hepáticos muestran el rango de normalidad.

P	Edad	Sexo	Anti-FXa	BT	AST	ALT	GGT	ALP
1	14 años	M	180%	1,53	93	81	190	517
2	4 años	M	190%	8,87	215	255	911	1773
3	3 meses	M	150%	0,96	115	101	3642	480

Los sorprendentes valores elevados de antitrombina de los 3 probandos se validaron mediante diferentes sistemas inmunológicos adicionales. El análisis por Laurell, y los estudios de la antitrombina plasmática mediante *Western Blot* empleando diferentes condiciones electroforéticas (SDS en condiciones reductoras y no-reductoras), confirmaron los niveles elevados de antitrombina en los tres casos (**Figura 39**).

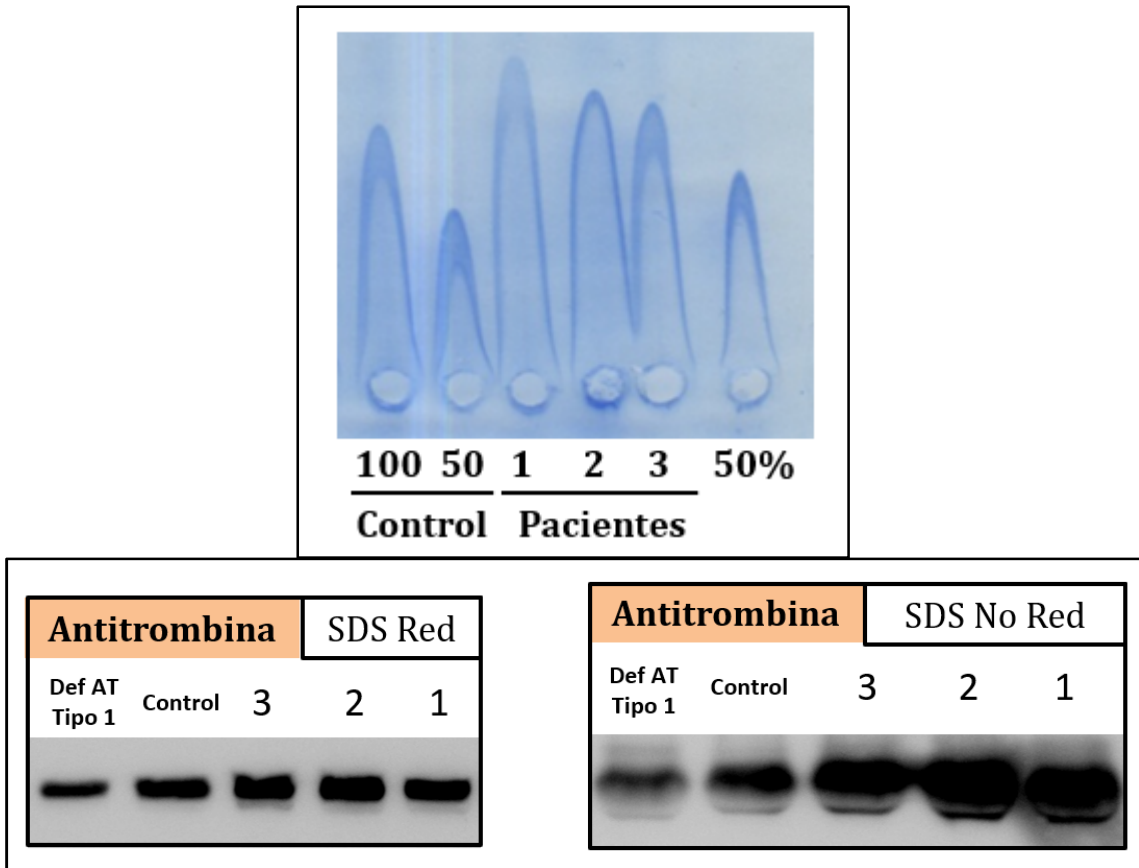


Figura 39. Niveles de antitrombina en plasma en los casos 1, 2, 3, con insuficiencia hepática. Como controles se emplearon un sujeto sano y un paciente con deficiencia congénita de antitrombina tipo I (A) Laurell. (B) *Western Blot* de antitrombina tras separación electroforética en dos condiciones desnaturalizantes reductoras y no reductoras.

Sin embargo, los valores de otras proteínas hepáticas en estos pacientes eran normales o reducidas. Así, tanto la protrombina, como la α 1-antitripsina, analizadas mediante *Western Blot* mostraban niveles menores (especialmente en el paciente 3) o normales en los tres pacientes, mientras que eran similares en los dos controles empleados (un sujeto sano y un paciente con deficiencia congénita de antitrombina) (Figura 40).

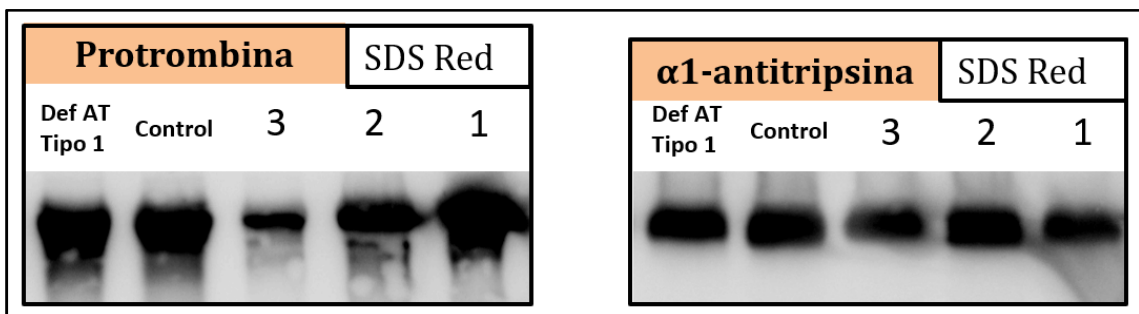


Figura 40. Niveles de otras proteínas hepáticas en el plasma de los tres pacientes con insuficiencia hepática que presentaban mayores niveles de antitrombina. Como controles se emplearon un sujeto sano y un paciente con deficiencia congénita de antitrombina tipo I (A) Protrombina; (B): α 1-antitripsina.

Los niveles de otras proteínas hepáticas, como la proteína C, proteína S, albúmina y FVII, determinados por métodos funcionales o inmunológicos, estaban por debajo del rango de la normalidad o se encontraban en dicho rango en los tres pacientes (Tabla 11).

Tabla 11. Niveles de proteína C, proteína S y albúmina en los tres pacientes con niveles anormalmente elevados de antitrombina.

P	Proteína C [70-140%]	Proteína S [58-112%]	Albúmina [3,4-4,1 g/dL]	FVII [70-129%]
1	76%	114,7%	4,8 g/dL	ND
2	80%	79,2%	4,1 g/dL	85,1%
3	ND	ND	3,9 g/dL	142,1%

P-Paciente. ND-No determinado.

Clínicamente, las tres pacientes presentaban en común el mecanismo subyacente a su disfunción hepática: una atresia de vías biliares. Este aspecto fue clave para definir, como veremos posteriormente, posibles mecanismos que justificaran el incremento específico de los niveles esperados de antitrombina.

4.2.2 Análisis molecular de SERPINC1

El estudio molecular del gen *SERPINC1*, incluidos 1500pb de la región promotora, no mostró ninguna alteración genética relevante, en ninguno de los 3 casos con insuficiencia hepática y altos niveles de antitrombina.

4.2.3 Modulación de la expresión de SERPINC1 en células HepG2

Evaluamos el efecto de 4 sustancias de las que existían evidencias bibliográficas que justificaban un potencial efecto en la expresión de *SERPINC1* y que podrían estar sobreexpresados en las pacientes por su clínica biliar: DEXA, GW4064, T3 y vitamina D. Este estudio se realizó empleando el mismo modelo celular que el empleado en el capítulo anterior: incubando durante 24h células hepáticas HepG2 con estas sustancias, y evaluando la expresión génica de *SERPINC1* mediante qRT-PCR.

La Dexametasona (500nM) y el GW4064 (1µM) aumentaban de manera moderada pero significativa la expresión de *SERPINC1*, lo cual encaja con los resultados observados en anteriores estudios [102]. Niveles de vitamina D superiores a 80ng/mL también aumentaron de manera significativa y dosis dependiente los niveles transcripcionales de

SERPINC1, confirmando nuestros resultados anteriores [152]. Sin embargo, los resultados observados con T3 fueron enigmáticos, ya que se observó un incremento de la expresión de *SERPINC1* dosis dependiente, pero sobre unos niveles que son significativamente inferiores a los observados en células no tratadas, diferentes a los descritos anteriormente en la literatura (Figura 41) [59].

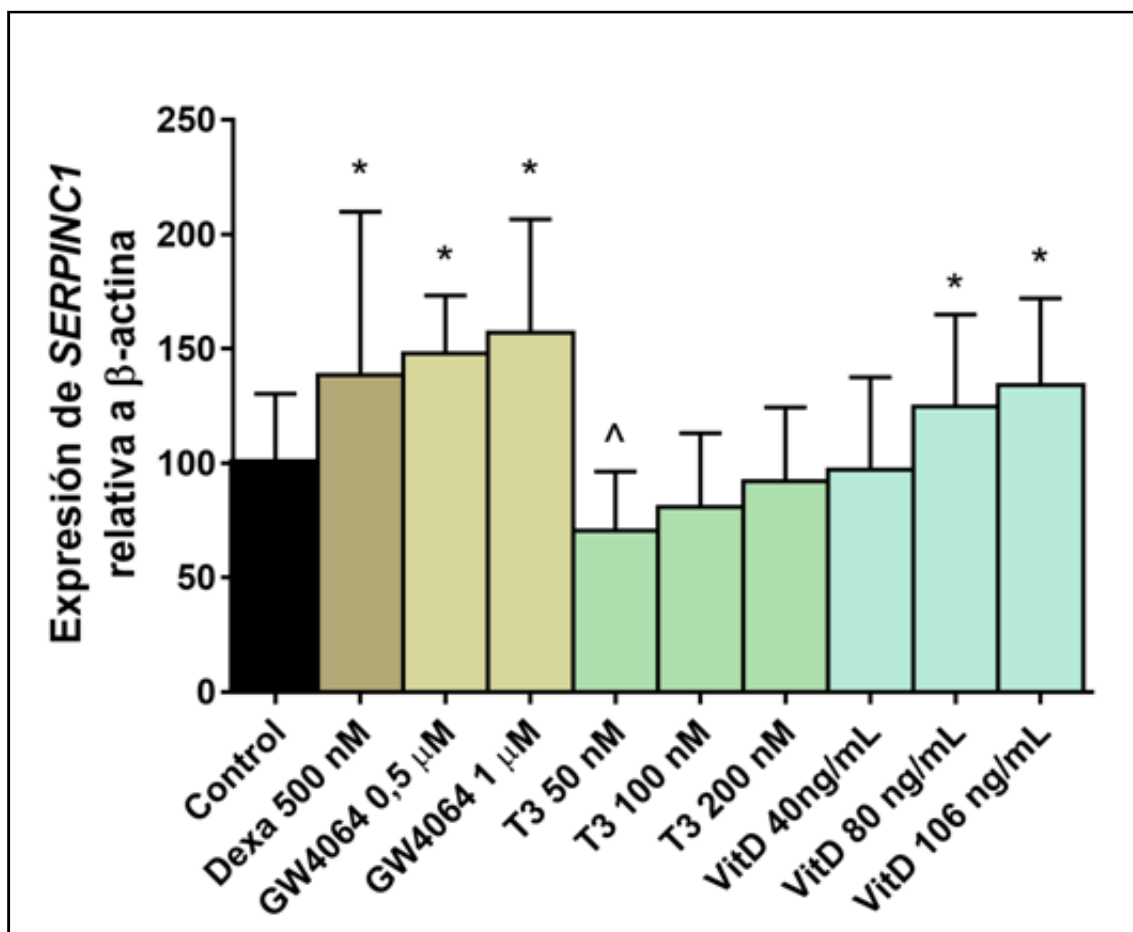
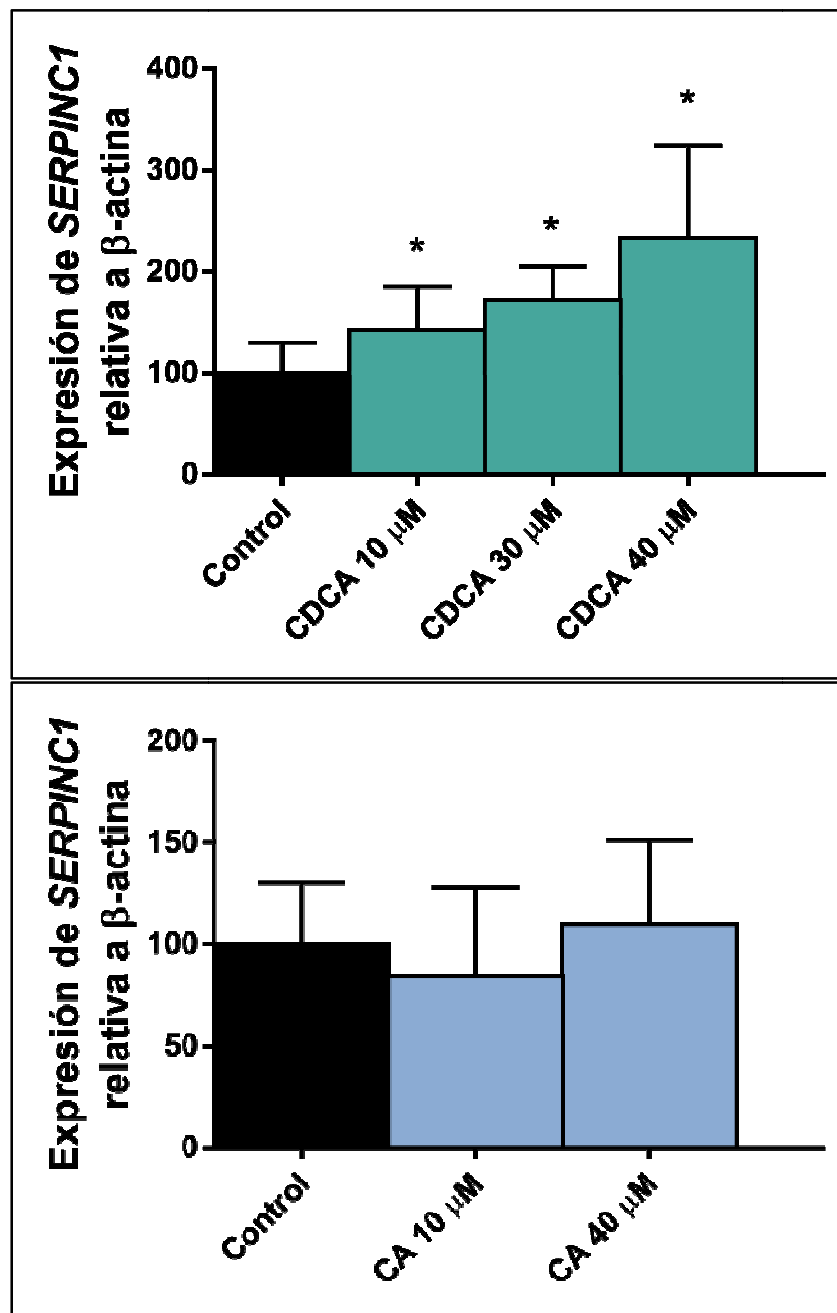


Figura 41. Efecto sobre la expresión génica de *SERPINC1* del tratamiento de células HepG2 con Dexametasona (Dexa), GW4046, Triyodotironina (T3) y Paricalcitol (VitD). La expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con los diferentes agentes durante 24 horas se muestra en relación con los valores de las células no tratadas que actúan como el valor de referencia (100%). Los datos se muestran como media \pm SEM *y ^ $p < 0,05$; en un caso por aumento relativo al control, en el otro por descenso comparado con el control.

La identificación de niveles elevados de antitrombina en pacientes con atresia biliar fue el indicio que nos impulsó a realizar y evaluar los efectos de 4 ABs diferentes sobre la expresión de *SERPINC1*. Así, células HepG2 fueron tratadas con CDCA, CA, UDCA y LCA. Se seleccionaron CDCA y CA por ser los ABs más abundantes en la bilis humana (CDCA 45% y CA 31%) y LCA como representante del comportamiento de una sal secundaria, y por ser el LCA el resultado de la acción de las enzimas de las bacterias de la

flora intestinal sobre CDCA, que como veremos es el AB con mayor peso en el control de la antitrombina. Empleamos también UDCA por su uso clínico en diferentes situaciones y enfermedades, y por el hecho de que a las tres pacientes estudiadas en este proyecto se les había administrado como terapia ante su colestasis.

Como se muestra en la **Figura 42**, CDCA aumentó de forma significativa y dosis dependiente la expresión de *SERPINC1*. Con la dosis más alta (40 μ M) se consiguió un aumento de más de dos veces en los niveles del ARNm relativo a las células no tratadas. UDCA, solo provocó un aumento de la expresión de *SERPINC1* cuando se empleaban dosis altas. Sin embargo, el tratamiento con CA no provocó ningún efecto significativo. Y llamativamente, el tratamiento con LCA, redujo, de forma dosis dependiente los niveles de ARNm de *SERPINC1*.



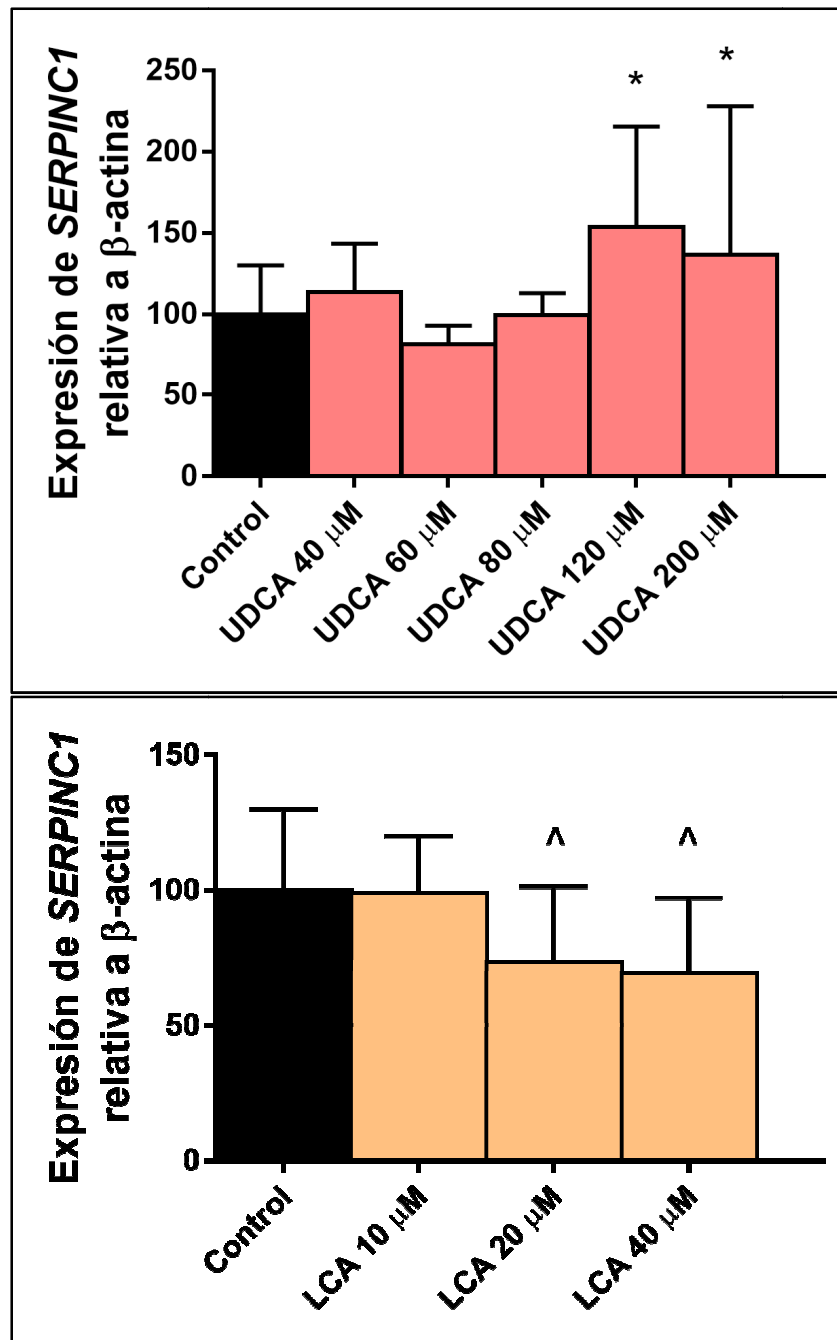


Figura 42. Efecto sobre la expresión génica de *SERPINC1* del tratamiento de células HepG2 con diferentes dosis de distintos ácidos biliares: CDCA, CA, UDCA y LCA. La expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en células HepG2 tratadas con los diferentes agentes durante 24 horas se muestra en relación con los valores de las células no tratadas que actúan como el valor de referencia (100%). Los datos se muestran como media \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.2.4 Efecto *in vivo* de CDCA sobre la expresión de *SERPINC1* y niveles de antitrombina plasmáticos

Dado que el mayor efecto sobre *SERPINC1* se observó con CDCA, el siguiente paso consistió en evaluar el efecto *in vivo* de diferentes dosis de este AB en un modelo murino (ratones *Swiss*). Los ratones fueron tratados con aceite de maíz (control) y distintas dosis de CDCA (6 mg/kg, 12,5 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg) durante 3 días. Una vez finalizado el tratamiento, el ratón se sacrificó, se extrajo el hígado y se analizaron los cambios de expresión de *SERPINC1* mediante qRT-PCR. Como se muestra en la **Figura 43**, CDCA aumentó de forma dosis dependiente la expresión hepática de *SERPINC1*, alcanzando diferencias estadísticamente significativas respecto a los ratones no tratados con dosis de CDCA por encima de 25 mg/kg.

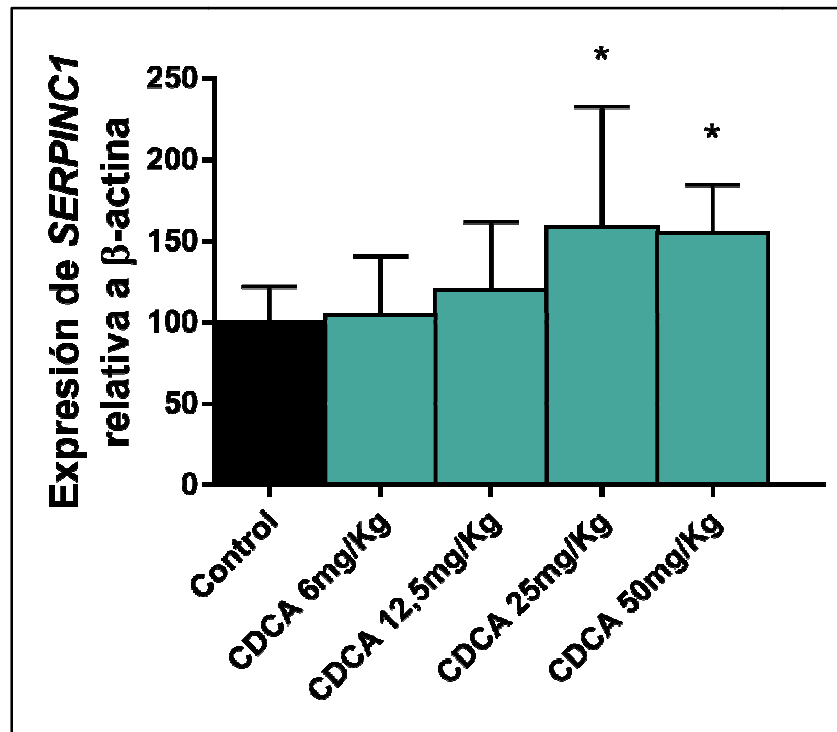


Figura 43. Efecto *in vivo* del CDCA en la expresión hepática de *SERPINC1* tras tres días de tratamiento. La expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en el hígado de ratones tratados con las diferentes dosis de CDCA horas se muestra en relación con los valores de los ratones no tratados que actúan como el valor de referencia (100%). Los datos se muestran como media \pm SEM de tres experimentos independientes con 5 animales en cada grupo. * $p < 0,05$.

El siguiente paso fue evaluar si este AB pudiera corregir el defecto congénito de antitrombina que presentaban los ratones deficientes heterocigotos de antitrombina C57BL/6J *serpinc1* +/- . Para ello, ratones deficientes y ratones silvestres se trataron durante 3 días con la menor dosis de CDCA que presentaba efectos significativos sobre

SERPINC1 en ratones *Swiss*: 25 mg/kg. Este tratamiento consiguió restablecer los niveles de *SERPINC1* a niveles del 100%, a los niveles observados en los ratones C57BL/6J *serpinc1*+/+ (Figura 44).

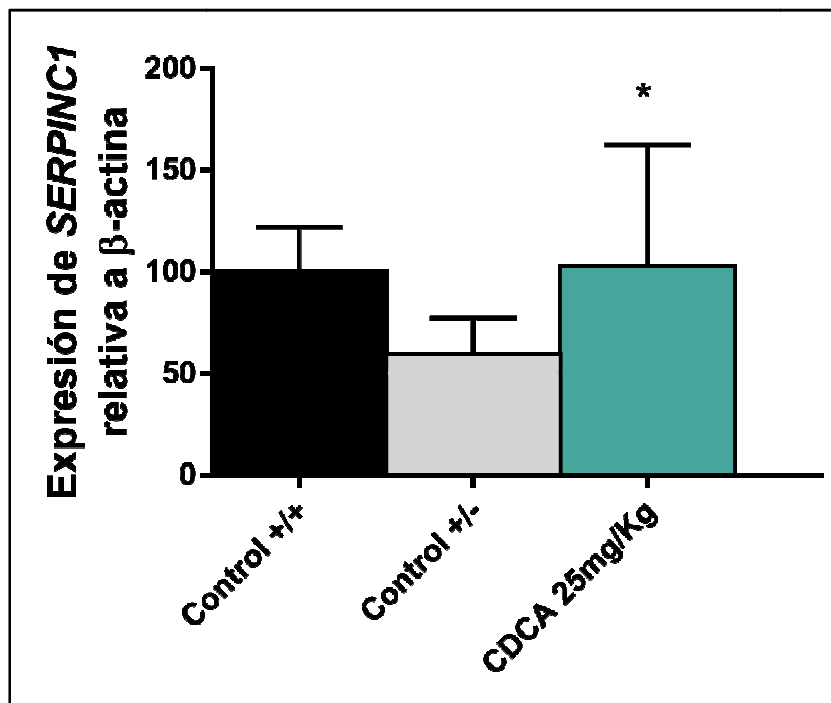


Figura 44. Efecto *in vivo* del CDCA (25 mg/kg) en la expresión hepática de *SERPINC1* tras tres días de tratamiento. La expresión de *SERPINC1* (relativa a la expresión de β -actina) en el hígado de ratones C57BL/6J *serpinc1* +/- tratados o no con CDCA horas se muestra en relación con los valores de los ratones C57BL/6J *serpinc1* +/+ no tratados que actúan como el valor de referencia (100%). Los datos se muestran como media \pm SEM de tres experimentos independientes con 5 animales en cada grupo. * $p < 0,05$.

4.3 Antitrombina Milano

4.3.1 Caracterización de la mutación p.Arg393Cys

Estudiamos una familia con dos miembros diagnosticados de deficiencia de antitrombina. El hijo, un varón que sufrió un evento trombótico (TVP+TEP) espontáneo con 20 años de edad y su madre asintomática (Figura 44).

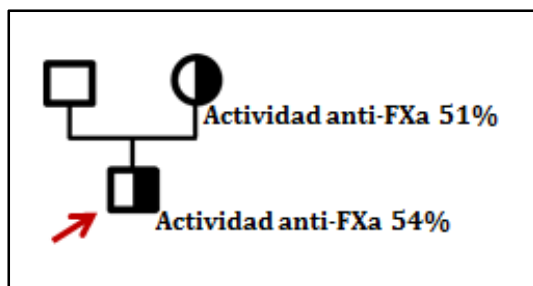


Figura 45. Árbol genealógico de la familia estudiada. La flecha muestra al probando. Los niveles de actividad anti-FXa se muestran.

Los dos pacientes presentaban niveles antigénicos normales (93 y 105%), confirmados por estudios de *Western blot* (**Figura 46**). Este resultado llevó al diagnóstico de una deficiencia de antitrombina tipo II.

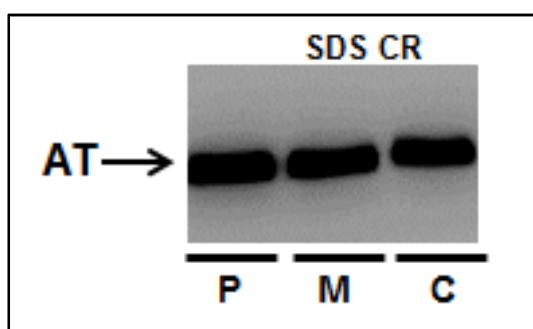


Figura 46. Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por *Western blot* tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras. P: Probando, M: Madre, C: Control. SDS CR: SDS Condiciones Reductoras.

El estudio molecular del gen *SERPINC1* reveló que ambos sujetos eran portadores de una mutación puntual *c.1273C>T* en heterocigosis en el exón 7 del gen *SERPINC1* que afectaba al residuo P1 del RCL: p.Arg393Cys, p.Arg425Cys, contando el péptido señal (**Figura 47**).

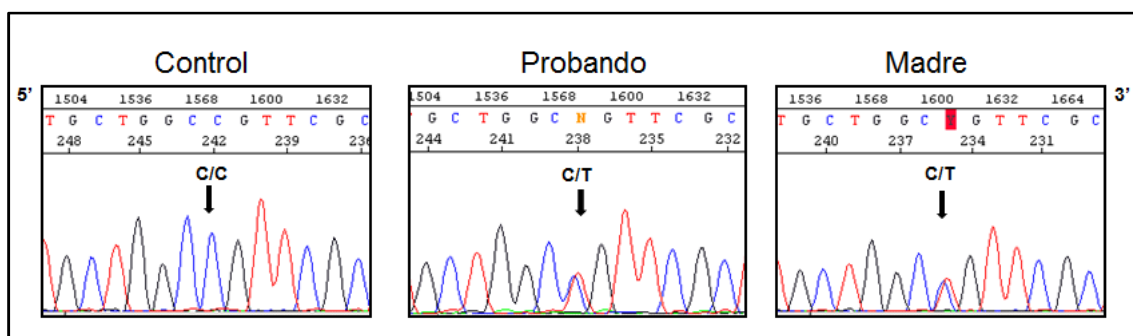


Figura 47. Electroferogramas del exón 7 del gen *SERPINC1* en el probando, su madre y un sujeto sano. El genotipo para la posición *c.1273* en cada caso queda reflejado.

Esta mutación ya estaba descrita (CM880012) y es responsable de una deficiencia tipo II RCL que provoca la interacción de la antitrombina mutada con la albúmina [44, 45, 114]. De hecho, el estudio de la antitrombina plasmática mediante *Western blot* tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes no reductoras de los casos identificados en este estudio, demostró la existencia de un complejo covalente unido por puentes disulfuro que contiene antitrombina (**Figura 48**).

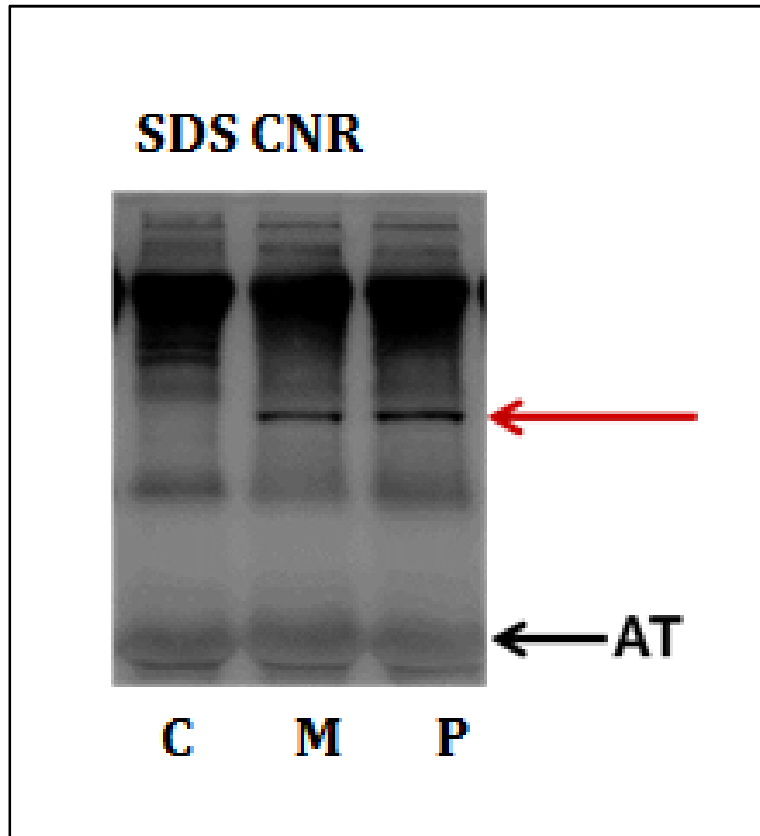


Figura 48. Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por *Western blot* tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras. La flecha negra muestra el monómero de antitrombina, mientras que la flecha roja marca al complejo covalente unido por puentes disulfuro, que implica antitrombina.

Sorprendentemente, el estudio electroforético de la antitrombina plasmática en ambos portadores en condiciones nativas mostró no dos, sino tres bandas reconocidas por el anticuerpo anti-antitrombina (**Figura 49**). Además de la forma nativa correspondiente al alelo silvestre, se detectaron dos bandas adicionales de similar intensidad: una de menor movilidad electroforética (V1) y otra de mayor movilidad electroforética (V2) que la forma nativa silvestre de antitrombina, posiblemente variantes moleculares.

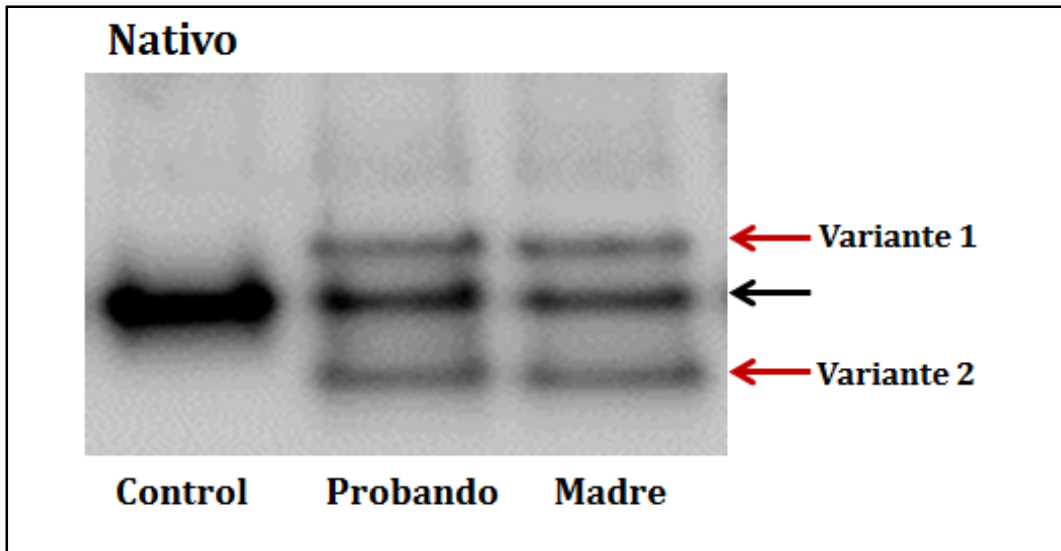


Figura 49. Antitrombina plasmática en el paciente, su madre y un control sano detectada por *Western blot* tras electroforesis en condiciones nativas. La flecha negra muestra la antitrombina nativa, mientras que las flechas rojas marcan las dos variantes presentes en los portadores de la mutación p.Arg393Cys.

La purificación de la antitrombina plasmática mediante cromatografía de afinidad por heparina mostró que las dos variantes detectadas en los pacientes portadores de la mutación p.Arg393Cys presentan mayor afinidad por heparina que la forma nativa silvestre (**Figura 50**).

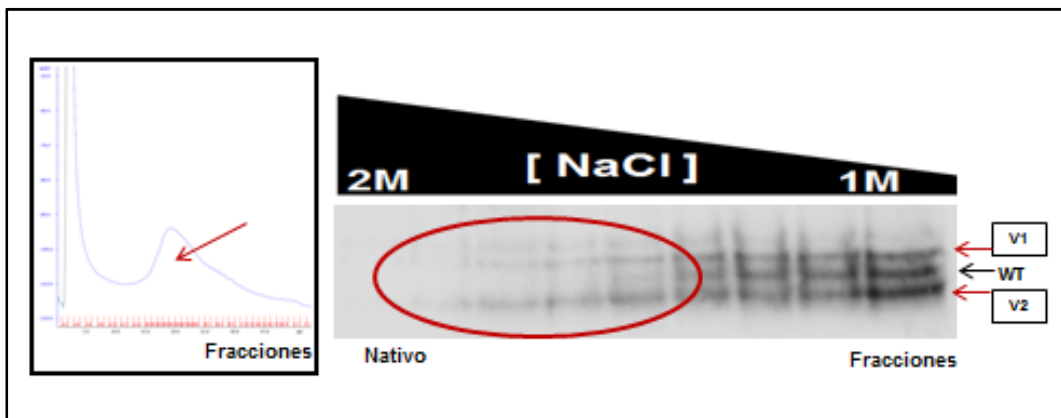


Figura 50. Purificación del plasma de las variantes de antitrombina con la mutación p.Arg393Cys. A) Perfil de elución del plasma del paciente tras cromatografía de afinidad por heparina. B) Análisis de la antitrombina en las fracciones del gradiente de elución realizado con NaCl. La antitrombina se detectó por *Western blot* tras electroforesis en condiciones nativas. La flecha negra muestra la antitrombina nativa, mientras que las flechas rojas marcan las dos variantes presentes en los portadores de la mutación p.Arg393Cys sugiriendo que la variante V2 se transforma en la V1 por el calor.

La pérdida de la Arg393 causada por otras mutaciones en *SERPINC1* detectadas en pacientes con deficiencia de antitrombina, da lugar a una variante que tiene mayor movilidad electroforética en condiciones nativas que la forma silvestre, por la pérdida de un residuo con alto punto isoeléctrico (10,76) y por ser un residuo muy expuesto. En nuestra serie de pacientes con deficiencia de antitrombina, dos mutaciones adicionales afectando este residuo, han sido identificadas: la delección de la arginina 393 (responsable de la variante London) y la que sustituye la arginina por histidina (responsable de la variante Glasgow). El análisis de la antitrombina plasmática tras electroforesis en condiciones nativas, en los portadores de estas mutaciones, mostraba una segunda banda de mayor movilidad electroforética que la forma nativa, pero en ambos casos solo una forma variante y con movilidad electroforética menor que la identificada en los portadores de la mutación p.Arg393Cys (**Figura 51**). Este resultado nos llevó a plantear que la forma de mayor movilidad electroforética (V2) podría corresponder al monómero de antitrombina variante, mientras que la forma con menor movilidad (V1) pudiera reflejar al dímero antitrombina-albúmina (**Figura 49**).

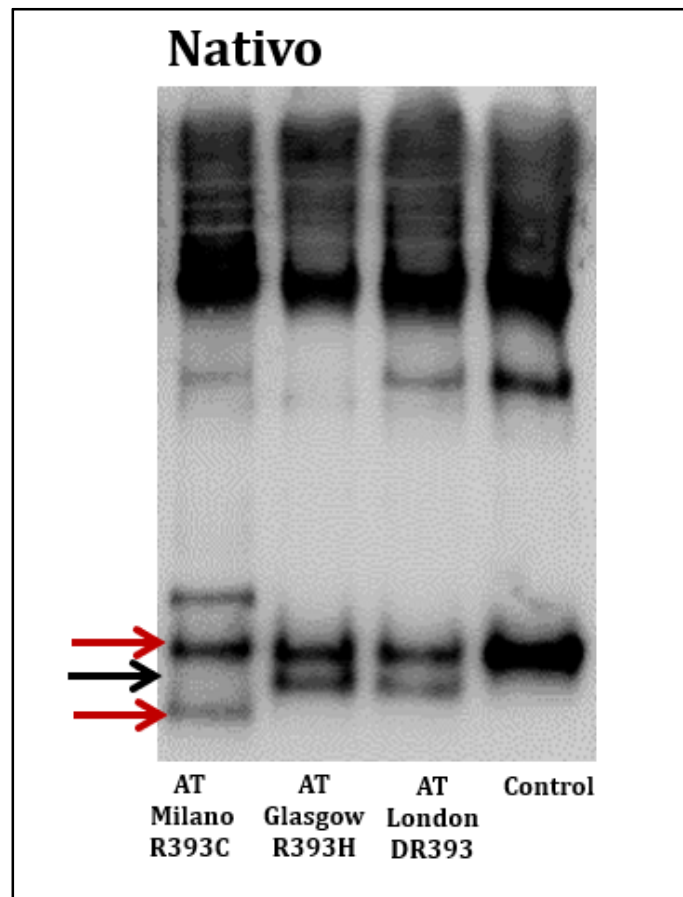


Figura 51. Antitrombina plasmática en portadores de diferentes mutaciones que afectan al residuo Arg393 y un control sano detectada por *Western blot* tras electroforesis en condiciones nativas. La flecha negra muestra la antitrombina nativa, mientras que las flechas rojas marcan las dos variantes presentes en los portadores de la mutación p.Arg393Cys con una posible explicación. La banda con mayor movilidad electroforética pertenece a la forma monomérica, y la de menor movilidad al dímero formado con albúmina.

Para poder avalar esta hipótesis, y al no disponer de anticuerpo contra la albúmina que pudiera verificar de forma sencilla, planteamos tratar el plasma de los portadores con calor, por ser éste un elemento que afecta la estructura y conformación de la antitrombina [41]. La incubación del plasma a 42°C durante 24h provocó la desaparición gradual de la banda de mayor movilidad electroforética en condiciones nativas a expensas de un incremento, proporcional al tiempo de incubación, de la banda de menor movilidad correspondiente, de acuerdo con nuestra hipótesis, al complejo unido por puentes disulfuro con la albúmina (**Figura 52**).

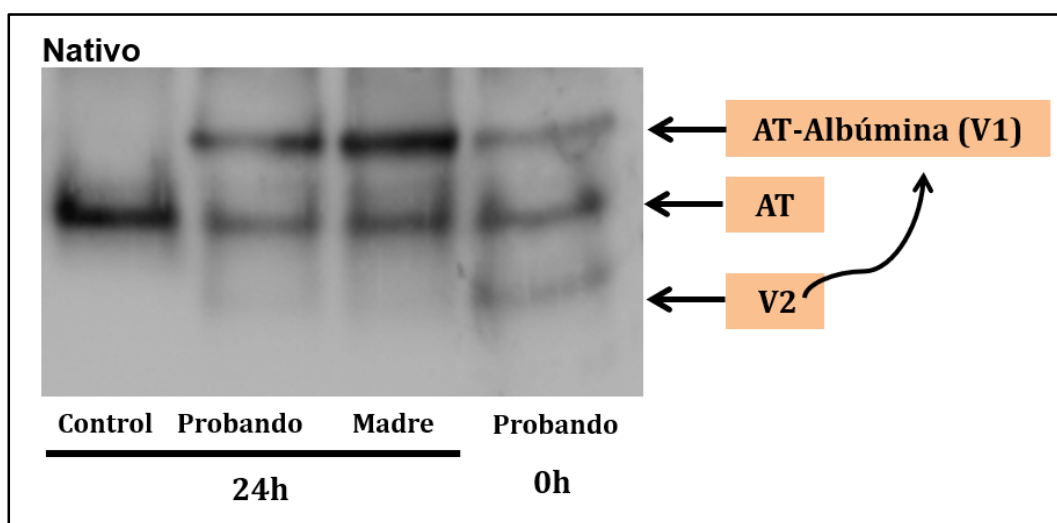


Figura 52. Antitrombina plasmática en portadores de la mutación p.Arg393Cys y un control sano en condiciones basales (0 h) y tras tratamiento del plasma a 42°C durante 24 horas. La antitrombina se detectó por *Western blot* tras electroforesis en condiciones nativas. Se indican mediante flechas la antitrombina nativa, las dos variantes presentes en los portadores de la mutación p.Arg393Cys sugiriendo que la variante V2 se transforma en la V1 por el calor.

A continuación se realizó una purificación de la antitrombina del plasma de portadores de la mutación p.Arg393Cys basal y tras incubación durante 24 horas a 42°C. La purificación implicaba dos procesos sucesivos, primero cromatografía de afinidad por heparina, y posteriormente un proceso de gel filtración para separar las formas de antitrombina por su tamaño, ya que este proceso permite separar monómeros de antitrombina de dímeros de antitrombina unidos por puentes disulfuro [153]. Este procedimiento mostró que, en condiciones basales, la proporción del monómero era significativamente mayor que la del dímero (**Figura 53**). Sin embargo, el calentamiento a 42°C del plasma invertía esta proporción (**Figura 54**). Este resultado apoyaba que el calor pudiera transformar la variante monomérica en dímero de antitrombina, con una molécula de similar tamaño (potencialmente albúmina) como la variante V1.

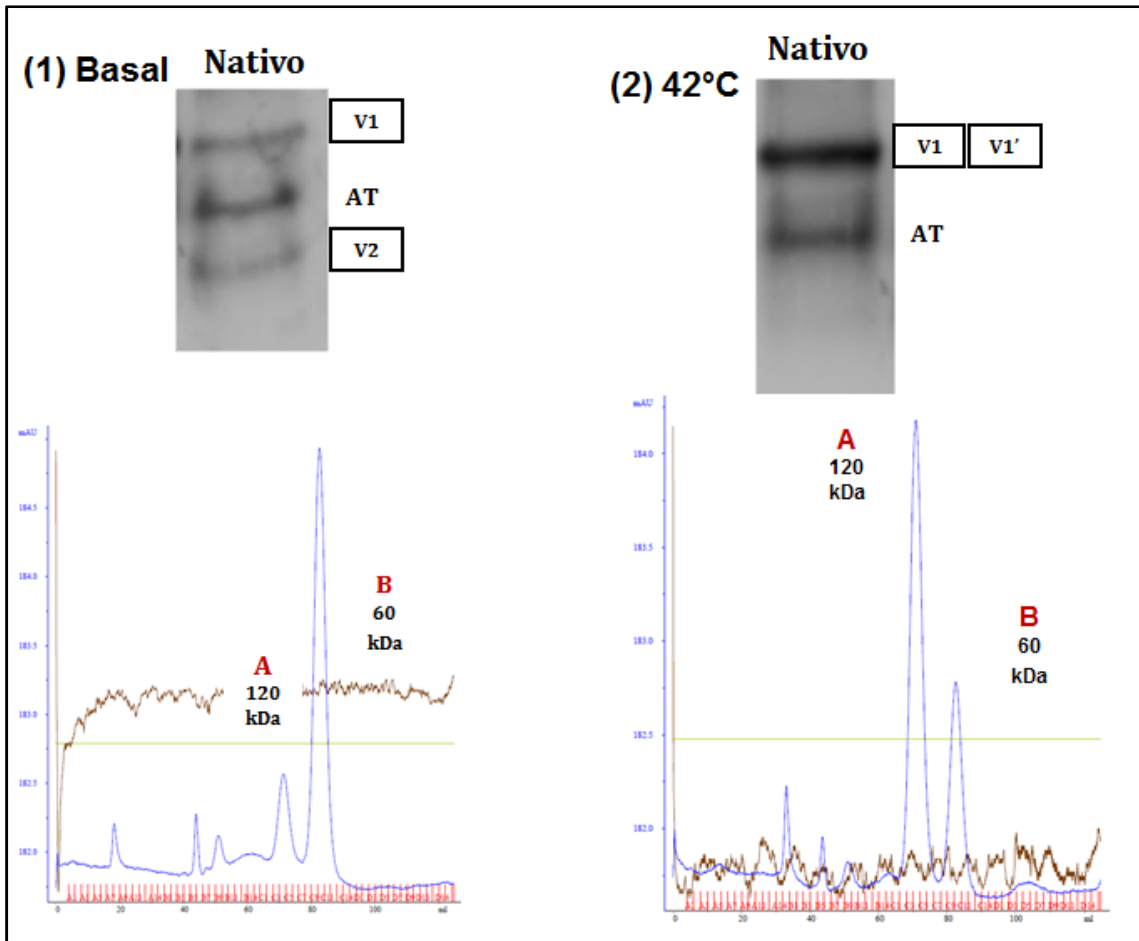


Figura 53. Perfil de elución de la cromatografía de Gel filtración realizada sobre las fracciones de cromatografía de afinidad por heparina que contiene la antitrombina obtenida del plasma del portador de la mutación p.Arg393Cys. (1) En condiciones basales y (2) tras calentar el plasma durante 24 horas a 42°C. Las fracciones correspondientes al monómero de antitrombina (B: 60 kDa) y dímero de antitrombina (A: 120 kDa) quedan marcadas.

El estudio de cada una de las fracciones obtenidas en el experimento anterior, mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes no reductoras y tinción de plata, confirmó que toda la fracción A (dímero) de la muestra basal correspondía con un dímero unido por puentes disulfuro, y toda la fracción B (monómero), como se esperaba, correspondía al monómero de antitrombina (**Figura 54**). Sin embargo, mientras que la fracción del monómero en la muestra calentada seguía siendo monómero, la fracción B (del dímero en Gel filtración) de la muestra calentada correspondía a una mezcla de monómeros y dímeros unidos por puentes disulfuro (**Figura 54**).

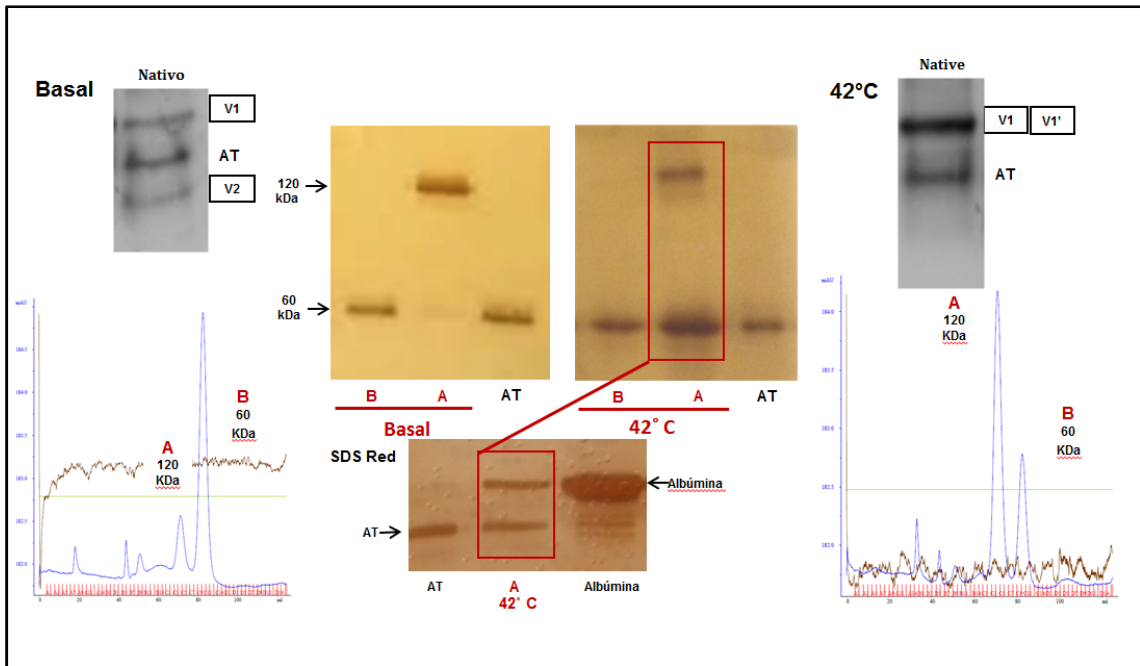


Figura 54. Proteínas presentes en las fracciones de elución de la cromatografía de Gel filtración del plasma del portador de la mutación p.Arg393Cys. (1) En condiciones basales y (2) tras calentar el plasma durante 24 horas a 42°C. Las proteínas se detectaron con tinción con plata tras electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS) pero no reductoras. Como control, se empleó una muestra de antitrombina pura (AT). Las flechas indican los tamaños de 60 y 120 kDa.

Finalmente, la fracción de Gel filtración correspondiente al dímero (120kDa) de la muestra calentada se evaluó en condiciones reductoras, empleando antitrombina y albúmina purificada como control. Como se puede observar en la **Figura 54**, esta fracción contenía cantidades equimoleculares de albúmina y antitrombina.

5. DISCUSIÓN

La importancia hemostática de la antitrombina y el riesgo de trombosis asociada con su deficiencia hacen muy relevante la identificación de nuevos mecanismos implicados en el control de los niveles de este potente anticoagulante, así como el conocer el mecanismo y trascendencia que pudiera tener la heterogeneidad de formas variantes que se genere como consecuencia de una mutación en la estructura de la antitrombina. Tres han sido las aproximaciones que hemos aplicado en este proyecto doctoral para aportar nueva información sobre la antitrombina:

- 1) Evaluar elementos implicados en el control transcripcional del gen codificante (*SERPINC1*) estudiando casos con deficiencia, pero sin base molecular conocida.
- 2) Analizar los mecanismos y elementos implicados en casos con niveles de antitrombina inexplicablemente elevados.
- 3) Caracterizar la antitrombina aberrante identificada en pacientes con deficiencia de antitrombina causada por mutaciones en el gen *SERPINC1*.

5.1 Vitamina D y antitrombina

El tromboembolismo venoso (TEV), trastorno común y severo asociado a una alta mortalidad y morbilidad, es considerado una enfermedad de etiología multifactorial que se origina por la interacción entre factores de riesgo congénitos y adquiridos, que confluyen en un momento concreto en un paciente superando lo que se determina como “umbral trombótico”. Es frecuente en la sociedad occidental, su incidencia aproximada de un caso por cada 1000 habitantes lo hace ser tema de estudio y conocimiento de aquellas situaciones que conllevan un aumento del riesgo de sufrir trombosis. Normalmente este evento tiene una causa desencadenante que se suma a una combinación de factores. Entre los factores adquiridos, se incluyen la edad, embarazo, inmovilización, cirugía, obesidad, traumatismo, anticonceptivos orales, terapia hormonal, enfermedades autoinmunes y cáncer. Las alteraciones trombofílicas han experimentado una considerable evolución desde que en 1965 O. Egeberg describiera la primera trombofilia: la deficiencia de antitrombina [30]. Desde entonces, aunque se han identificado otras trombofilias, el número absoluto de los desórdenes congénitos que incrementan el riesgo de trombosis es bajo y la deficiencia de antitrombina sigue siendo el defecto trombofílico más potente, ya que incrementa de manera significativa, de 10 a 40 veces el riesgo trombótico [13]. Debido a esta relevancia, el estudio de la antitrombina se ha realizado de manera exhaustiva: el gen ha sido clonado y caracterizado en múltiples especies, se han identificado más de 330 mutaciones diferentes implicadas en la deficiencia de antitrombina, fue la primera serpina activa en conseguir resolver su estructura cristalográfica y se ha descrito su mecanismo de activación e inhibición.

Hasta la década de los 90, se identificaron mutaciones infrecuentes en la población general, que afectando los niveles y/o la función de relevantes anticoagulantes endógenos (antitrombina, proteína C, proteína S) incrementaban de forma significativa el riesgo trombótico, y se asociaban con elevada incidencia de trombosis en los individuos portadores de las familias afectadas. Estos resultados llevaron a plantear que la trombosis

venosa era una enfermedad autosómica dominante. Además, en la gran mayoría de los casos, las mutaciones afectaban a regiones codificantes o a las implicadas en el procesamiento de intrones. Pero la baja incidencia de estas alteraciones entre los pacientes con trombosis venosa (menos del 5% tiene alguna de estas anomalías) llevó a buscar nuevos trastornos trombofílicos. En la década de los 90, con la identificación de polimorfismos protrombóticos (fundamentalmente FV Leiden, protrombina G20210A y grupo ABO) se confirmó la base compleja y multigénica de la trombosis. De hecho, se han descrito más polimorfismos con potencial papel en el desarrollo de patologías tromboembólicas, pero con escasa relevancia clínica por el moderado riesgo asociado (Figura 55).

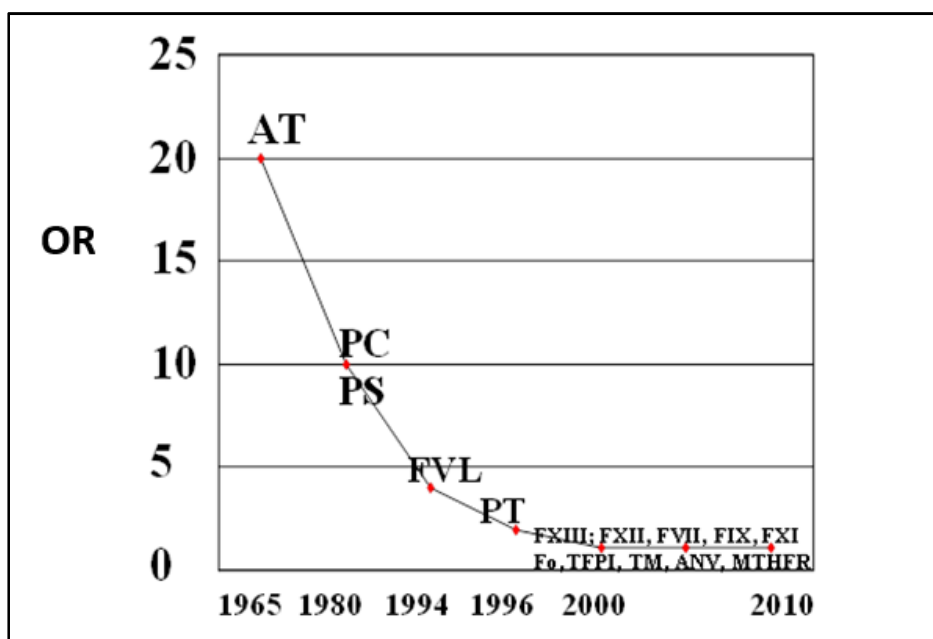


Figura 55. Identificación de factores trombofílicos y riesgo trombótico asociado (expresado como Odds Ratio: OR). AT: Deficiencia de antitrombina; PC: Deficiencia de proteína C; PS: Deficiencia de proteína S; FVL: Factor V Leiden; PT: Protrombina G20210A; Fo: Fibrinógeno; TFPI: Inhibidor de la ruta del factor tisular; ANV: Anexina V.

Sin embargo, tras cientos de estudios que incluyen trabajos genómicos masivos (GWAS-estudios de asociación del genoma completo de millones de polimorfismos en miles de pacientes y controles) [154] podemos concluir que no existen más polimorfismos con potente efecto protrombótico. De hecho, en los últimos años se ha vuelto al estudio de familias con trombofilia severa para identificar nuevas alteraciones trombofílicas y aunque estos estudios han identificado claros y potentes defectos trombofílicos, como el FIX Padua o Protrombina Yukuhashi, estos se restringen casi completamente a las familias índice [155-157]. Además, estos trabajos se han centrado en el estudio de genes candidatos, genes que codifican elementos del sistema hemostático.

Es por tanto necesario buscar nuevos elementos trombofílicos empleando otro tipo de diseños. En este contexto, las alteraciones genéticas que afectaran a los niveles de

importantes moléculas anticoagulantes, especialmente la antitrombina, a través de un mecanismo de regulación transcripcional serían buenos candidatos, y que como ya hemos indicado, apenas se han descrito hasta la fecha. De hecho, evaluando la base de datos de la HGMD, solo hay descritas 13 mutaciones reguladoras asociadas con deficiencia de proteína C, 12 en la región promotora [73, 75, 76, 120, 123, 127, 158] y una en la región 3' [124]; se han descrito 4 mutaciones reguladoras asociadas con deficiencia de proteína S, tres en la región promotora [129, 133, 135], y una en la región 3' [134]; y tan solo existe una alteración reguladora asociada con deficiencia de antitrombina [49].

De hecho, sorprende la poca información que existe en cuanto a mecanismo regulatorios de la antitrombina dada su relevancia hemostática y al hecho de que incluso pequeñas variaciones en los niveles de esta serpina anticoagulante incrementen de forma significativa el riesgo trombótico [13, 128]. Los estudios GWAS pretendieron identificar genes moduladores de la antitrombina [36, 37] con resultados bastante pobres. Pocos estudios se han enfocado en la búsqueda de los elementos reguladores del gen *SERPINC1*. Los pocos resultados y evidencias sustentan la importancia de la región formada por 200pb aguas arriba del codón de inicio ATG [23, 38, 56] pero la vía de regulación implicada sigue siendo una incógnita. Proponemos así, en el desarrollo de esta tesis, una nueva estrategia de estudio de análisis de estos elementos reguladores, centrando el enfoque en aquellos casos con deficiencia de antitrombina no explicados por la presencia de ningún defecto detectado en regiones codificantes, es decir, sin alteraciones en exones ni regiones flanqueantes en el gen *SERPINC1*. Precisamente el único caso con deficiencia de antitrombina asociado a una mutación reguladora, identificado por nuestro grupo, presentaba una alteración molecular en la región promotora, pero no conocíamos con exactitud el elemento regulador afectado. El estudio de predicción *in silico* mostraba que el cambio *c.1-171 C>G* podría afectar potenciales regiones regulatorias de unión de elementos reguladores como el HNF α , el TR α , elCOUP-TFI y elRXR α /VDR [49]. Dado que la bibliografía mostraba evidencias adicionales sobre una posible regulación transcripcional de los niveles de antitrombina asociadas al eje vitamina D-receptor de vitamina D [59, 60], decidimos buscar nuevos elementos VDREs en el gen *SERPINC1*.

Nuestro estudio sugiere, empleando programas de predicción *in silico*, la existencia de 3 secuencias VDREs en tándem en la región promotora, 2 en el intrón 1 y uno en el intrón 2. Como indicador de la potencial relevancia funcional de este hallazgo, indicamos que aplicando los mismos programas para el gen que codifica para PTH, cuya regulación a través del eje de la vitamina D está más que confirmada, presenta dos elementos VDREs en el intrón 1, con *scores* de interacción de niveles similares a los identificados en *SERPINC1* (11,5-14,8) [137].

Con la finalidad de validar si estas secuencias eran realmente funcionales, nuestro estudio se enfocó en secuenciar estas regiones en pacientes con deficiencia de antitrombina confirmada, pero sin alteración molecular en las regiones codificantes y flanqueantes de *SERPINC1* ni defectos de glicosilación, otro mecanismo implicado en la deficiencia de antitrombina. La selección de los 30 casos analizados en nuestro estudio solo pudo realizarse gracias a que nuestro grupo es referencia internacional para la caracterización de la deficiencia de antitrombina y había recogido 158 casos no relacionados con deficiencia confirmada de antitrombina durante los últimos años. Esta aproximación fue acertada ya

que permitió identificar 4 alteraciones genéticas relevantes, que cumplían las expectativas creadas por nuestra hipótesis.

El cambio *c.1-1053C>T*, no descrito hasta la fecha, se trataba de un polimorfismo de baja frecuencia (MAF: 0,008) que no parecía tener efecto funcional. No obstante, el bajo número de portadores identificados (5/307) y el moderado efecto que estas alteraciones se espera que tengan en los niveles finales de antitrombina, nos obliga a ser cautos a la hora de descartar un efecto funcional para esta alteración genética, y por tanto a realizar nuevos estudios, que incluyan más sujetos para dotar a nuestra conclusión de suficiente contundencia. Independientemente de esto, es importante indicar que, aunque esta alteración afecta al promotor del gen, no interfiere en ninguna de las secuencias VDREs descritas en esa zona.

Nuestro estudio identificó un segundo caso portador del cambio *c.1-171 C>G*, hasta la fecha la única alteración reguladora de *SERPINC1* asociada con menores niveles de antitrombina. Este segundo caso no presentaba ninguna relación familiar con el primero. También se determinó que el cambio *c.1-171 C>G* se localizaba en uno de las tres secuencias VDRE del promotor del gen *SERPINC1* y el alelo mutado reducía significativamente el *score* de predicción, lo que potencialmente implicaba que la secuencia mutada dejaría de realizar sus funciones de modulación transcripcional de forma que podría afectar a los niveles de ARN y por tanto, se correlacionaba con diferencias en los niveles de antitrombina en plasma. Desgraciadamente, la síntesis mayoritariamente hepática de la antitrombina no nos ha permitido confirmar en los portadores los menores niveles de ARN de *SERPINC1*, que validarían completamente la importancia transcripcional de esta secuencia VDRE.

Igual de relevante fue la identificación en nuestra cohorte de dos nuevos casos con mutaciones que afectaban a la misma secuencia VDRE localizada en el intrón 1 de *SERPINC1*. La duplicación *c.42-1060_1057dupTTGA* resultó ser un nuevo polimorfismo con una baja prevalencia en nuestra población (MAF: 0,014) con moderado efecto funcional. Además, como hemos mostrado en nuestro estudio, la relativa frecuencia de esta alteración funcional hace que no sea inusual que se combine con otras alteraciones genéticas protrombóticas, por lo que podría incluirse en el catálogo de alteraciones a ser evaluadas a la hora de definir el riesgo trombótico individualizado, tal y como se ha planteado para otros polimorfismos protrombóticos u otras alteraciones relativamente frecuentes que también afectan a la antitrombina, como la variante Cambridge II o la variante Dublín. Estos resultados refuerzan la idea de considerar la trombosis como una enfermedad multigénica y compleja. Es por ello por lo que creemos que esta alteración podría, reduciendo moderadamente los niveles de antitrombina en portadores, modular el riesgo trombótico en aquellos sujetos que además de este polimorfismo presenten algún otro defecto genético protrombótico [32]. Sin embargo, el papel de este nuevo polimorfismo en trombosis debe ser evaluado en estudios caso/control mucho más amplios.

Además, también identificamos una segunda duplicación que afectaba a la misma secuencia VDRE, *c.42-1087_-1068dup*, en una paciente con trombosis y deficiencia de antitrombina moderada de origen africano. En este caso, no contamos con evidencias suficientes para garantizar que realmente sea la alteración causante de la deficiencia y estudios adicionales (ampliando el estudio de sujetos con un mismo *background* genético, empleando modelos celulares y genes reporter, o mediante procesos de edición génica,

entre otras aproximaciones) deben aplicarse para confirmar o descartar esta posible asociación.

Finalmente, el potencial efecto funcional que el alto impacto *in silico* tiene el polimorfismo rs146692719 (*c.42-1056G>A*) en la secuencia VDRE de mayor *score* del intrón 1, debe ser confirmado con estudios adicionales, ya que nuestro estudio no identificó ningún sujeto portador.

La importancia trombótica de la deficiencia de antitrombina justifica que se incluya el estudio de las regiones VDRE en el diseño que abarque el estudio molecular de la deficiencia de antitrombina, incluso aunque el efecto funcional de estas alteraciones no sea muy alto. La **Figura 56** muestra un potencial algoritmo para el estudio molecular de los casos con deficiencia de antitrombina. Si en el futuro se identificaran nuevos elementos reguladores de los niveles de antitrombina, estos también se deberían incluir en los algoritmos de estudio molecular de la deficiencia de antitrombina.

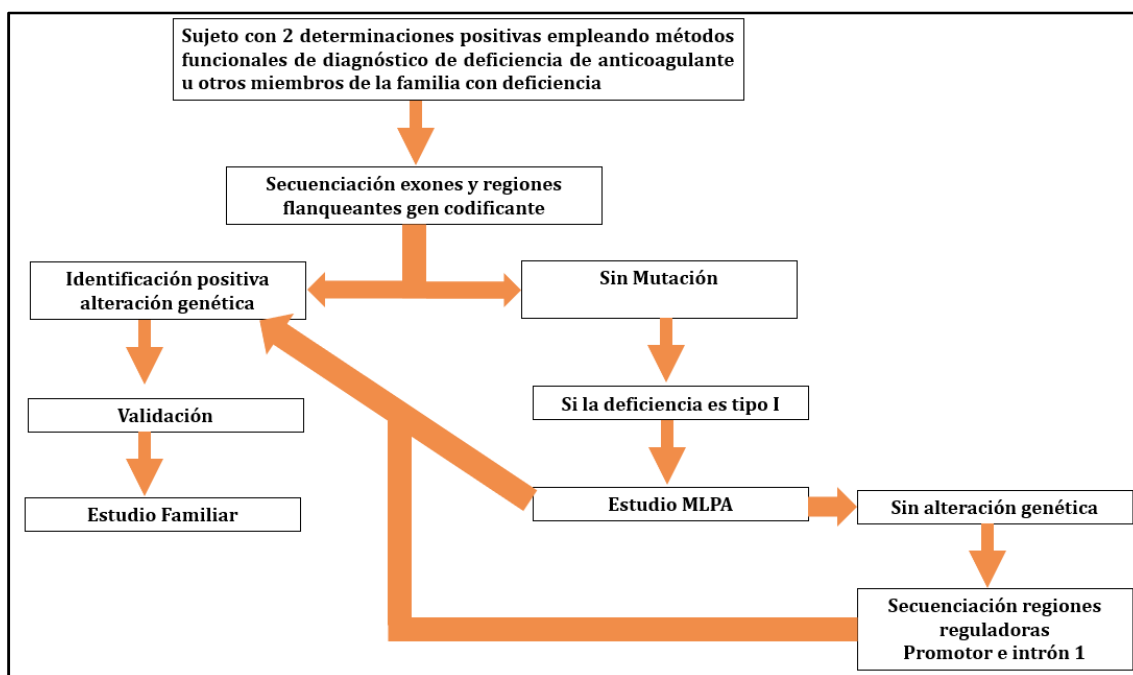


Figura 56. Algoritmo diagnóstico para la búsqueda de alteraciones moleculares en pacientes con deficiencia de antitrombina.

Además, el desarrollo de nuevos métodos de secuenciación masiva que reducen tiempos y costes de secuenciación justifica que se realice la secuenciación completa del gen, a fin de identificar todas las alteraciones genéticas que puedan estar implicadas en la modulación (incluso sutil) de los niveles de este potente anticoagulante.

Con estos resultados, y los resultados que avalan un papel relevante para la vitamina D en la regulación de los niveles de antitrombina, decidimos evaluar si pudieran existir alteraciones en el gen que codifica otro elemento de esta ruta, el propio receptor de vitamina D (VDR) en los casos con deficiencia de antitrombina sin causa molecular

conocida. Los resultados obtenidos no fueron positivos. No identificamos ninguna alteración molecular patogénica clara, y solo una débil asociación significativa parece sugerir que uno de los 4 haplotipos que definen dos polimorfismos ampliamente estudiados de este gen por su potencial efecto funcional, rs2228570 y rs4516035 podría tener efectos funcionales ya que se asocia de forma significativa con mayores niveles de antitrombina. Como ya decimos, sería necesario ampliar el tamaño muestral de casos con deficiencia de antitrombina sin alteraciones moleculares en exones, sobre todo de aquéllos con moderada deficiencia de antitrombina, para descartar que ninguna alteración molecular en VDR se pueda asociar con deficiencia de antitrombina. Este estudio, o alternativamente un estudio caso control de pacientes con trombosis venosa, podría también ser útil para confirmar la importancia funcional del haplotipo 3 definido por los dos polimorfismos y es necesario realizar estudios adicionales que validen esta asociación.

Igualmente, no podemos descartar que otros elementos de esta ruta, como el RXR pudieran estar en la base molecular que justifique la deficiencia de antitrombina en casos sin otra base molecular conocida. Los estudios de secuenciación masiva del exoma que se realizarán en breve en los casos que nuestro grupo dispone con estas características, responderá a esta pregunta. Por otra parte, y dentro de este capítulo, hemos mostrado nuevas evidencias que apoyan el papel de la vitamina D en la regulación de los niveles de antitrombina. Anteriormente, dos estudios independientes mostraron indicios que sugieren la implicación de la vitamina D en la regulación transcripcional del gen *SERPINC1*. Así, los ratones *knockout* para el receptor de la vitamina D (*vdr -/-*) tienen un 20% menores niveles plasmáticos de antitrombina que los ratones del grupo control [59]. Además, el tratamiento combinado de las células HepG2 con $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ y ATRA, estimuló la producción de los niveles de antitrombina [70]. En este proyecto, empleando un modelo celular hemos confirmado una respuesta dosis-dependiente de la expresión del ARNm de *SERPINC1* y de los niveles de antitrombina, como respuesta al tratamiento con paricalcitol.

Por todo ello, nuestro estudio ha mostrado, con diferentes evidencias, que la vitamina D juega un papel relevante en el control transcripcional de la antitrombina y que por tanto alteraciones en diferentes elementos de esta ruta pueden condicionar estados de deficiencia de este anticoagulante, con el consiguiente riesgo trombótico.

En este contexto, nos parece interesante estudiar los niveles de antitrombina en pacientes con resistencia a vitamina D, y evaluar el potencial riesgo trombótico derivado, para aclarar la aún controversia que hay sobre el papel de la deficiencia de vitamina D en el riesgo trombótico de esos casos. Múltiples estudios otorgan evidencias indirectas de una asociación inversa entre los niveles de 25(OH)D y la predisposición de sufrir TEV u otras enfermedades aterotrombóticas [138]. Sin embargo, recientes estudios sugieren que la deficiencia de vitamina D no juega un papel tan importante en la patogénesis de la trombosis venosa [43, 159]. Aunque, ambos estudios, tanto de Tromsø como de ARIC siguen arrojando dudas al respecto.

Además, la suplementación con vitamina D parece tener un efecto trivial o casi nulo, en el riesgo trombótico [24], solo un estudio sugiere que la suplementación con calcio y vitamina D en mujeres que parecían que conseguían reducir el riesgo de sufrir tromboembolismo venoso idiopático, según garantizaban varias investigaciones [160]. Nuestro estudio introduce nuevos elementos que pueden tener un papel destacado en esta controversia: identificamos los elementos VDREs en *SERPINC1* y ciertas alteraciones de

estas secuencias con efecto funcional, abre la posibilidad de que estas alteraciones genéticas pudieran modular (aumentar o reducir) los efectos de la suplementación con vitamina D. Esta hipótesis estaría de acuerdo con la medicina de precisión y personalizada que sugiere que: alteraciones en diferentes elementos genéticos también jugarían un papel relevante en el efecto de diferentes tratamientos.

Nuestros resultados también abren nuevas perspectivas en la controversia sobre la importancia de la deficiencia de vitamina D en el riesgo trombótico. De nuevo, un estado de deficiencia podría tener un efecto final diferente en función del fondo genético para las secuencias VDREs del gen *SERPINC1*. Estudios adicionales, incluyendo el análisis de la variación estacional de los niveles de antitrombina, así como el efecto de la suplementación de vitamina D en portadores de mutaciones en elementos VDREs, son necesarios para verificar esta hipótesis.

Adicionalmente, nuestro estudio sugiere que otros elementos de esta vía, como pueden ser el VDR o el RXR, podrían también ser de gran importancia en la variabilidad de antitrombina observada en la población general, en la deficiencia de antitrombina y en el riesgo trombótico. Quizás modelos animales, con las limitaciones que también tienen, pudieran ayudar a responder a alguna de estas preguntas.

Queremos subrayar la posible relevancia terapéutica de nuestros resultados. Si la actividad transcripcional del gen *SERPINC1*, y por tanto los niveles plasmáticos de antitrombina, pudieran controlarse por ciertos agentes como la vitamina D, podríamos emplear esta estrategia para elevar los niveles circulantes de este potente anticoagulante endógeno con efectos profilácticos, evitando el uso de anticoagulantes externos (coumarínicos o heparinas) y sus efectos adversos. Este tipo de actuación podría realizarse en dos tipos de situaciones:

- En sujetos con deficiencia congénita de antitrombina, en los que si esta actuación fuese exitosa también evitaría la utilización de concentrados de antitrombina, con el riesgo asociado al empleo de productos purificados de plasma.
- En pacientes con riesgo trombótico.

Desgraciadamente, aunque nuestro trabajo demuestra en modelos celulares que la administración de paricalcitol eleva la tasa transcripcional del gen *SERPINC1* y los niveles de antitrombina secretada al medio de cultivo, las dosis empleadas para conseguir un efecto son demasiado elevadas para emplearse con seguridad en pacientes. Una posible aplicación real terapéutica se podría conseguir a través de la administración de vitamina D exclusivamente en individuos con un perfil genético específico que les hiciera buenos respondedores, o en combinación con otros factores transcripcionales de regulación de *SERPINC1* que discutiremos en el capítulo posterior.

5.2 Ácidos biliares y antitrombina

La asociación entre el elevado riesgo de sufrir trombosis y los niveles bajos de antitrombina ha estimulado el estudio de pacientes con deficiencia de este potente anticoagulante, porque además esta aproximación ha generado relevantes contribuciones científicas sobre esta molécula y el riesgo trombótico derivado de su deficiencia. Sin embargo, muy pocos han sido los estudios que han prestado atención al análisis de pacientes con niveles elevados de antitrombina. Creemos que estos casos podrían añadir nueva información sobre este anticoagulante, y servir para identificar nuevos elementos implicados en la regulación de la antitrombina, con potencial uso terapéutico.

Hasta donde sabemos, solo hay dos casos descritos en la literatura de pacientes con niveles exacerbados de antitrombina en plasma, ambos con un historial de carcinoma hepatocelular. Estos trabajos sugieren que las anomalías de las células tumorales son las responsables de un aumento en los niveles de antitrombina, pero no muestran ninguna evidencia del mecanismo o factores implicados [148, 161].

En este proyecto doctoral tuvimos la oportunidad de estudiar a tres pacientes con niveles inesperadamente elevados de antitrombina en plasma. No solo presentaban valores por encima del rango de la normalidad observados en la población general (80-120%), sino que, además estos tres pacientes, que mostraban una alta insuficiencia hepática que les obligaba a estar en lista de espera para un trasplante, tenían unos valores desproporcionadamente altos, nada habituales a los observados en este tipo de casos. ¿Qué factores podrían explicar que a pesar de la grave alteración hepática que tenían, los niveles de antitrombina en estos pacientes oscilaban entre 150-190%? Nuestra primera hipótesis era un artefacto metodológico. Algún factor presente en estos pacientes actuaría inhibiendo al FXa bovino que se emplea en el método diagnóstico de la deficiencia de antitrombina, y los niveles tan elevados no serían reales. Pero el estudio inmunológico demostró que efectivamente, tanto la actividad anti-FXa, como los niveles antigénicos de antitrombina seguían estando elevados en estos pacientes.

Además, comprobamos que el defecto era específico de la antitrombina, ya que otras proteínas hepáticas: o presentaban valores normales o, como era de esperar para pacientes con hepatopatías, tenían valores mucho menores que la normalidad. Debíamos buscar por tanto algún elemento regulador más o menos específico de la antitrombina. La ausencia de modificaciones genéticas en el gen *SERPINC1* de estos pacientes descartaba que la causa de estos altos niveles se debiera a alguna variante genética. No obstante creemos que debemos secuenciar los elementos VDREs del gen de estos pacientes, por la importancia regulatoria que tienen y porque en estos pacientes, como discutiremos posteriormente, podrían ser especialmente relevantes.

Interesantemente, todos estos pacientes comparten un mismo desorden hepático: atresia de vías biliares y entre los tratamientos comunes que recibían los tres pacientes, se encontraba la administración de ácido ursodesoxicólico (UDCA) una sal biliar no hepatotóxica. La atresia biliar de estos sujetos es una de las causas más frecuentes y severas que produce colestasis durante la infancia [162]. Se cree que se debe a una inadecuada producción de ABs primarios, y una acumulación aberrante de ABs hidrofóbicos y por lo tanto tóxicos [147]. De hecho, en todas las variedades de enfermedades hepáticas estudiadas, la concentración de ABs fue elevada, más de 100 veces los niveles normales.

Nuestra hipótesis fue que esta acumulación de ABs en el hígado de estos pacientes pudiera jugar un papel en la presencia de los elevados niveles de antitrombina que todos los pacientes compartían. Esta especulación se basa en dos evidencias:

1. Los ABs tienen multitud de funciones fisiológicas. Además de su ya conocido papel en la absorción de lípidos en la dieta, actúan como potentes reguladores de la transcripción génica. Los efectos transcripcionales de los ABs parecen orquestados por el receptor nuclear FXR. Cabe destacar la conexión de este eje regulatorio con el del RXR-VDR, que como hemos comentado en el capítulo anterior parece estar implicado en la regulación transcripcional del gen *SERPINC1*.
- 2) La identificación de mutaciones que afectan a elementos VDREs en el gen *SERPINC1* en pacientes con deficiencia de antitrombina apoya la relevancia de los RNs en la regulación de antitrombina.

El empleo de modelos celulares hepáticos sugieren que DEXA, GW4064 y T3, podrían estar implicados en el control de los niveles de antitrombina [102]. En este proyecto doctoral, hemos confirmado experimentalmente la importancia de la vitamina D en la modulación de los niveles de antitrombina por dos aproximaciones indirectas, el empleo de un modelo celular (validado en dos momentos diferentes) y por la identificación de mutaciones que distorsionan elementos VDREs del gen *SERPINC1* identificadas en pacientes con deficiencia de antitrombina, pero sin otra causa molecular que lo justificara. Confirmamos que DEXA y GW4064 aumentan de forma moderada la expresión de *SERPINC1*, validando resultados de otros grupos. Más compleja es la interpretación de nuestros resultados y la comparación con los datos bibliográficos del efecto de la T3. Los estudios de P. Reitsman, sugieren un efecto dosis dependiente y positivo de la T3 en los niveles de expresión de antitrombina. Nuestros resultados son concordantes con este efecto si analizamos exclusivamente el efecto de la dosis de T3 en los niveles de *SERPINC1*. El aumento de niveles de T3 provoca aumento en los niveles de antitrombina. Pero es difícil explicar por qué el tratamiento con las dosis más bajas de T3 se asocia con menores niveles de antitrombina, que en las células no tratadas. Son necesarios más experimentos para aclarar esta discrepancia. Podemos especular que, aunque en los dos estudios, el nuestro y el publicado por P. Reitsman se realizan en la misma línea celular, HepG2, las características de la línea celular, especialmente los niveles de factores de transcripción, pueden cambiar significativamente con el número de pases, e incluso el medio de cultivo. Los niveles de VDR, que como también hemos visto en este estudio son sensibles a factores como los niveles de vitamina D, los de RXR, o los de cualquier elemento que pueda jugar algún papel en esta ruta, como podría ser HNF α u otros factores de transcripción, pueden hacer que el efecto de la T3 sobre el control transcripcional de *SERPINC1* pueda cambiar de negativo a positivo.

Para validar nuestra hipótesis de que los ABs pudieran regular la transcripción de *SERPINC1* desarrollamos experimentos adicionales en dos modelos.

En primer lugar, evaluamos en un modelo celular que reproducía los efectos transcripcionales ya descritos en la literatura para otros moduladores de la antitrombina, el efecto en la regulación transcripcional de *SERPINC1* de 4 ABs: CA (la más abundante en humanos y ratones), CDCA, UDCA y LCA. Los resultados obtenidos sugieren que una de los principales ácidos, que se sintetiza y acumula en el hígado, CDCA, incrementa

significativamente la actividad transcripcional de *SERPINC1*. Sin embargo, el hecho de que el AB secundario de CDCA, LCA, tenga un efecto negativo, es otro argumento favorable al papel del CDCA, y sugiere que los cambios secundarios pueden anular, como aquí ocurre el efecto del compuesto. También podría ocurrir lo contrario, que un AB secundario adquiriera efectos que el primario no tiene, pero que tendrá que estudiarse en futuros trabajos.

Parece que el papel del CDCA no está directamente relacionado a un balance hidrofóbico/hidrofilico, el cual estaría de alguna manera abolido por la conjugación con glicina. Otras modificaciones del CDCA podrían modular la capacidad transcripcional, quizás reduciendo los niveles de su citotoxicidad, lo cual podría permitir pensar en una potencial aplicación terapéutica (como potente antitrombótico) si consigue mayor efecto transcripcional con menores efectos adversos.

Nuestro siguiente objetivo fue validar *in vivo* los efectos del CDCA. Los experimentos realizados en el modelo animal reproducían los resultados obtenidos *in vitro*: la dosis de 25 mg/kg aumentaba 2 veces la expresión génica de *SERPINC1*. De hecho, el efecto obtenido fue capaz de restaurar los niveles de ARNm de este gen en ratones heterocigotos deficientes en antitrombina. Estos resultados podrían abrir una nueva perspectiva antitrombótica para los pacientes con deficiencia congénita de antitrombina, la gran mayoría de los cuales tienen una alteración en el gen *SERPINC1*, pero en heterocigosis. Así, los tratamientos empleando ABs podrían ser una alternativa a la terapia de suplementación exógena con concentrados de antitrombina en aquellos pacientes. Aunque el tratamiento con concentrados de antitrombina, disponible desde 1979, es útil como terapia profiláctica en aquellos casos de deficiencia de antitrombina primaria o adquirida, en ocasiones la profilaxis con suplementación exógena no es tan segura, dando lugar a efectos secundarios severos, teniendo una mala farmacocinética y siendo muy cara. Si el tratamiento con un ácido biliar funcionara, podría ser una alternativa a la terapia sustitutiva. Pero es que, si se identificase un ácido biliar sin toxicidad con los efectos transcripcionales similares al CDCA, podría explorarse su uso como nuevo anticoagulante, que podría aplicarse en otras situaciones de riesgo trombótico adicionales a los pacientes con deficiencia de antitrombina.

Sin embargo, el nuestro no es el primer estudio que sugiere que los ABs podrían regular la expresión de factores hemostáticos. Andrew M. Anisfeld, mostró en el año 2005 que los ABs eran capaces de inducir la expresión del fibrinógeno en células del hepatoma humano a través de la vía del FXR. Ha sido la identificación del FXR como el elemento sensor de los niveles de ABs lo que ha permitido avanzar durante la última década en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el mecanismo de estos esteroides. Sería, por tanto, interesante evaluar el efecto global que CDCA podría tener sobre los niveles de antitrombina a través de esta vía, así como evaluar el efecto del FXR en este eje (y quizás en casos con deficiencia de antitrombina sin base molecular conocida). Finalmente, dado que este eje de regulación no es específico de la antitrombina, pero tiene claros efectos en hepatocitos, sería importante estudiar el efecto global que CDCA podría tener sobre otros elementos del sistema hemostático donde este eje pueda estar implicado, y sobre todo el balance hemostático en general.

Nuestro proyecto identifica a los ABs como nuevos elementos implicados en la regulación de la antitrombina. Y todos estos resultados sugieren nuevos candidatos: la

vitamina A, el VDR, el RXR, otras hormonas esteroideas y otros RNs. Y no podemos dejar de discutir que los efectos moduladores pueden adicionarse (aditiva o exponencialmente) o modificarse en sentido negativo si se combinan varios de estos elementos. El efecto combinado de estos factores debe estudiarse en nuevos estudios ya que se podría identificar una combinación que ejerciendo un potente efecto modulador positivo pudiera ser empleada como agente que indujera de forma específica un aumento significativo de los niveles del anticoagulante endógeno más relevante, con las consecuencias antitrombóticas que pudiera tener este nuevo tratamiento anticoagulante.

5.3 Antitrombina Milano

¿Tiene sentido estudiar una mutación en *SERPINC1* que ya ha sido descrita previamente en al menos 3 pacientes diferentes con deficiencia de antitrombina como así atestigua la variedad de nombres otorgados a la variante causada por el cambio *c.1273C>T*: Antitrombina Milano, Northwick Park y Frankfurt [44, 45, 163]? Se trataba del único caso con deficiencia de antitrombina que provoca que la antitrombina variante se una a una proteína diferente, la albúmina. El grupo del profesor Mannucci ya analizó esta mutación en profundidad y elegantemente demostró que la presencia de la cisteína permitía una interacción con la molécula de albúmina y la formación de heterodímeros unidos por puente disulfuro [45, 114]. Pero lo que más nos llamó la atención de este caso es que los portadores de la mutación presentaban dos formas variantes en plasma, algo que no se había objetivado previamente. Nuestro objetivo fue caracterizar esta mutación para contestar a dos cuestiones: a qué era debida la presencia de esta variabilidad molecular, así como su implicación clínica en enfermedad trombótica. De hecho, creemos que esta variabilidad de formas mutadas podría tener que ver con el desarrollo de la trombosis, especialmente cuando comprobamos que el calentamiento del plasma a temperaturas moderadas, 42°C, inducía la transformación de una variante en la otra (**Figura 57**).

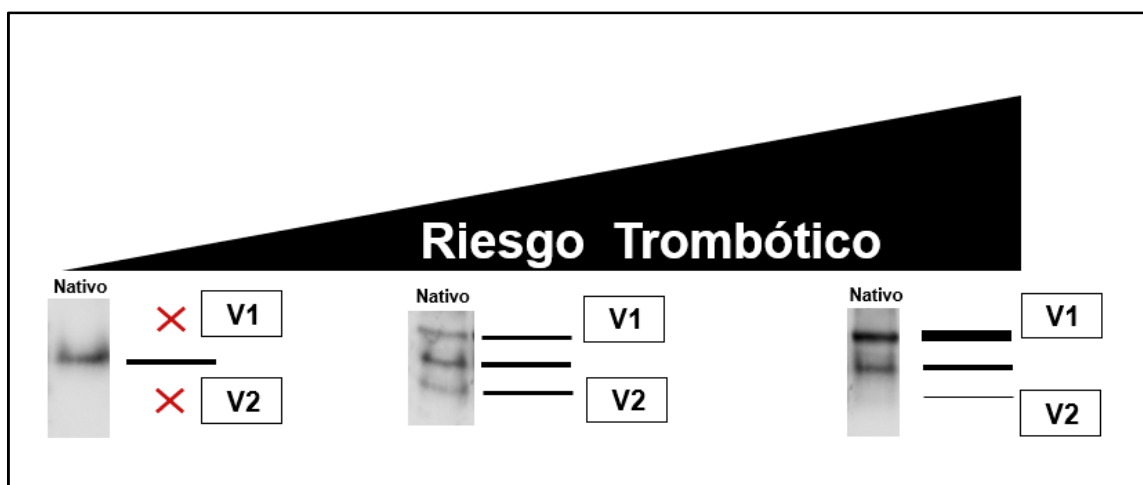


Figura 57. Hipótesis que vincula el riesgo trombótico con el cambio en las proporciones de variantes V1/V2 en portadores de la mutación p.Arg393Cys.

Por otra parte, cada vez surgen más evidencias sobre la transitoriedad del efecto de una mutación y de cómo factores ambientales o externos pueden modular el efecto patogénico de una mutación, también para la deficiencia de antitrombina [39, 164, 165].

Para desarrollar nuestra hipótesis, necesitábamos definir las dos variantes identificadas en los pacientes con esta mutación. La comparación del patrón electroforético de nuestra variante con otras variantes de antitrombina con mutaciones en el residuo P1, en concreto, la antitrombina Glasgow, donde la arginina está cambiada por una histidina y la antitrombina London, en la que se pierde este residuo, sugiere que la variante con mayor movilidad electroforética (V2) podría corresponder a la forma monomérica mutada; mientras que la de menor movilidad (V1) podría representar la forma que dimeriza con la albúmina. Este resultado también justificaría que la variante V2 se transformase a la V1, pues el calor podría favorecer, posiblemente induciendo un cambio conformacional en la V2, la interacción con la albúmina.

Como nuestro grupo ya demostró la sensibilidad conformacional de las mutaciones que afectaban a P1, sugiriendo que estas alteraciones facilitan la transición a formas hiperestables, pensamos que el calor podría facilitar un cambio conformacional en la variante Cys393 que permitiera la interacción con la albúmina [41]. Los experimentos de purificación de las variantes del plasma con cromatografía de afinidad por heparina y posterior gel filtración demostraron que efectivamente la V1 que resultaba del calentamiento del plasma en realidad es de una mezcla de dos dímeros antitrombina-albúmina, uno en el que la interacción se produce por puentes disulfuro (la V1 que aparece en la muestra basal) y un nuevo dímero que, al formarse en el plasma, no consigue establecer el puente disulfuro.

Nuestra hipótesis, reflejada en la **Figura 58**, sugiere que la mutación p.Arg393Cys provoca una inestabilidad conformacional que facilita la transición a forma latente. De esta forma, en condiciones normales, la proteína sintetizada por el alelo mutado puede plegarse tanto en forma latente como nativa. La forma latente sería la que, de acuerdo con nuestra hipótesis, sería capaz de, durante el tráfico intracelular, interactuar con la albúmina y, gracias a la actividad de la proteína disulfuro isomerasa (PDI), formar un dímero unido por puentes disulfuro.

Las dos variantes de antitrombina, el monómero nativo y el dímero de antitrombina latente-albúmina unidos por puentes disulfuro, serían secretados al plasma, donde ninguno de ellos tendría actividad anticoagulante y ambos tendrían mayor afinidad por heparina que la forma de antitrombina nativa. Sin embargo, ante situaciones de estrés como la generada por el calentamiento, la variante monomérica V2, más sensible a la transición a forma latente que la forma silvestre, se transformaría a dicha conformación. La interacción de la cys393 con la albúmina no creemos que pueda realizarse si el RCL está en configuración nativa, y solo si se presenta (también expuesta) en el polo opuesto de la serpina cuando se introduce el RCL en la lámina central, se permitiría la interacción con la albúmina. Si esta transición se produce en el plasma, debido a la ausencia de PDI, la interacción antitrombina-albúmina solo sería electrostática ya que no se estabilizaría por puentes disulfuro.

Si nuestra hipótesis es cierta, la ruptura del RCL de la forma mutada por una proteasa produciría el mismo efecto, cambio de V2 a V1. Aunque pretendemos realizar este experimento con elastasa, desconocemos si el cambio p.Arg393Cys pudiera afectar también la ruptura de RCL por esta proteasa. Este nuevo dímero no tendría actividad anticoagulante y se disociaría en condiciones reductoras, como hemos comprobado.

Nos queda por aclarar el mecanismo por el que la variante V1 y la nueva variante que hemos llamado V1', el dímero antitrombina-albúmina no unido por puentes disulfuro, tiene mayor capacidad trombogénica. La potencial mayor capacidad de secuestrar heparinas al estar unidas una antitrombina, con afinidad por heparina, a una albúmina, otra molécula con afinidad por heparina, es una hipótesis atractiva de efecto dominante negativo. En otras palabras, el aumento de una forma inactiva de antitrombina que adquiriese mayor afinidad por heparina, reduciría la capacidad anticoagulante de la forma silvestre que presentan todos los portadores heterocigotos de esta mutación, ya que especialmente en condiciones limitantes de heparina, este cofactor se uniría a la forma mutada antes que a la silvestre, de forma similar, aunque mucho más potente por ser dos las moléculas con afinidad por heparina unidas, al mecanismo descrito para la variante London (con delección del residuo Arg393) [42]. Son necesario estudios adicionales que validen esta hipótesis.

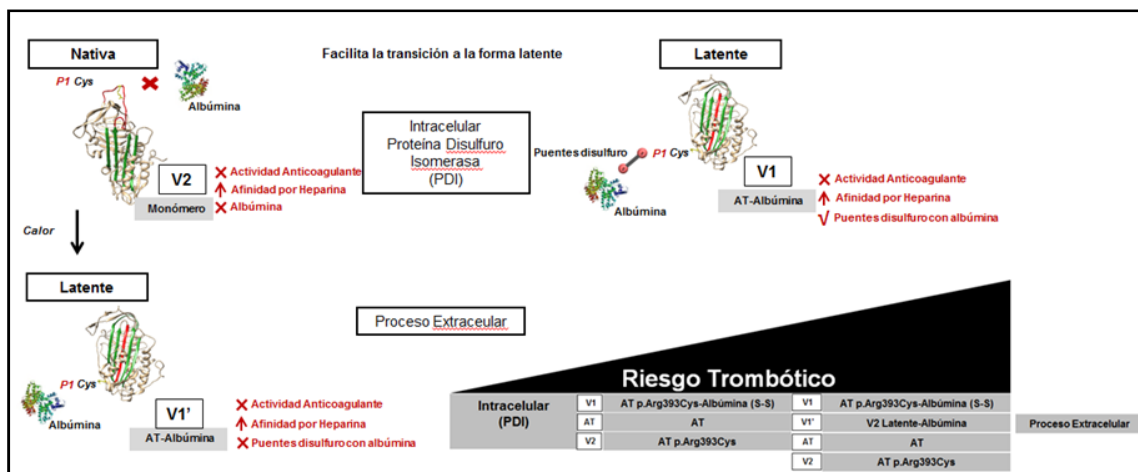


Figura 58. Modelo para explicar las variantes identificadas en los portadores de la mutación p.Arg393Cys.

6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

6.1 Conclusiones

De los resultados obtenidos en los estudios que conforman esta Memoria de Tesis Doctoral pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. El análisis molecular de las regiones regulatorias del gen *SERPINC1* en pacientes con deficiencia de antitrombina, pero sin variaciones genéticas en regiones codificantes, nos ha permitido identificar 4 alteraciones genéticas regulatorias que afectan a potenciales elementos RXR α /VDR y causan una moderada reducción de los niveles de antitrombina. Todos los portadores presentaron eventos trombóticos. Además, verificamos el papel regulador de los niveles de antitrombina por la vitamina D. Estos resultados sugieren que el eje Vitamina D/Vitamina A pudiera desempeñar un papel importante en la regulación fisiopatológica de este potente anticoagulante.
2. Hemos descrito y caracterizado por primera vez un nuevo mecanismo asociado con niveles anormalmente elevados de antitrombina. Los ácidos biliares podrían ser considerados potenciales moduladores de antitrombina. Los resultados obtenidos en pacientes, en el modelo celular y en el modelo animal indican que CDCA incrementa significativamente y de forma dosis dependiente la tasa transcripcional de *SERPINC1*, lo que podría tener potenciales aplicaciones terapéuticas.
3. Mostramos un nuevo ejemplo de variabilidad conformacional asociada a una variante genética identificada en un paciente con deficiencia de antitrombina y trombosis venosa. La mutación p.Arg393Cys genera dos formas variantes, una de ellas, interaccionando con la albúmina. Nuestros resultados apoyan que la transformación de la forma variante nativa a conformación latente, en respuesta a un moderado estrés térmico, permitiría la interacción con la albúmina en el plasma. Este mecanismo podría estar implicado en el desarrollo del evento trombótico.

6.2 Conclusions

The results of the present thesis allow achieving the following conclusions:

1. Molecular analysis of regulatory regions of *SERPINC1*, the gene encoding antithrombin, in patients with moderate or severe antithrombin deficiency but with no pathogenic variants in coding regions, allowed us to identify 4 regulatory genetic variants affecting potential RXR α /VDR elements. All carriers had thrombotic events. Additionally, we show new evidences on the regulatory role of vitamin D on the levels of antithrombin. Taken together, these results reveal an important role of Vitamin D/Vitamin A in the physiopathology of this anticoagulant.

2. We described and characterized for the first time a mechanism involved in the unexpectedly high levels of antithrombin. Clinical, cellular and animal models confirm that CDCA significantly increased dose-dependently the levels of *SERPINC1* transcripts. These results, together with the transcriptional relevance of bile salts, strongly support that bile salts could play a role as new modulators of *SERPINC1* transcription. Thus, it is attractive to explore bile salts as new therapeutic agents.
3. We characterized a new example of conformational variability associated to a *SERPINC1* genetic variant identified in a patient with antithrombin deficiency and venous thrombosis. The pArg393Cys mutation caused two antithrombin variants, one of them able to interact with albumin. Our results support that the transformation from the native conformation to the latent form of the variant antithrombin, which may be achieved by stress conditions, allowed the formation of dimers with albumin in plasma, which might exacerbate the risk of thrombosis.

ABREVIATURAS

#

1,25(OH)₂D: 1,25-di-hidroxi-vitaminaD
24,25(OH)₂D: 24,25-di-hidroxi-vitaminaD
25(OH)D: 25-hidroxivitaminaD

A

ABs: Ácidos biliares
Act: Actina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AF: Función de activación (del inglés, *Activation function*)
ALP: Fosfatasa alcalina (del inglés, *Alkaline phosphatase*)
ALT: Alanina transaminasa (del inglés, *Alanine transaminase*)
ANV: Anexina V
AR: Receptor de andrógeno (del inglés, *Androgen receptor*)
Arg: Arginina
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
Asn/N: Asparagina
AST: Aspartato aminotransferasa
AT: Antitrombina
ATRA: Ácido transretinoico (del inglés, *All-trans retinoic acid*)

B

BAAT: AB-CoA: aminoácido N-aciltransferasa (del inglés, *Bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase*)
BACS: AB-CoA sintetasa (del inglés, *Bile acid CoA synthetase*)
BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés, *Bovine serum albumin*)
BT: Bilirrubina total

C

CA: Ácido cólico (del inglés, *Cholic acid*)
CAR: Receptor constitutivo de androstano (del inglés, *Chimeric antigen receptor*)
CAT: Cloranfenicol acetil transferasa
CDCA: Ácido quenodesoxicólico (del inglés, *Chenodeoxycholic acid*)
CoA: Coenzima A
COUP-TFI: Factor I de transcripción del promotor de la ovoalbúmina de pollo (del inglés, *Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I*)
CYP27B1: 1 α -hidroxilasa
CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa
CYP24A1: 24-hidroxilasa
CYP7A1: Colesterol 7 α -hidroxilasa

CYP7B1: Oxiesterol 7 α -hidroxilasa

CYP8B1: Esterol 12 α -hidroxilasa

Cys: Cisteína (del inglés, *Cysteine*)

D

DBP: Proteína transportadora de Vitamina D (del inglés, *Vitamin D binding protein*)

DBD: Dominio de unión al ADN (del inglés, *DNA binding domain*)

DCA: Ácido desoxicólico (del inglés, *Deoxycholic acid*)

DEXA: Dexametasona

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DR: Secuencias directas (del inglés, *Direct repeats*)

E

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético (del inglés, *Ethylenediamine tetracetic acid*)

ELISA: Enzimoimmunoensayo (del inglés, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ER: Receptor de estrógeno (del inglés, *Estrogen receptor*)

F

F: Factor

FGF23: Factor de crecimiento fibroblástico 23 (del inglés, *Fibroblast growth factor 23*)

Fo: Fibrinógeno

FPLC: Cromatografía líquida de la proteína rápida (del inglés, *Fast Protein Liquid Chromatography*)

FVL: Factor V Leiden

FXR: Receptor X farnesoide (del inglés, *Farnesoide X Receptor*)

G

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

GR: Receptor de glucocorticoides (del inglés, *Glucocorticoid receptor*)

GWAS: Estudios de asociación del genoma completo (del inglés, *Genome-Wide Association Studies*)

H

HBPM: Heparina de bajo peso molecular

HGMD: Base de datos de mutaciones de genes humanos (del inglés, *Human Gene Mutation Database*)

HNF4 α : Factor nuclear 4 alfa de hepatocito (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 4*)

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*)

HREs: Elementos de respuesta a hormonas (del inglés, *Hormone response element*)

I

IEF: Isoelectroenfoque

IR: Secuencias invertidas (del inglés, *Inverted repeats*)

L

LBD: Dominio de unión a ligando (del inglés, *Ligand binding domain*)

LCA: Ácido litocólico (del inglés, *Lithocholic acid*)

Leu: Leucina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad (del inglés, *Low density lipoproteins*)

LXR: Receptor X hepático (del inglés, *Liver X receptor*)

M

MAF: Frecuencia del alelo menos común (del inglés, *Minor allele frequency*)

MALDI-TOF: Espectrometría de masas (del inglés, *Matrix-assisted laser desorption/ionization times-of-flight*)

MLPA: Amplificación de zonas dependiente de ligandos múltiples (del inglés, *Multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MR: Receptor de mineralocorticoides (del inglés, *Mineralocorticoid receptor*)

P

Pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *Phosphate buffered saline*)

PC: Proteína C

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*)

PDI: Proteína disulfuro isomerasa

pI: punto isoeléctrico

PPAR: Receptor de peroxisoma proliferador activado (del inglés, *Peroxisome proliferator-activated receptors*)

PR: Receptor de progesterona (del inglés, *Progesterone receptor*)

PS: Proteína S

PT: Protrombina

PTH: Hormona paratiroidea (del inglés, *Parathyroid hormone*)

PXR: Receptor X de pregnano (del inglés, *Pregnane X receptor*)

Q

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, *Quantitative real-time PCR*)

R

RAR: Receptor del ácido retinoico (del inglés, *Retinoid acid receptor*)

RCL: Centro reactivo (del inglés, *Reactive centre loop*)

RNs: Receptores Nucleares

RXR: Receptor X del retinoide (del inglés, *Retinoid X receptor*)

S

SD: Desviación estándar (del inglés, *Standard deviation*)

SEM: Error estándar de media (del inglés, *Standard error of the mean*)

SERPIN: Inhibidor de serín proteasas (del inglés, *Serine proteinase inhibitors*)

T

T3: Triyodotironina

T/FIIa: Trombina/Factor II activo

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TFPI: Inhibidor de la ruta del factor tisular (del inglés, *Tissue factor pathway inhibitor*)

TEV: Tromboembolismo venoso

TR: Receptor de hormona tiroidea (del inglés, *Thyroid hormone receptor*)

TRE: Elementos de respuesta a T3 (del inglés, *Thyroid response element*)

TVP: Trombosis venosa profunda

U

UDCA: Ácido ursodesoxicólico (del inglés, *Ursodeoxycholic acid*)

V

Val: Valina

VitD: Vitamina D

VDRE: Elementos de respuesta a vitamina D (del inglés, *Vitamin D response element*)

VDR: Receptor de la vitamina D (del inglés, *Vitamin D receptor*)

VDBP: Proteína de unión a vitamina D (del inglés, *Vitamin D binding protein*)

REFERENCIAS

1. Lippi, G., et al., *Milestones and perspectives in coagulation and hemostasis*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(1): p. 9-22.
2. Kyrle, P.A. and S. Eichinger, *Deep vein thrombosis*. The Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1163-1174.
3. Heit, J.A., *Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2005. **3**(8): p. 1611-1617.
4. Souto, J.C., et al., *Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study*. The American Journal of Human Genetics, 2000. **67**(6): p. 1452-1459.
5. Broze, G.J., K. Likert, and D. Higuchi, *Inhibition of factor VIIa/tissue factor by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor*. Blood, 1993. **82**(5): p. 1679-1681.
6. Petersen, C., et al., *Effect of oral contraceptives on antithrombin III measurement*. Am J Clin Pathol, 1979. **72**(1): p. 134.
7. Rau, J., et al., *Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2007. **5**(s1): p. 102-115.
8. Chandra, T., et al., *Sequence homology between human. alpha. 1-antichymotrypsin,. alpha. 1-antitrypsin, and antithrombin III*. Biochemistry, 1983. **22**(22): p. 5055-5061.
9. Prochownik, E.V., et al., *Molecular heterogeneity of inherited antithrombin III deficiency*. New England Journal of Medicine, 1983. **308**(26): p. 1549-1552.
10. Bayston, T. and D. Lane, *Antithrombin: molecular basis of deficiency*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 339-343.
11. Ishiguro, K., et al., *Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **106**(7): p. 873.
12. Quinsey, N.S., et al., *Antithrombin: in control of coagulation*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(3): p. 386-389.
13. Bucciarelli, P., et al., *Low borderline plasma levels of antithrombin, protein C and protein S are risk factors for venous thromboembolism*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(9): p. 1783-1791.
14. Whisstock, J.C. and S.P. Bottomley, *Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(6): p. 761-8.
15. Gils, A. and P.J. Declerck, *Structure-function relationships in serpins: current concepts and controversies*. Thromb Haemost, 1998. **80**(4): p. 531-541.
16. Wardell, M.R., et al., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of two conformations of intact human antithrombin*. Journal of molecular biology, 1993. **234**(4): p. 1253-1258.
17. Johnson, D.J., et al., *Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(46): p. 35478-35486.
18. Huntington, J.A. and R.W. Carrell, *The serpins: nature's molecular mousetraps*. Sci Prog, 2001. **84**(Pt 2): p. 125-36.
19. Corral, J., et al., *Latent and polymeric antithrombin: clearance and potential thrombotic risk*. Experimental Biology and Medicine, 2007. **232**(2): p. 219-226.
20. Mushunje, A., et al., *Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2004. **2**(12): p. 2170-2177.
21. Karlsson, G. and S. Winge, *Preparative conversion of native human antithrombin to the latent form*. Protein expression and purification, 2002. **26**(1): p. 106-110.
22. Corral, J., V. Vicente, and R.W. Carrell, *Thrombosis as a conformational disease*. Haematologica, 2005. **90**(2): p. 238-246.
23. Ochoa, A., et al., *Different liver nuclear proteins bind to similar DNA sequences in the 5'flanking regions of three hepatic genes*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(1): p. 119-133.

24. Vučković, B.A., et al., *Vitamin supplementation on the risk of venous thrombosis: results from the MEGA case-control study*–. The American journal of clinical nutrition, 2015. **101**(3): p. 606-612.
25. Johnson, D.J. and J.A. Huntington, *Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state*. Biochemistry, 2003. **42**(29): p. 8712-8719.
26. Petitou, M., B. Casu, and U. Lindahl, *1976–1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site*. Biochimie, 2003. **85**(1): p. 83-89.
27. Neale, G., et al., *Serum bile acids in liver disease*. Gut, 1971. **12**(2): p. 145-152.
28. Huntington, J.A., et al., *The Conformational Activation of Antithrombin A 2.85-Å STRUCTURE OF A FLUORESCHEIN DERIVATIVE REVEALS AN ELECTROSTATIC LINK BETWEEN THE HINGE AND HEPARIN BINDING REGIONS*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(20): p. 15377-15383.
29. Whisstock, J., R. Skinner, and A.M. Lesk, *An atlas of serpin conformations*. Trends in biochemical sciences, 1998. **23**(2): p. 63-67.
30. Egeberg, O., *Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia*. Thrombosis et diathesis haemorrhagica, 1965. **13**: p. 516-30.
31. Germain, P., et al., *Overview of nomenclature of nuclear receptors*. Pharmacological reviews, 2006. **58**(4): p. 685-704.
32. Águila, S., et al., *Compound heterozygosity involving Antithrombin Cambridge II (p. Ala416Ser) in antithrombin deficiency*. Thromb Haemost, 2013. **109**(3): p. 556.
33. Corral, J., M.E. de la Morena-Barrio, and V. Vicente, *The genetics of antithrombin*. Thromb Res, 2018. **169**: p. 23-29.
34. Martínez-Martínez, I., et al., *Amelioration of the severity of heparin-binding antithrombin mutations by posttranslational mosaicism*. Blood, 2012. **120**(4): p. 900-904.
35. Dementiev, A., et al., *The allosteric mechanism of activation of antithrombin as an inhibitor of factor IXa and factor Xa. Heparin-independent full activation through mutations adjacent to helix D*. Journal of Biological Chemistry, 2013: p. jbc. M113. 510727.
36. de la Morena-Barrio, M.E., et al., *Identification of antithrombin-modulating genes. Role of LARGE, a gene encoding a bifunctional glycosyltransferase, in the secretion of proteins?* PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64998.
37. Germain, M., et al., *Genetics of venous thrombosis: insights from a new genome wide association study*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25581.
38. Prochownik, E.V., *Relationship between an enhancer element in the human antithrombin III gene and an immunoglobulin light-chain gene enhancer*. Nature, 1985. **316**(6031): p. 845.
39. de la Morena-Barrio, M., et al., *High levels of latent antithrombin in plasma from patients with antithrombin deficiency*. Thromb Haemost, 2017. **117**(05): p. 880-888.
40. Maclean, P.S. and R.C. Tait, *Hereditary and acquired antithrombin deficiency*. Drugs, 2007. **67**(10): p. 1429-1440.
41. Martínez-Martínez, I., et al., *The infective polymerization of conformationally unstable antithrombin mutants may play a role in the clinical severity of antithrombin deficiency*. Molecular Medicine, 2012. **18**(1): p. 762.
42. Raja, S.M., et al., *Deletion of P1 arginine in a novel antithrombin variant (antithrombin London) abolishes inhibitory activity but enhances heparin affinity and is associated with early onset thrombosis*. Journal of Biological Chemistry, 2003.
43. Folsom, A., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D and risk of venous thromboembolism: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2014. **12**(9): p. 1455-1460.

44. Lane, D., et al., *Antithrombin III Northwick Park: demonstration of an inactive high MW complex with increased affinity for heparin*. Br J Haematol, 1987. **65**(4): p. 451-456.
45. Wolf, M., et al., *Antithrombin Milano: a new variant with monomeric and dimeric inactive antithrombin III*. Blood, 1985. **65**(2): p. 496-500.
46. Corral, J., et al., *Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4258-4263.
47. Thaler, E. and K. Lechner, *Antithrombin III deficiency and thromboembolism*. Clinics in haematology, 1981. **10**(2): p. 369.
48. Lane, D., et al., *Antithrombin III mutation database: first update. For the Thrombin and its Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Haemost, 1993. **70**(2): p. 361.
49. de la Morena-Barrio, M.E., et al., *C0229 Regulatory regions of SERPINC1 gene: Identification of the first mutation associated with antithrombin deficiency*. Thromb Res, 2012. **130**: p. S118.
50. Olds, R.J., et al., *Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia*. Biochemistry, 1993. **32**(16): p. 4216-4224.
51. Björk, I. and S.T. Olson, *Antithrombin*, in *Chemistry and biology of serpins*1997, Springer. p. 17-33.
52. Caspers, M., et al., *Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S-practical experience in genetic analysis of a large patient cohort*. Thromb Haemost, 2012. **108**(2): p. 247.
53. Luxembourg, B., et al., *Molecular basis of antithrombin deficiency*. Thromb Haemost, 2011. **105**(4): p. 635-646.
54. Perry, D.J. and R.W. Carrell, *Molecular genetics of human antithrombin deficiency*. Human mutation, 1996. **7**(1): p. 7-22.
55. Bock, S.C. and D.J. Levitan, *Characterization of an unusual DNA length polymorphism 5'to the human antithrombin III gene*. Nucleic Acids Res, 1983. **11**(24): p. 8569-8582.
56. Fernandez-Rachubinski, F.A., J.H. Weiner, and M.A. Blajchman, *Regions flanking exon 1 regulate constitutive expression of the human antithrombin gene*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(46): p. 29502-29512.
57. Tremp, G.L., et al., *A 700-bp fragment of the human antithrombin III promoter is sufficient to confer high, tissue-specific expression on human apolipoprotein A-II in transgenic mice*. Gene, 1995. **156**(2): p. 199-205.
58. Prochownik, E.V., *Relationship between an enhancer element in the human antithrombin III gene and an immunoglobulin light-chain gene enhancer*. Nature, 1985. **316**(6031): p. 845-848.
59. NIESSEN, R.W., et al., *Ligand-dependent enhancement of human antithrombin gene expression by retinoid X receptor α and thyroid hormone receptor β* . Biochemical Journal, 1996. **318**(1): p. 263-270.
60. Aihara, K.-i., et al., *Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(34): p. 35798-35802.
61. Bezemer, I.D., et al., *Gene variants associated with deep vein thrombosis*. Jama, 2008. **299**(11): p. 1306-1314.
62. Huldshinsky, K., *Heilung von Rachitis durch künstliche Höhensonne*. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1919. **45**(26): p. 712-713.
63. Mellanby, S.E., *The part played by an accessory factor in the production of experimental rickets*. 1918.
64. McCollum, E.V., *The paths to the discovery of vitamins A and D*. J Nutr, 1967. **91**(2): p. 11-6.

65. McCollum, E.V., et al., *Studies on experimental rickets XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition.* Journal of Biological Chemistry, 1922. **53**(2): p. 293-312.
66. Bouillon, R., et al., *Vitamin D and cancer.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2006. **102**(1): p. 156-162.
67. Holick, M., et al., *Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin.* Biochemical and biophysical research communications, 1977. **76**(1): p. 107-114.
68. OKANO, T., et al., *PHOTOCHEMICAL CONVERSION OF 7-DEHYDRO-CHOLESTEROL INTO VITAMIN D3 IN RAT SKINS.* Journal of nutritional science and vitaminology, 1977. **23**(2): p. 165-168.
69. Fraser, D. and E. Kodicek, *Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin D metabolite.* Nature, 1970. **228**(5273): p. 764-766.
70. Lehmann, B., *The vitamin D3 pathway in human skin and its role for regulation of biological processes.* Photochemistry and photobiology, 2005. **81**(6): p. 1246-1251.
71. Gropper, S., J. Smith, and J. Groff, *The fat soluble vitamins.* Advanced Nutrition and Human Metabolism. Independence, KY: Wadsworth Cengage Learning, 2009: p. 371-424.
72. Ghazarian, J.G., et al., *Mitochondrial cytochrome p450 a component of chick kidney 25-hydroxycholecalciferol-1 α -hydroxylase.* Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**(10): p. 3026-3033.
73. Poort, S., et al., *Twelve novel and two recurrent mutations in 14 Austrian families with hereditary protein C deficiency.* Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis, 1993. **4**(2): p. 273-280.
74. Holick, M.F., *McCullum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century.* The American journal of clinical nutrition, 1994. **60**(4): p. 619-630.
75. Tsay, W., et al., *Genetic mutations in ten unrelated American patients with symptomatic type 1 protein C deficiency.* Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis, 1993. **4**(5): p. 791-796.
76. Millar, D.S., et al., *Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency.* Human genetics, 2000. **106**(6): p. 646-653.
77. Bringhurst, F.R., *Circulating forms of parathyroid hormone: peeling back the onion,* 2003, Clinical Chemistry.
78. Dusso, A.S. and A.J. Brown, *Mechanism of vitamin D action and its regulation.* American Journal of Kidney Diseases, 1998. **32**(4): p. S13-S24.
79. Kumar, S., et al., *Improvement in glucose tolerance and beta-cell function in a patient with vitamin D deficiency during treatment with vitamin D.* Postgrad Med J, 1994. **70**(824): p. 440-443.
80. HAUSSLER, M.R., et al. *Molecular biology of the vitamin D hormone.* in *Proceedings of the 1987 Laurentian Hormone Conference.* 1988. Elsevier.
81. Ruggiero, M., et al., *Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer.* Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 1998. **10**(1): p. 43-46.
82. Kondo, T., et al., *1 α , 25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways.* Journal of Bone and Mineral Research, 2004. **19**(9): p. 1411-1419.
83. Martinez, M.E. and W.C. Willett, *Calcium, vitamin D, and colorectal cancer: a review of the epidemiologic evidence.* Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 1998. **7**(2): p. 163-168.
84. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D.* Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.

85. Baker, A.R., et al., *Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(10): p. 3294-3298.
86. Sömjen, D., et al., *Developmental changes in responsiveness to vitamin D metabolites*. Journal of steroid biochemistry, 1987. **27**(4-6): p. 807-813.
87. Delmas, P., et al., *The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis*. Osteoporosis international, 2000. **11**(18): p. S2-S17.
88. Dunlop, T.W., et al., *The human peroxisome proliferator-activated receptor δ gene is a primary target of 1α , 25-dihydroxyvitamin D 3 and its nuclear receptor*. Journal of molecular biology, 2005. **349**(2): p. 248-260.
89. Lin, R., et al., *1α , 25-Dihydroxyvitamin D3 Promotes Vascularization of the Chondro-osseous Junction by Stimulating Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase 9*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**(9): p. 1604-1612.
90. Wang, T.-T., et al., *Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1, 25-dihydroxyvitamin D3 target genes*. Molecular endocrinology, 2005. **19**(11): p. 2685-2695.
91. Carlberg, C., F. Molnár, and A. Mourino, *Vitamin D receptor ligands: the impact of crystal structures*. Expert opinion on therapeutic patents, 2012. **22**(4): p. 417-435.
92. Miyamoto, K.-i., et al., *Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter*. Molecular endocrinology, 1997. **11**(8): p. 1165-1179.
93. Crofts, L., et al., *Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(18): p. 10529-10534.
94. Saijo, T., et al., *A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(3): p. 668.
95. Uitterlinden, A.G., et al., *Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms*. Gene, 2004. **338**(2): p. 143-156.
96. d'Alésio, A., et al., *Two single-nucleotide polymorphisms in the human vitamin D receptor promoter change protein-DNA complex formation and are associated with height and vitamin D status in adolescent girls*. Human molecular genetics, 2005. **14**(22): p. 3539-3548.
97. Haussler, M.R., et al., *The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed*. Journal of Bone and Mineral Research, 1998. **13**(3): p. 325-349.
98. Bouillon, R., W.H. Okamura, and A.W. Norman, *Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system*. Endocrine reviews, 1995. **16**(2): p. 200-257.
99. Heit, J.A., *Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management*. ASH Education Program Book, 2007. **2007**(1): p. 127-135.
100. Trauner, M. and J.L. Boyer, *Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation*. Physiological reviews, 2003. **83**(2): p. 633-671.
101. Roger, L., et al., *What is meant by the term "bile acid"?* American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1983. **244**(2): p. G107-G110.
102. Baretino, D., et al., *Glucocorticoids as modulators of expression and activity of Antithrombin (At): Potential clinical relevance*. Thromb Res, 2015. **135**(1): p. 183-191.
103. Björkhem, I., *Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids*. J Lipid Res, 1992. **33**(4): p. 455-471.

104. Paumgartner, G. and U. Beuers, *Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited*. Hepatology, 2002. **36**(3): p. 525-531.
105. Moschetta, A., et al., *A phylogenetic survey of biliary lipids in vertebrates*. J Lipid Res, 2005. **46**(10): p. 2221-2232.
106. Back, P. and K. Walter, *Developmental pattern of bile acid metabolism as revealed by bile acid analysis of meconium*. Gastroenterology, 1980. **78**(4): p. 671-676.
107. Hofmann, A., *Progress in idiopathic bile acid malabsorption*. Gut, 1998. **43**(6): p. 738-739.
108. Trillo, J.V., et al., *Self-aggregation mechanism of a naphthylamide cationic derivative of cholic acid. From fibers to tubules*. RSC Advances, 2014. **4**(11): p. 5598-5606.
109. Falany, C.N., et al., *Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(30): p. 19375-19379.
110. Izukura, M., et al., *Intracolonic infusion of bile salt stimulates release of peptide YY and inhibits cholecystokinin-stimulated pancreatic exocrine secretion in conscious dogs*. Pancreas, 1991. **6**(4): p. 427-432.
111. Ikemoto, S., et al., *Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease*. American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism, 1997. **273**(1): p. E37-E45.
112. Marin, J.J., et al., *Bile acid-induced modifications in DNA synthesis by the regenerating perfused rat liver*. Hepatology, 1993. **18**(5): p. 1182-1192.
113. Rosignoli, P., et al., *Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate*. European journal of nutrition, 2008. **47**(6): p. 301-309.
114. Erdjument, H., et al., *Antithrombin Milano, single amino acid substitution at the reactive site, Arg393 to Cys*. Thromb Haemost, 1988. **59**(03): p. 471-475.
115. Keitel, V., R. Kubitz, and D. Häussinger, *Endocrine and paracrine role of bile acids*. World journal of gastroenterology: WJG, 2008. **14**(37): p. 5620.
116. Goodwin, B., et al., *Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(1): p. 223-228.
117. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-1365.
118. Staudinger, J.L., et al., *The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(6): p. 3369-3374.
119. Xie, W., et al., *An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(6): p. 3375-3380.
120. Spek, C.A., et al., *Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1995. **15**(2): p. 214-218.
121. Evans, R.M. and D.J. Mangelsdorf, *Nuclear receptors, RXR, and the big bang*. Cell, 2014. **157**(1): p. 255-266.
122. Zhang, Z., et al., *Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome*. Genome research, 2004. **14**(4): p. 580-590.
123. Sakata, T., et al. *Studies on congenital protein C deficiency in Japanese: prevalence, genetic analysis, and relevance to the onset of arterial occlusive diseases*. in *Semin Thromb Hemost*. 2000. Copyright© 2000 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.:+ 1 (212) 584-4663.

124. Tang, L., et al., *Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35773.
125. Rastinejad, F., et al., *Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats*. Nature, 1995. **375**(6528): p. 203.
126. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-839.
127. Berg, L.-P., et al., *Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 1 in the protein C gene promoter is associated with hereditary thrombophilia*. Human molecular genetics, 1994. **3**(12): p. 2147-2152.
128. Di Minno, M.N.D., et al., *Antithrombin levels and the risk of a first episode of venous thromboembolism. A case-control study*. Thromb Haemost, 2013. **110**(01): p. 167-169.
129. Tang, L., et al., *Molecular basis of protein S deficiency in China*. American journal of hematology, 2013. **88**(10): p. 899-905.
130. Gronemeyer, H., J.-Å. Gustafsson, and V. Laudet, *Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily*. Nature reviews Drug discovery, 2004. **3**(11): p. 950.
131. Levin, E.R., *Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen*. Molecular endocrinology, 2005. **19**(8): p. 1951-1959.
132. Wehling, M. and R. Lösel, *Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors?* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2006. **102**(1-5): p. 180-183.
133. Sanda, N., et al., *An Sp1 binding site mutation of the PROS1 promoter in a patient with protein S deficiency*. Br J Haematol, 2007. **138**(5): p. 663-665.
134. Leroy-Matheron, C., et al., *Genetic modulation of plasma protein S levels by two frequent dimorphisms in the PROS1 gene*. Thromb Haemost, 1999. **81**(03): p. 1088-1092.
135. Espinosa-Parrilla, Y., et al., *Optimization of a simple and rapid single-strand conformation analysis for detection of mutations in the PROS1 gene: Identification of seven novel mutations and three novel, apparently neutral, variants*. Human mutation, 2000. **15**(5): p. 463-473.
136. De Stefano, V., et al., *The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(11): p. 801-806.
137. Adams, J.S., et al., *Redefining human vitamin D sufficiency: back to the basics*. Bone research, 2013. **1**(1): p. 2.
138. Holick, M.F., *McCullum Award Lecture, 1994: vitamin D—new horizons for the 21st century*, 1994, Oxford University Press.
139. Koibuchi, N. and W.W. Chin, *Thyroid hormone action and brain development*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2000. **11**(4): p. 123-128.
140. Oppenheimer, J.H. and H.L. Schwartz, *Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development*. Endocrine reviews, 1997. **18**(4): p. 462-475.
141. Weinberger, C., et al., *The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor*. Nature, 1986. **324**(6098): p. 641-646.
142. Umesono, K., et al., *Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1255-1266.
143. Chen, J.D. and R.M. Evans, *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors*. Nature, 1995. **377**(6548): p. 454-457.
144. Petty, K.J., *Tissue-and cell-specific distribution of proteins that interact with the human thyroid hormone receptor-β*. Molecular and cellular endocrinology, 1995. **108**(1-2): p. 131-142.
145. Yang, Y.-Z., et al., *Thyroid Hormone Receptor Variant α2 ROLE OF THE NINTH HEPTAD IN DNA BINDING, HETERODIMERIZATION WITH RETINOID X RECEPTORS, AND*

- DOMINANT NEGATIVE ACTIVITY*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(45): p. 28235-28242.
146. de la Morena-Barrio, M., et al., *Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC 1 gene defect*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2016. **14**(8): p. 1549-1560.
 147. Subramaniam, P., et al., *Variable clinical spectrum of the most common inborn error of bile acid metabolism—3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2010. **50**(1): p. 61-66.
 148. Iguchi, K., et al., *Abnormally high level of antithrombin in a case with hepatocellular carcinoma*. Thromb Res, 1996. **84**(2): p. 137-141.
 149. Solé, X., et al., *SNPStats: a web tool for the analysis of association studies*. Bioinformatics, 2006. **22**(15): p. 1928-1929.
 150. Mushunje, A., et al., *Latent antithrombin and its detection, formation and turnover in the circulation*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(12): p. 2170-7.
 151. Chowdhury, V., et al., *Identification of nine novel mutations in type I antithrombin deficiency by heteroduplex screening*. Br J Haematol, 1993. **84**(4): p. 656-661.
 152. Toderici, M., et al., *Identification of regulatory mutations in SERPINC1 affecting vitamin D response elements associated with antithrombin deficiency*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152159.
 153. López-Gálvez, R., et al., *Defects of splicing in antithrombin deficiency*. Research and practice in thrombosis and haemostasis, 2017. **1**(2): p. 216-222.
 154. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics—2013 update a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012: p. CIR. 0b013e31828124ad.
 155. Takagi, Y., et al., *Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation*. Thromb Res, 2014. **134**(4): p. 914-917.
 156. Simioni, P., et al., *X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua)*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(17): p. 1671-1675.
 157. Miyawaki, Y., et al., *Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance*. New England Journal of Medicine, 2012. **366**(25): p. 2390-2396.
 158. Labrousche, S., et al., *Protein C and protein S assessment in hospital laboratories: which strategy and what role for DNA sequencing?* Blood coagulation & fibrinolysis, 2003. **14**(6): p. 531-538.
 159. Targher, G., I. Pichiri, and G. Lippi. *Vitamin D, thrombosis, and hemostasis: more than skin deep*. in *Semin Thromb Hemost*. 2012. Thieme Medical Publishers.
 160. Blondon, M., et al., *The effect of calcium plus vitamin D supplementation on the risk of venous thromboembolism*. Thromb Haemost, 2015. **114**(05): p. 999-1009.
 161. Akiyama, K., et al., *Antithrombin III producing hepatocellular carcinoma*. Thromb Res, 1993. **72**(3): p. 193-201.
 162. Mack, C.L. and R.J. Sokol, *Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia*. Pediatric Research, 2005. **57**(5 Part 2): p. 87R.
 163. Ireland, H., et al., *ANTITHROMBIN FRANKFURT. 1. ARGININE TO CYSTEINE SUBSTITUTION AT THE REACTIVE SITE AND FORMATION OF A VARIANT ANTITHROMBIN-ALBUMIN COVALENT COMPLEX*. THROMB HAEMOSTASIS, 1991. **65**(6): p. 913-913.
 164. Navarro-Fernández, J., et al., *Antithrombin Dublin (p. Val30Glu): a relatively common variant with moderate thrombosis risk of causing transient antithrombin deficiency*. Thromb Haemost, 2016. **116**(01): p. 146-154.
 165. Beauchamp, N., et al., *Antithrombins Wibble and Wobble (T85M/K): archetypal conformational diseases with in vivo latent-transition, thrombosis, and heparin activation*. Blood, 1998. **92**(8): p. 2696-2706.

ANEXOS

Publicaciones Generadas Tesis

Artículos Científicos relacionados directamente con la tesis:

1: Toderici M, de la Morena-Barrio ME, Padilla J, Miñano A, Antón AI, Iniesta JA, Herranz MT, Fernández N, Vicente V, Corral J. Identification of Regulatory Mutations in SERPINC1 Affecting Vitamin D Response Elements Associated with Antithrombin Deficiency. *PLoS One*. 2016 Mar 22;11(3):e0152159. doi: 10.1371/journal.pone.0152159. eCollection 2016. Erratum in: *PLoS One*. 2016;11(7):e0159987. PubMed PMID: 27003919; PubMed Central PMCID: PMC4803246.

Artículos Científicos no relacionados directamente con la tesis:

2: de la Morena-Barrio ME, Martínez-Martínez I, de Cos C, Wypasek E, Roldán V, Undas A, van Scherpenzeel M, Lefeber DJ, Toderici M, Sevivas T, España F, Jaeken J, Corral J, Vicente V. Hypoglycosylation is a common finding in antithrombin deficiency in the absence of a SERPINC1 gene defect. *J ThrombHaemost*. 2016 Aug;14(8):1549-60. doi: 10.1111/jth.13372. Epub 2016 Jun 29. PubMed PMID: 27214821.

3: de la Morena-Barrio M, Sandoval E, Llamas P, Wypasek E, Toderici M, Navarro-Fernández J, Rodríguez-Alen A, Revilla N, López-Gálvez R, Miñano A, Padilla J, de la Morena-Barrio B, Cuesta J, Corral J, Vicente V. High levelsof latent antithrombin in plasma from patients with antithrombin deficiency. *Thromb Haemost*. 2017 May 3;117(5):880-888. doi: 10.1160/TH16-11-0866. Epub 2017 Feb 23. PubMed PMID: 28229161.

4: Revilla N, de la Morena-Barrio ME, Miñano A, López-Gálvez R, Toderici M, Padilla J, García-Avello Á, Lozano ML, Lefeber DJ, Corral J, Vicente V. Transient desialylation in combination with a novel antithrombin deficiency causing a severe and recurrent thrombosis despite anticoagulation therapy. *Sci Rep*. 2017 Mar 17;7:44556. doi: 10.1038/srep44556. PubMed PMID: 28303970; PubMed Central PMCID: PMC5355981.

5: Zeng W, Hu B, Tang L, You YY, Toderici M, de la Morena-Barrio ME, Corral J, Hu Y. Recurrent mutations in a SERPINC1 hotspot associate with venous thrombosis without apparent antithrombin deficiency. *Oncotarget*. 2017 Sep 28;8(48):84417-84425. doi: 10.18632/oncotarget.21365. eCollection 2017 Oct 13. Erratum in: *Oncotarget*. 2018 Feb 16;9(13):11428. PubMed PMID: 29137435; PubMed Central PMCID: PMC5663607.

6: Navarro-Fernández J, de la Morena-Barrio ME, Martínez-Alonso E, Dybedal I, Toderici M, Bohdan N, Miñano A, Heimdal K, Abildgaard U, Martínez-Ménarguez JA, Corral J, Vicente V. Biochemical and cellular consequences of the antithrombin p.Met1 mutation identified in a severe thrombophilic family. *Oncotarget*. 2018 Sep 9(69):33202-33214.

Trabajos relacionados directamente con la tesis presentados a congresos

Congresos Internacionales:

Comunicación Oral · *New Modulators of SERPINC1 gene expression. Relevance on antithrombin levels and potential therapeutic usefulness.* **M Toderici**; ME de la Morena Barrio; A Miñano; J Padilla; N García Barberá; R López Gálvez; V Vicente; J Corral. European Congress on Thrombosis and Haemostasis (ECTH). **La Haya, Holanda 2016**

Comunicación Oral · *Characterization of the p.Arg393Cys variant of antithrombin. Extracellular formation of Antithrombin-Albumin disulphide linked dimers through a conformational dependent mechanism and role in thrombosis.* **M Toderici**; ME de la Morena Barrio; C de Cos; A Miñano; S Espín; J Padilla; V Vicente; J Corral. Congress of the International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH). **Berlín, Alemania 2017**

Congresos Nacionales:

Póster Presentado · *Evaluación de la Antitrombina y ADN circulante durante el proceso de hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal crónica.* **M Toderici**; F Ramos; A Pérez; A Miñano; I Zuazu; J Cabezuelo; V Vicente; J Corral; ME de la Morena Barrio. LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. **Valencia 2015**

Comunicación Oral · *Nuevos agentes moduladores de la actividad transcripcional del gen SERPINC1. Incremento de los niveles endógenos de antitrombina y su aplicación terapéutica.* **M Toderici**; ME de la Morena Barrio; A Miñano; J Padilla; N García Barberá; V Vicente; J Corral. LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. **Santiago de Compostela 2016**

Comunicación Oral · *Interacción extracelular de la forma latente de la variante p.Arg393Cys de antitrombina con albúmina mediante puente disulfuro.* **M Toderici**; ME de la Morena Barrio; C de Cos; A Miñano; J Padilla; V Vicente; J Corral. LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. **Santiago de Compostela 2016**

Comunicación Oral · *Deficiencia transitoria de anti-FXa en portadores de la variante Antitrombina Cambridge II. Nuevas evidencias del papel protrombótico de esta mutación.* **M Toderici**; ME de la Morena Barrio; N Fernández Mellid; B de la Morena Barrio; R López Gálvez; V Vicente; J Corral. LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. **Málaga 2017**

Comunicación Oral · *Identificación de nuevas mutaciones en el gen SERPINC1 que afectando a los elementos de respuesta de la vitamina D provoca una deficiencia de antitrombina e incrementa el riesgo trombótico.* **M Toderici**, ME de la Morena Barrio, J Padilla, A Miñano, Al Antón, JA Iniesta, MT Herranz, N Fernández, V Vicente, J Corral. II Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. **Murcia 2017**

Conferencia Plenaria · *Identificación y caracterización de la anomalía de tráfico intracelular de la forma variante de Antitrombina ocasionada por la delección (C.1332_1336 del AAGAG) que genera un extremo carboxi-terminal distinto.* **M Toderici**; C Bravo-Pérez; ME de la Morena-Barrio; JE Chambers; SJ Marciniak; V Vicente; J Corral. LX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. XXXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. **Granada 2018**