

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 943**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/EP2012/061185**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12171949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12728458 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2721172**

54 Título: **Marcadores de enfermedad tromboembólica**

30 Prioridad:

**16.06.2011 EP 11170235**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.04.2018**

73 Titular/es:

**GENDIAG.EXE, S.L. (100.0%)**

**Joan XXIII 10**

**08950 Esplugues de Llobregat (Barcelona), ES**

72 Inventor/es:

**SALAS, EDUARDO;**

**SORIA, JOSÉ, MANUEL;**

**OGORELKOVA, MIROSLAVA;**

**ELOSUA, ROBERTO;**

**VILA, JOAN, S. y**

**CASTILLO, SERGIO**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 663 943 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Marcadores de enfermedad tromboembólica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades o trastornos tromboembólicos. Más específicamente, se refiere a marcadores y a métodos para determinar si un sujeto, particularmente un sujeto humano, corre riesgo de desarrollar enfermedad o trastorno tromboembólico, desarrollar un acontecimiento tromboembólico, tener enfermedad o trastorno tromboembólico, o experimentar una complicación de una enfermedad tromboembólica.

**Antecedentes técnicos**

La enfermedad tromboembólica es la causa principal de morbilidad en el mundo desarrollado (America Heart Association 2010. *Circulation* 2010; 121:e46-e215). La trombosis arterial es la causa subyacente más común de infarto de miocardio agudo, accidentes cerebrovasculares no hemorrágicos y enfermedad vascular periférica. Las manifestaciones patológicas de tromboembolia venosa (VTE) incluyen principalmente trombosis venosa profunda (DVT) y émbolo pulmonar (PE). Aunque los acontecimientos tromboembólicos arteriales son la causa principal de muerte y discapacidad, la enfermedad venosa también desempeña un papel importante. VTE se produce por primera vez en 100 de cada 100 000 personas cada año en los Estados Unidos (America Heart Association 2010. *Circulation* 2010; 121:e46-e215). Aproximadamente un tercio de los pacientes con VTE sintomática manifiestan PE, mientras que dos tercios manifiestan DVT sola (America Heart Association 2010. *Circulation* 2010; 121:e46-e215). PE es la causa más común de muerte hospitalaria evitable siendo representando 60 000 muertes en los Estados Unidos al año (Anderson FA. *Arch Intern Med* 1991;151:933-8, Spencer FA. *Arch Inter Med* 168:425-430).

Los manuales de medicina y los estudios epidemiológicos consideran característicamente la enfermedad tromboembólica arterial y venosa como entidades distintas, cada una con su propia base fisiopatológica, factores de riesgo únicos y regímenes terapéuticos distintos (Bauer KA. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 353-368). Los coágulos arteriales se producen normalmente en un vaso dañado y la causa más común de daño vascular en el sistema arterial es la enfermedad vascular aterosclerótica (AVD) (Lane DE 2000. *Thromb Haemost* 2000; 76:651-62). Por tanto, se considera que los factores de riesgo para la trombosis arterial son los mismos que para la AVD. Los coágulos arteriales se producen en un entorno de flujo alto y de cizalladura alta, y estos coágulos, también denominados coágulos blancos, son ricos en plaquetas. La prevención y el tratamiento de la trombosis arterial van frecuentemente dirigidos a la inhibición plaquetaria. Aunque la lesión vascular puede promover la formación de coágulos venosos, la estasis y los cambios en la composición sanguínea (trombofilia) son los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de coágulos venosos (Lane DE 2000. *Thromb Haemost* 2000; 76:651-62). Los coágulos venosos se producen en un sistema de flujo bajo, son ricos en fibrina que está enmarañada con glóbulos rojos y se denominan coágulos rojos. La inhibición de formación de fibrina es la parte principal de la prevención y el tratamiento de trombosis venosa. Con frecuencia se notifica que los factores de riesgo para la trombosis arterial y la venosa difieren en gran medida (Bauer KA. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 353-368).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado una asociación estrecha entre la trombosis arterial y la venosa a una variedad de niveles. Específicamente se ha mostrado que:

- 45 1) la trombosis arterial y la venosa comparten factores de riesgo comunes (Doggen CJM *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1970-5., Goldhaber SZ En: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Hemostasis and Thrombosis*. New York: Churchill and Livingstone: 1997; 1327-1333),
- 50 2) los individuos que padecen tromboembolia venosa idiopática corren un riesgo notablemente aumentado de padecer un acontecimiento cardiovascular significativo (Becattini C. *European Heart Journal* 2005; 26:77-83),
- 3) los individuos que padecen tromboembolia venosa idiopática tienen una incidencia aumentada de enfermedad vascular aterosclerótica (Becattini C. *European Heart Journal* 2005; 26:77-83) y
- 55 4) aquellos que padecen tromboembolia venosa idiopática tienen una incidencia significativamente mayor de síndrome metabólico (Ageno W. *J Thromb Haemost* 2006; 4:1914-8).

Los factores de riesgo que se ha notificado que son comunes tanto a la trombosis arterial como a la venosa y que representan peligro significativo para el desarrollo de cada entidad incluyen edad creciente y peso, fumar, exposición a estrógenos y la presencia de diabetes. También se ha mostrado que altos niveles de colesterol HDL están asociados con un riesgo disminuido de trombosis venosa mientras que niveles de triglicéridos y/o de colesterol total elevados conllevan un riesgo aumentado. Otros factores de riesgo que se ha notificado que son comunes tanto a la trombosis arterial como a la venosa incluyen la presencia de anticuerpos antifosfolípidos, disfibrirogenemia, hiperhomocisteinemia y niveles elevados de fibrinógeno, lipoproteína (a) y factor VIII.

Una de las evidencias más fuertes en favor de un nexo entre la trombosis venosa y la arterial es el estudio de

análisis genético de trombofilia idiopática (GAIT) (Souto JC. Am J Hum Genet 2000;67:1452-1459). Este estudio familiar de la genética de la trombosis en una población española se inició para determinar la heredabilidad de la trombosis. Se evaluaron trescientos veintiocho individuos en 21 árboles genealógicos extensos usando una adaptación asistida por ordenador nueva de un modelo de umbral multivariable. Los autores concluyeron que más del 60 % de la variación en la propensión a la trombosis común es atribuible a factores genéticos. Lo que hace a este estudio inusual es que se incluyeron tanto acontecimientos tromboembólicos venosos como arteriales en el análisis. Cuando se analizaron conjuntamente la trombosis venosa y la arterial, las trombosis venosa y arterial estaban altamente correlacionadas genéticamente. Es decir, muchos de los mismos genes están implicados en la patogénesis de la enfermedad arterial y de la venosa.

También hay estudios (Doggen CJM, Smith NL, Lamahre RN, *et al.* Arteros Thromb Vasc Biol 2004; 24:1970-5; Becattini E. European Heart Journal 2005; 26:77-83; Ageno W.] Thromb Haemost 4:1914-8) que sugieren que la trombosis arterial y la venosa representan diferentes manifestaciones de la misma enfermedad y que el proceso subyacente está dirigido por un conjunto de genes común.

#### A) Prevención del primer episodio de tromboembolia

La trombosis sintomática (arterial o venosa) es una enfermedad multifactorial que se manifiesta cuando una persona con una predisposición subyacente a trombosis (trombofilia también denominada trastorno trombofílico o síndromes de hipercoagulabilidad) está expuesta a factores de riesgo clínicos.

La valoración de la presencia de trombofilia no se limita únicamente a pruebas de laboratorio sino que comienza con una anamnesis y un examen físico detallados. Una investigación detallada de síntomas y signos de factores de riesgo adquiridos (enfermedades coexistentes, exposición a medicamentos y circunstancias clínicas) que están asociados con trombosis son una parte importante de la evaluación inicial como lo es un examen físico completo. Además de pruebas de laboratorio sensatas apropiadas para la edad y los síntomas del paciente, es crítica la confirmación objetiva de tromboembolia venosa.

#### Pruebas de laboratorio

Actualmente, no hay ningún ensayo global de laboratorio individual que "examine para detectar" la presencia de trombofilia. Por tanto, las pruebas de laboratorio pueden clasificarse de manera amplia en (1) pruebas diagnósticas generales, (2) pruebas de coagulación especializadas y (3) pruebas complementarias para detectar trastornos que se sabe que predisponen a trastornos tromboticos.

#### Pruebas de coagulación especializadas

Las pruebas de coagulación especiales consisten en una batería de ensayos de trombofilia complejos (basados en proteínas y en ADN) para detectar la presencia de una trombofilia heredada o adquirida. Sin embargo, múltiples condiciones preanalíticas afectan a los resultados de los ensayos no basados en ADN (por ejemplo anticoagulantes, trombosis aguda, enfermedad hepática, etc.), por lo que se necesita realizar la interpretación de los resultados dentro del contexto de las circunstancias que rodean a las pruebas. Un factor adicional que afecta al rendimiento de las pruebas es la etnicidad de la población de pacientes que está estudiándose. La prevalencia del factor V de Leiden (FVL) varía entre el 3 % y el 7 % en las personas de raza blanca de ascendencia europea, pero tiene una prevalencia muy baja en individuos de otros grupos étnicos: el 0 % entre los nativos americanos/australianos y africanos, el 0,16 % entre los chinos y el 0,6 % entre individuos de Asia Menor (India, Pakistán, Sri Lanka). La etnicidad es importante especialmente cuando se analizan pocos (uno o dos) marcadores genéticos.

Factores que afectan a los resultados de pruebas de coagulación especializadas basadas en proteínas.

#### Efecto de trombosis aguda

Durante el episodio de trombosis aguda, los niveles de antitrombina, proteína C y proteína S pueden reducirse transitoriamente; por tanto, si no se repiten las pruebas, lejos del acontecimiento trombotico y del tratamiento anticoagulante, puede diagnosticarse erróneamente que el paciente presenta una deficiencia congénita.

#### Efecto de anticoagulantes

- Heparina. El tratamiento con heparina puede reducir de manera falsa los niveles de antitrombina. Aunque la mayoría de los reactivos anticoagulantes lúpicos (LAC) [por ejemplo tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (DRVVT) y APTT de Stado] contienen neutralizantes de heparina que pueden neutralizar hasta 1 U/ml de heparina, la presencia de heparina en exceso puede dar como resultado un resultado de prueba falso positivo, lo que afecta a la duración de la profilaxis secundaria. Por tanto, los resultados positivos de las pruebas de LAC realizadas mientras se recibe heparina deben volver a confirmarse cuando el paciente deja de tomar heparina.

- Tratamiento con antagonista de vitamina K (VKA). Los niveles de las proteínas C y S se reducen por el tratamiento

con VKA (por ejemplo warfarina dado que son proteínas dependientes de vitamina K). Además, el tratamiento con VKA puede dar como resultado un falso positivo de LAC con ciertos ensayos (por ejemplo DRVVT).

- 5 • Inhibidores de trombina directos (DTI; por ejemplo argatroban, lepirudina, bivalirudina). Debido a que la mayoría de los ensayos de actividad anticoagulante se basan en la generación de trombina para lograr un criterio de valoración de detección por puntos, la presencia de DTI interfiere con este criterio de valoración y retrasa la formación de punto. Esto puede conducir a un falso positivo de LAC o a niveles de proteínas C y S falsamente reducidos. Los resultados de los ensayos cromogénicos son probablemente fiables.

10 Efecto de enfermedad hepática

La mayoría de las proteínas anticoagulantes y procoagulantes se producen en el hígado. En enfermedad hepática avanzada, tanto los niveles de las proteínas anticoagulantes como procoagulantes están reducidos.

15 Cuestiones de recogida y procesamiento de muestras

En el sentido práctico, los médicos encargados tienen un impacto limitado sobre la recogida y el procesamiento de muestras; sin embargo, el conocimiento de tales efectos puede conducir a plantearse repetir las pruebas, si los datos son inesperados o no se ajustan al patrón esperado [por ejemplo, proporción de resistencia a proteína C activada reducida (APC-R) que sugiere la presencia de APC-R, pero la prueba de FVL es negativa].

- Efecto del tipo de anticoagulante en tubo de recogida de muestras

25 Los tubos de recogida de muestras convencionales contienen 0,105-0,109 mol de citrato para resultados óptimos. Las muestras pueden recogerse inadvertidamente en ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), lo que dará como resultado niveles de proteína falsamente reducidos y una proporción de APC-R reducida.

- Efecto de procesamiento de muestras

30 Las muestras deben centrifugarse dos veces tan pronto como sea posible después de la recogida con el fin de reducir la cantidad de plaquetas residuales a un mínimo. La presencia de plaquetas residuales puede dar como resultado un resultado falso negativo de la prueba de LAC.

35 Riesgo molecular de enfermedad trombótica

Aunque una tendencia heredada al sangrado excesivo se atribuye a menudo a una única o a unas pocas anomalías genéticas, hay una amplia evidencia que sugiere que, en cambio, las manifestaciones clínicas de hipercoagulabilidad son habitualmente el resultado de interacciones adversas entre múltiples genes y el entorno. Por tanto, el uso de diagnósticos moleculares para documentar marcadores de riesgo trombótico (trombofilia) demostrará ser mucho más desafiante que con los trastornos hemorrágicos heredados. Para complicar adicionalmente la cuestión, a pesar del hecho de que con pruebas apropiadas pueden identificarse mutaciones trombofílicas en pacientes tras un primer episodio clínico de tromboembolia venosa, la interpretación de estos resultados sigue siendo problemática.

45 Resistencia heredada a proteína C activada: factor V de Leiden

Hasta 1994, la investigación de pacientes con evidencia clínica de hipercoagulabilidad era habitualmente improductiva. Sin embargo, con el descubrimiento por Dahlback y Hildebrand de una forma heredada de resistencia a los efectos proteolíticos de proteína C activada y el hallazgo subsiguiente de una mutación de cambio de sentido común en el gen del factor V por Bertina y colaboradores en Leiden, se hizo un avance importante en la valoración en laboratorio del riesgo trombótico.

La mutación de Leiden sustituye una arginina por una glutamina en el residuo de aminoácido 506 en el factor V, el sitio de escisión inicial para proteína C activada. La mutación se detecta fácilmente mediante varios enfoques basados en PCR. Se ha documentado que entre el 2 % y el 5 % de individuos en poblaciones occidentales son heterocigotos para el factor V de Leiden. En cambio, la mutación es extremadamente rara en sujetos de ascendencia asiática y africana.

60 En algunos laboratorios, se realiza un examen inicial para detectar resistencia a la proteína C activada usando la prolongación de un ensayo basado en tiempo de tromboplastina parcial activada como indicador; los pacientes que dan resultado positivo en las pruebas (prolongación en presencia de plasma deficiente en factor V) se evalúan subsiguientemente mediante una PCR.

65 Cada vez más, cuando el acceso a análisis molecular basado en PCR se vuelve rutinario, los laboratorios elegirán más frecuentemente pasar directamente a la prueba genética, ya que el resultado es definitivo y más del 95 % de resistencia a proteína C activada es un resultado de esta mutación individual.

Las personas heterocigóticas para la mutación del factor V de Leiden tienen un riesgo relativo aumentado aproximadamente cinco veces de trombosis venosa. Se encuentra en el 15-20 % de los pacientes que experimentan su primer episodio de trombosis venosa. El fenotipo de hipercoagulabilidad asociado con el factor V de Leiden muestra penetrancia incompleta y algunos individuos pueden no manifestar nunca un acontecimiento trombótico clínico. A diferencia del riesgo relativo aumentado para un acontecimiento trombótico venoso inicial asociado con el factor V de Leiden, esta variante genética no está asociada con riesgos aumentados para trombosis arterial ni para una recidiva de trombosis venosa.

La coherencia de otros factores de riesgo trombótico heredado o de exposición a factores de riesgo del entorno puede potenciar drásticamente el riesgo trombótico en portadores del factor V de Leiden. Muchos médicos realizan pruebas para detectar este trastorno en pacientes con unos antecedentes familiares de trombosis que están a punto de exponerse a un factor de riesgo trombótico adquirido. Los individuos homocigotos para la mutación tienen un riesgo relativo aumentado 70 veces de trombosis venosa, indicando que este fenotipo se transmite como un rasgo codominante.

Variante de secuencia no codificante en la posición 20210 en 3' de protrombina

En 1996, Poort y colaboradores describieron una asociación entre un polimorfismo de nucleótidos de G a A en la posición 20210 en la región no traducida (UTR) en 3' del gen de protrombina, niveles en plasma aumentados de protrombina y un riesgo potenciado de trombosis venosa. Esta sustitución de nucleótido polimórfica está en el propio extremo de la UTR en 3' y ejerce su efecto sobre niveles de protrombina en el estado heterocigoto. Aunque los niveles en plasma de protrombina en sujetos heterocigotos para este polimorfismo son más altos en promedio que en individuos con un genotipo de protrombina normal, los niveles siguen estando habitualmente dentro del intervalo normal. Como consecuencia, este polimorfismo sólo puede evaluarse mediante pruebas genéticas, lo que se logra mediante un ensayo basado en PCR, lo más frecuentemente implicando ahora una forma de ensayo cuantitativo en tiempo real.

Como con el genotipo de factor V de Leiden, la prevalencia de la variante de G a A en 20210 de protrombina en la población general es relativamente alta al 1-5 %. Esta variante también es rara en personas de ascendencia asiática y africana. El estado heterocigoto está asociado con un aumento de dos a cuatro veces en el riesgo relativo de trombosis venosa. No hay ninguna influencia sobre la recidiva de trombosis venosa. La relación de la G2010A de protrombina con la trombosis arterial es muy moderada (OR de 1,32; IC del 95 % de 1,03-1,69) (Kim RJ. Am Heart J 2003; 146:948-957).

Variante C671T de 5,10-metilen-tetrahidrofolato reductasa termolábil

La tercera variante genética de alta prevalencia que se pensó inicialmente que estaba asociada con un riesgo trombótico aumentado es la variante de C a T en el nucleótido 677 (una sustitución de alanina por valina) en el gen de la 5,10-metilen-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Este genotipo da como resultado la expresión de una enzima con termolabilidad aumentada. La homocigosidad para esta variante está asociada con hiperhomocisteinemia, particularmente en presencia de deficiencia de folato. En muchas poblaciones (europeos del sur e hispanoamericanos), aproximadamente el 10 % de los sujetos son homocigotos para la variante C677T, un cambio de secuencia que puede detectarse fácilmente mediante una estrategia basada en PCR. Sin embargo, después de un análisis extendido adicional, a diferencia de las variantes de 20210 de protrombina y factor V de Leiden, el papel del polimorfismo C677T de MTHFR como factor de riesgo independiente para la tromboembolia venosa parece secundario.

B) Diagnóstico de tromboembolia venosa

Las pruebas objetivas para detectar trombosis venosa profunda y embolia pulmonar son esenciales debido a que la evaluación clínica sola no es fiable. No lograr diagnosticar tromboembolia venosa está asociado con una alta mortalidad, mientras que la anticoagulación inapropiada puede conducir a complicaciones graves, incluyendo hemorragia mortal.

Diagnóstico de trombosis venosa profunda

Las características clínicas de trombosis venosa profunda incluyen inflamación localizada, eritema, dolor a la palpación y edema distal. Sin embargo, estas características no son específicas y aproximadamente el 85 % de los pacientes ambulatorios con sospecha de trombosis venosa profunda tendrán otra causa para sus síntomas. El diagnóstico diferencial para trombosis venosa profunda incluye:

- celulitis;
- quiste de Baker roto;

- desgarro muscular, calambres musculares, hematoma muscular;

- compresión venosa externa;

5 • tromboflebitis superficial; y

- síndrome posttrombótico.

#### Flebografía

10 La flebografía es la prueba de referencia convencional para el diagnóstico de trombosis venosa profunda. Presenta ventajas sobre otras pruebas en cuanto a que es capaz de detectar tanto trombosis venosa proximal como trombosis venosa aislada de la pantorrilla. Sin embargo, las desventajas son que:

15 • es invasiva, cara y requiere experiencia en la técnica; y

- expone a los pacientes a los riesgos asociados con medios de contraste, incluyendo la posibilidad de una reacción alérgica o una insuficiencia renal.

20 Por estas razones, pruebas no invasivas tales como ecografía venosa y pruebas del dímero D, solas o en combinación con evaluación clínica, han reemplazado en gran medida a la flebografía.

#### Ecografía de compresión venosa

25 Este es el método no invasivo de elección para diagnosticar DVT. Se obtienen imágenes en tiempo real de la vena femoral común, la vena femoral superficial, la vena popliteal y las venas de la pantorrilla profundas proximales y se comprimen con la sonda de transductor. La discapacidad 10 que comprime la vena totalmente es diagnóstico de trombosis venosa. La ecografía venosa es altamente precisa para la detección de trombosis venosa proximal con una sensibilidad de aproximadamente el 97 %, una especificidad de aproximadamente el 94 % y un valor predictivo negativo de aproximadamente el 98 % en pacientes sintomáticos. Si no puede excluirse DVT mediante una ecografía venosa proximal normal en combinación con otros resultados (por ejemplo probabilidad clínica baja o dímero D normal), se realiza una ecografía de seguimiento después de 1 semana para comprobar trombosis venosa de la pantorrilla prolongada (presente en aproximadamente el 2 % de los pacientes). Si la segunda ecografía es normal, el riesgo de VTE sintomática durante los 6 meses siguientes es menor del 2 %.

35 La exactitud de ecografía venosa es sustancialmente más baja si sus hallazgos son discordantes con la valoración clínica y/o si las anomalías están confinadas a segmentos cortos de las venas profundas. Idealmente, a estos pacientes se les realizará un flebograma debido a que el resultado del flebograma diferirá de la ecografía venosa en aproximadamente el 25 % de estos casos. Si la flebografía no está disponible, pruebas adicionales (por ejemplo dímero D, ecografía venosa en serie) puede ayudar a aclarar el diagnóstico y a evitar tratamiento anticoagulante inapropiado.

45 La ecografía venosa de las venas de la pantorrilla es más difícil de realizar (por ejemplo sensibilidad del 70 %) y su valor es controvertido. Algunos investigadores han propuesto que debe usarse una única ecografía de compresión completa que incluya el examen de las venas de la pantorrilla para excluir DVT. Estudios que usan este método han notificado una incidencia de VTE del 0,5 % durante un seguimiento de 3 meses después de un examen negativo, estableciendo que una ecografía venosa negativa que incluye las venas de la pantorrilla excluye VTE [8]. Sin embargo, este método tiene la posibilidad de diagnosticar DVT de la pantorrilla que se habría lisado espontáneamente sin tratamiento y proporcionar resultados falsos positivos, exponiendo por lo tanto a los pacientes al riesgo de sangrado debido a tratamiento anticoagulante sin beneficio claro.

#### Pruebas en la sangre del dímero D

55 El dímero D se forma cuando se descompone fibrina reticulada mediante plasmina y los niveles están habitualmente elevados con DVT y/o PE. Niveles normales pueden ayudar a excluir VTE, pero niveles de dímero D elevados no son específicos y tienen un valor predictivo positivo bajo. Los ensayos de dímero D difieren notablemente en sus propiedades diagnósticas para VTE. Un resultado normal con un ensayo de dímero D muy sensible (es decir, sensibilidad de aproximadamente el 98 %) excluye VTE por sí solo [es decir presenta un alto valor predictivo negativo (NPV)]. Sin embargo, las pruebas de dímero D muy sensibles tienen especificidad baja (aproximadamente el 40 %), lo que limita su uso debido a las altas tasas de falsos positivos. Con el fin de excluir DVT y/o PE, se necesita combinar un resultado normal con un ensayo de dímero D menos sensible (es decir aproximadamente el 85 %) o bien con una baja probabilidad clínica o bien con otra prueba objetiva que presente un NPV alto, pero que no sea diagnóstica por sí sola (por ejemplo, ecografía venosa negativa de las venas proximales). Como los ensayos de dímero D menos sensibles son más específicos (aproximadamente el 70 %), proporcionan menos resultados falsos positivos.

La especificidad del dímero D disminuye con la edad y con comorbilidad/enfermedad, tal como cáncer. Por consiguiente, las pruebas de dímero D pueden tener un valor limitado como prueba diagnóstica para VTE en pacientes hospitalizados (más resultados falsos positivos) y no es útil en el periodo posoperatorio temprano.

5 Flebografía por tomografía computerizada (TC) y flebografía por resonancia magnética (RM)

La flebografía por TC y la flebografía por RM tienen la posibilidad de diagnosticar DVT en entornos en los que la exactitud de la ecografía de compresión es limitada (por ejemplo DVT pélvica aislada, pacientes asintomáticos). La sensibilidad y la especificidad de la flebografía por TC en comparación con la ecografía de compresión para detectar toda la DVT se han notificado entre el 89 % y el 100 % y entre el 94 % y el 100 %, respectivamente. Sin embargo, dado el coste, exposición a radiación y disponibilidad limitada de flebografía por TC, esta modalidad actualmente desempeña un papel limitado en el diagnóstico de DVT. Un metaanálisis de estudios que compara la flebografía por RM con flebografía convencional notificó una sensibilidad acumulada del 92 % y una especificidad del 95 % de flebografía por RM para DVT proximal. Como con flebografía por TC, el coste y la disponibilidad inhibirán el uso generalizado de RM para el diagnóstico de DVT aguda.

Diagnóstico de embolia pulmonar (PE)

Las características clínicas de PE pueden incluir:

- dolor torácico pleural,
- dificultad para respirar,
- síncope,
- hemoptisis y
- palpitaciones.

Como con DVT. Estas características no son específicas y deben realizarse pruebas objetivas para confirmar o excluir el diagnóstico de PE.

Angiografía pulmonar

Esta es la prueba de referencia convencional para el diagnóstico de PE. Sin embargo, tiene muchas de las mismas limitaciones que la flebografía.

Angiografía pulmonar por tomografía computerizada (CTPA)

La TC espiral (también conocida como TC helicoidal) con inyección periférica de contraste radiográfico (CTPA) es la prueba diagnóstica convencional actual para PE (Stein PD. N Engl J Med 2006; 354:2317-2327, Roy PM. Br Med J 2005; 331:259). En comparación con la exploración pulmonar de ventilación-perfusión, es menos probable que la CTPA sea "no diagnóstica" (es decir aproximadamente el 10 % frente al 60 %) y tiene la posibilidad de identificar una etiología alternativa para los síntomas del paciente. Esta técnica tiene una sensibilidad del 83 %, una especificidad del 96 %, un NPV del 95 % y un valor predictivo positivo del 86 % para PE.

La exactitud de la CTPA varía según el tamaño de la arteria pulmonar más grande implicada y según la probabilidad clínica antes de la prueba. Por ejemplo, el valor predictivo positivo de la CTPA es del 97 % para la embolia pulmonar en la arteria principal o lobular, pero disminuye hasta el 68 % para las arterias segmentarias y es aún menor para PE en las arterias subsegmentarias (25 %). En pacientes con una probabilidad clínica antes de la prueba alta de PE, el valor predictivo positivo de CTPA es del 96 %, pero este valor disminuye hasta el 92 % en pacientes con una probabilidad técnica antes de la prueba de PE y hasta el 58 % en pacientes con una probabilidad clínica antes de la prueba baja de PE.

En estudios de tratamiento que usaron CTPA para diagnosticar PE, menos del 2 % de los pacientes en los que se interrumpió el tratamiento anticoagulante basándose en una CTPA negativa pasaron a tener VTE sintomática durante el seguimiento. Tomadas conjuntamente, estas observaciones sugieren lo siguiente:

- Una CTPA normal, de buena calidad excluye PE si la sospecha clínica es baja o moderada.
- Los defectos intraluminales de la arteria pulmonar más grande o lobular son generalmente diagnósticos para PE.
- Los defectos intraluminales de las arterias pulmonares segmentarias son generalmente diagnósticos para PE si la sospecha clínica es moderada o alta, pero deben considerarse no diagnósticos si la sospecha es baja o hay hallazgos discordantes (por ejemplo dímero D negativo).

• Los defectos intraluminales de las arterias pulmonares subsegmentarias son no diagnósticos y los pacientes con tales hallazgos requieren pruebas adicionales.

5 Una nota de precaución: si es posible, debe evitarse la CTPA en mujeres más jóvenes (por ejemplo, menos de 40 años) debido a que emite una dosis sustancial de radiación hacia el tórax, lo que aumenta el riesgo de cáncer de mama.

10 Exploración pulmonar de ventilación-perfusión

10 En el pasado, la exploración pulmonar de ventilación-perfusión era la investigación inicial en pacientes con PE sospechada y aún es útil en pacientes con contraindicaciones a tinción de contraste de rayos X (por ejemplo con insuficiencia renal) y en pacientes con riesgo mayor de desarrollar cáncer de mama por exposición a radiación (por ejemplo mujeres jóvenes). Una exploración por perfusión normal excluye PE, pero sólo se encuentra en una minoría de pacientes (10-40 %). Los defectos de perfusión no son específicos; sólo aproximadamente un tercio de los pacientes con defectos de perfusión tienen PE. La probabilidad de que un defecto de perfusión esté provocado por PE aumenta con el tamaño y el número y la presencia de una exploración de ventilación normal (defecto “no coincidente”). Una exploración pulmonar con defectos de perfusión segmentarios o mayores no coincidentes se denomina “probabilidad alta”. Un único defecto no coincidente está asociado con una prevalencia de PE de aproximadamente el 80 %. Tres o más defectos no coincidentes están asociados con una prevalencia de PE de aproximadamente el 90 %. Los hallazgos de la exploración pulmonar son altamente dependientes de la edad, con una proporción relativamente alta de exploraciones normales y una proporción baja de exploraciones no diagnósticas en pacientes más jóvenes. También se observa una frecuencia alta de exploraciones pulmonares normales en pacientes embarazadas que se someten a investigación para detectar PE.

25 Valoración clínica:

Como con la DVT sospechada, la valoración clínica es útil para categorizar la probabilidad de PE.

30 Pruebas de dímero D:

Como se ha comentado anteriormente cuando se consideró el diagnóstico de DVT, un resultado de dímero D normal, solo o en combinación con otra prueba negativa, puede usarse para excluir PE.

35 Pacientes con combinaciones no diagnósticas de pruebas no invasivas para PE

Los pacientes con resultados de pruebas no diagnósticos para PE en la presentación tienen una prevalencia de PE de aproximadamente el 20 %; por tanto, se requieren investigaciones adicionales para excluir PE.

40 Diagnóstico de PE en el embarazo

Las pacientes embarazadas con PE sospechada se pueden tratar de forma similar a las pacientes no embarazadas, con las siguientes modificaciones:

45 • Debe realizarse primero la ecografía venosa de las piernas seguido de exploración pulmonar de ventilación-perfusión si no hay DVT.

• La cantidad de radioisótopo usado para la exploración por perfusión debe reducirse y la duración de la exploración debe prolongarse.

50 • Si se realiza angiografía pulmonar, se prefiere el enfoque braquial con examen abdominal.

• El uso de CTPA en el embarazo está desaconsejado, principalmente debido a la exposición a la radiación de la madre.

55 C) Riesgo de recidiva después de un primer episodio de tromboembolia venosa sintomática

La tromboembolia venosa está asociada con diversos factores de riesgo, algunos de los cuales son transitorios, tales como cirugía reciente y embarazo, y otros de los cuales son persistentes, tales como cáncer (la tabla 1 muestra los factores de riesgo para tromboembolia venosa). Cuando la tromboembolia venosa está asociada con un factor de riesgo adquirido, o bien transitorio o bien persistente, se denomina provocada. Cuando no hay ningún factor de riesgo clínico aparente, se denomina no provocada o idiopática.

65 Tabla 1. Factores de riesgo para tromboembolia venosa

Factores de riesgo transitorios principales	Posibles factores de riesgo adquiridos o persistentes
---	---



Hospitalización	Enfermedades vasculares del colágeno
Inmovilización por escayola	Insuficiencia cardíaca
Cirugía	Neoplasia maligna
Traumatismo	Medicamentos
Factores de riesgo transitorios secundarios	Trastornos mieloproliferativos
Tratamiento hormonal o con anticonceptivos orales	Síndrome nefrótico
Embarazo	
Presencia de factores de riesgo principales de 1 a 3 meses antes de la tromboembolia venosa	
Viaje prolongado (≥2 horas)	

Se ha reconocido recientemente que la presencia o ausencia de un factor de riesgo transitorio, o reversible, en el momento de la tromboembolia venosa afecta fuertemente al riesgo de recidiva después de que se ha detenido el tratamiento con anticoagulantes. Los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio tienen un riesgo de recidiva bajo en comparación con los pacientes o bien con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo persistente o bien con tromboembolia venosa no provocada (Alfonso Iorio. Arch Intern Med 2010; 170:1710-1716). Por esta razón, los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio se tratan habitualmente con agentes anticoagulantes durante 3 meses (Alfonso Iorio. Arch Intern Med 2010; 170:1710-1716), mientras que pacientes con tromboembolia venosa que no está asociada con un factor de riesgo transitorio se tratan a menudo a largo plazo (Alfonso Iorio. Arch Intern Med 2010; 170:1710-1716). El riesgo acumulativo de recidiva a uno, cinco y 10 años es del 15, el 41 y el 53 por ciento, respectivamente, en pacientes con tromboembolia venosa idiopática, en comparación con el 7, el 16 y el 23 por ciento en pacientes con un acontecimiento provocado (Galio NJ. Am Fam Physician 2011; 83:293-300).

Aunque está ampliamente aceptado que el riesgo de recidiva en pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio es lo suficientemente bajo como para justificar detener el tratamiento con anticoagulantes después de 3 meses, este riesgo de recidiva no está bien cuantificado. Además, el riesgo de recidiva puede no ser el mismo en todos los pacientes con tromboembolia venosa provocada por un factor de riesgo transitorio.

D) Riesgo de trombosis arterial

La trombosis arterial es una causa común de ingreso hospitalario, muerte y discapacidad en los países desarrollados (y creciente en naciones en desarrollo debido a epidemias globales de tabaquismo, obesidad y diabetes). Habitualmente sigue a la rotura espontánea de una placa aterosclerótica y puede:

- Ser clínicamente asintomática;
- Contribuir a la progresión aterosclerótica dando como resultado estenosis coronaria y angina de pecho estable, o estenosis arterial de las extremidades inferiores y claudicación;
- Estar presente como isquemia aguda en el corazón (síndromes coronarios agudos: angina de pecho inestable, infarto de miocardio), cerebro (accidente isquémico cerebral transitorio o accidente cerebrovascular) o extremidades (isquemia de extremidades aguda).

Los factores de riesgo tradicionales (véase la tabla 2) siguen siendo los marcadores más importantes de enfermedad arterial.

Tabla 2.

Factores de riesgo
Dislipidemia
Fumador actual
Diabetes
Hipertensión
Obesidad abdominal
Factores psicosociales

Las mutaciones del factor V de Leiden y G20210A de protrombina muestran asociaciones moderadas pero estadísticamente significativas con cardiopatía coronaria, accidente cerebrovascular y acontecimientos arteriales periféricos, especialmente en personas más jóvenes (menos de 55 años de edad) y en mujeres. La relación de G2010A de protrombina con trombosis arterial es muy moderada (OR de 1,32; IC del 95 % de 1,03-1,69) (Kim RJ. Am Heart J 2003; 146:948-957). La relación de la mutación del factor V de Leiden y los acontecimientos isquémicos arteriales también es moderada (OR de 1,21; IC del 95 % de 0,99-1,49), los pacientes <55 años de edad corrían un

riesgo mayor de acontecimiento isquémico arterial (OR de 1,37; IC del 95 % de 0,96-1,97) (Kim R.J. Am Heart J 2003; 146:948-957).

5 Hay pocas evidencias de que otras trombofilias congénitas estén asociadas con riesgo aumentado de enfermedad arterial.

Necesidad de nuevos factores de riesgo

10 A pesar de la existencia anteriormente mencionada de factores de riesgo y de herramientas diagnósticas para el diagnóstico temprano, la trombosis arterial y la tromboembolia venosa, incluyendo trombosis venosa profunda y embolia pulmonar, son causas principales de morbimortalidad.

15 Incluso entre grupos de alto riesgo no es posible identificar individuos que llegarán a desarrollar trombosis y/o tromboembolia venosa. Por tanto, aunque existen varias estrategias tanto para precisar la identificación del riesgo de desarrollar un acontecimiento tromboembólico, para su prevención como para el diagnóstico preciso de una enfermedad tromboembólica, aún no se ha logrado el objetivo de evitar la carga clínica de trombosis y/o tromboembolia (Ruppert A. Current Medical Research & Opinion 2010; 26:2465-2473).

20 Se han realizado varios intentos para usar diagnósticos moleculares para identificar sujetos con riesgo alto de desarrollar un acontecimiento trombótico y/o tromboembólico. Partiendo del hallazgo de una mutación de cambio de sentido común en el gen de factor V por Bertina (Bertina RM. Nature 1994; 369:64-67), la descripción de la variante de secuencia no codificante en 3' de 20210 de protrombina (Poort SR. Blood 1996; 88:3698-3703) y la variante de 5,10-metilen-tetrahidrofolato reductasa C677T termolábil. También hay un documento de patente tal como el documento EPO0696325B1 que describe el uso de mutaciones en factores de coagulación. El documento EPO0696325B1 describe el uso de mutaciones en el factor V para identificar personas en riesgo de desarrollar un acontecimiento trombótico. O el documento de patente WO05047533A1 que describe un método para detectar la presencia o ausencia de un nucleótido variante en al menos dos sitios de SNP asociados con trombosis, seleccionándose dichos sitios de SNP a partir del grupo que consiste en G1691A de factor V de Leiden, G20210A de protrombina (factor II), C677T de MTHFR, A1298C de MTHFR, G4377T de factor XIII y C536T de inhibidores plasmáticos de factor tisular (TFPI). Pueden encontrarse divulgaciones adicionales de grupos de marcadores asociados con enfermedad o acontecimientos tromboembólicos en los documentos US2007/054275A1, WO2008020090A1, US2005/026168A1 y EP1398388A2.

35 Sin embargo, ninguno de los intentos intentados hasta ahora han demostrado eficacia satisfactoria y el entusiasmo inicial para la adopción de pruebas necesitará moderarse por evidencias formales del beneficio clínico que se derive de la prueba.

40 Por consiguiente, hay una necesidad de marcadores nuevos, incluyendo marcadores genéticos nuevos y combinaciones específicas de los mismos, que predigan de manera satisfactoria y ventajosa quién corre un riesgo alto de desarrollar una enfermedad tromboembólica y/o complicaciones de enfermedad tromboembólica tales como (pero sin limitarse a) trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (infarto de miocardio agudo, angina de pecho inestable), accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio o accidente cerebrovascular de manera que puedan implementarse medidas preventivas para mantener ese riesgo al nivel más bajo posible.

45 También hay una necesidad de marcadores nuevos, incluyendo marcadores genéticos nuevos y combinaciones específicas de los mismos, que ayuden de manera satisfactoria y ventajosa al diagnóstico de un enfermedad tromboembólica y/o complicaciones de enfermedad tromboembólica tales como (pero sin limitarse a) trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, síndromes coronarios agudos (infarto de miocardio agudo, angina de pecho inestable), accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio o accidente cerebrovascular de manera que puedan implementarse medidas preventivas para mantener ese riesgo en el nivel más bajo posible.

### Sumario de la invención

55 La presente invención se refiere a un kit que comprende reactivos para detectar la identidad de todos los siguientes nucleótidos: Arg67Stop de serpina A10 (inhibidor de proteína Z) (rs2232698), Ala384Ser de serpina C1 (antitrombina) (Cambridge II), C46T de factor XII (rs1801020), de Val34Leu factor XIII (rs5985), G20210A de factor II (protrombina) (rs1799963), Arg506Gln de factor V de Leiden (rs6025), Arg306Thr de factor V de Cambridge, Arg306Gly de factor V de Hong Kong, grupo sanguíneo ABO rs8176719, grupo sanguíneo ABO rs7853989, grupo sanguíneo ABO rs8176743 y grupo sanguíneo ABO rs8176750, en el que los reactivos son pares de cebadores específicos para la amplificación de dichas regiones.

65 En un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona un método que es adecuado para resolver las limitaciones de los métodos usados actualmente para estimar el riesgo de tromboembolia y/o para diagnosticar los acontecimientos tromboembólicos para un sujeto particular.

El método proporcionado según la presente divulgación resuelve las limitaciones que comprenden las etapas de determinar en una muestra aislada a partir de dicho sujeto la presencia de al menos una de las siguientes variantes genéticas: Arg67Stop de serpina A10 (inhibidor de la proteína Zr) (rs2232698), Ala384Ser de serpina C1 (antitrombina) (Cambridge II), C46T de factor XII (rs1801020), Val34Leu de factor XIII (rs5985), G20210A de factor II (protrombina) (rs1799963), Arg506Gln de factor V de Leiden (rs6025), Arg306Thr de factor V de Cambridge, Arg306Gly de factor V de Hong Kong, grupo sanguíneo ABO rs8176719, grupo sanguíneo ABO rs7853989, grupo sanguíneo ABO rs8176743 y grupo sanguíneo ABO rs8176750 que es indicativa del riesgo de padecer un acontecimiento tromboembólico (infarto de miocardio agudo mortal o no mortal, o accidente cerebrovascular, o accidente isquémico transitorio, o arteriopatía periférica o trombosis venosa profunda o embolia pulmonar) que es mejor que la valoración del riesgo realizada mediante los métodos actualmente en uso.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para establecer la probabilidad de que un individuo presente un acontecimiento tromboembólico basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación en uno o más factores de riesgo convencionales, en los que el riesgo viene dado.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para establecer la probabilidad de que un individuo presente un acontecimiento tromboembólico recurrente basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que el riesgo viene dado.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para la asistencia al diagnóstico de un acontecimiento tromboembólico basándose en la presencia de una o más de las variantes genéticas mencionadas anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que la probabilidad para el diagnóstico viene dada.

En otro aspecto, la invención se refiere a métodos para establecer la necesidad de medidas preventivas para prevenir el desarrollo de un acontecimiento tromboembólico basándose en la presencia de uno o más de los polimorfismos mencionados anteriormente en combinación con uno o más factores de riesgo convencionales, características sociodemográficas y clínicas, en los que el riesgo viene dado.

“Acontecimiento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como la alteración de la hemostasia que conduce al desarrollo de un coágulo sanguíneo (trombo) en el interior de un vaso vascular (arteria o vena). El trombo puede incluso obstruir el vaso vascular completamente y/o llegar a desprenderse y obstruir otro vaso vascular.

“Acontecimiento tromboembólico” incluye entre otros los siguientes estados: trombosis arterial, infarto de miocardio mortal y no mortal, accidente cerebrovascular, accidentes isquémicos transitorios, trombosis venosa cerebral, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda y embolia pulmonar.

“Acontecimiento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa de forma intercambiable con “tromboembolia”.

“Acontecimiento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa de forma intercambiable con “trombosis”.

“Acontecimiento tromboembólico” en el contexto de esta solicitud se usa de forma intercambiable con “complicación tromboembólica”.

“Trombofilia” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como los trastornos de hemostasia que predisponen a trombosis. Se incluyen deficiencias hereditarias de los anticoagulantes naturales antitrombina, proteína C y proteína S y mutaciones comunes en los genes que codifican para factores de coagulación y trombofilias adquiridas tales como anticuerpos antifosfolípidos.

Los términos “enfermedad” y “trastorno” deben interpretarse en el contexto de esta solicitud de forma intercambiable.

“Mutación” en el contexto de esta solicitud debe entenderse como el cambio de la estructura de un gen, dando como resultado una forma variante que puede transmitirse a las generaciones posteriores, provocada por la alteración de unidades de bases individuales en el ADN, o la delección, inserción o reordenamiento de secciones más grandes de genes o cromosomas.

“Variantes genéticas” en el contexto de esta solicitud se refiere a diferencias genéticas tanto dentro de cómo entre poblaciones. Puede haber múltiples variantes de cualquier gen dado en la población humana (alelos), que conducen al polimorfismo.

Los términos “polimorfismo” y “polimorfismo de un único nucleótido” (SNP) se usan en el presente documento de forma intercambiable y se refieren a una variación de secuencia de nucleótidos que se produce cuando un único nucleótido en el genoma u otra secuencia compartida difiere entre miembros de especies o entre cromosomas

emparejados en un individuo. Un SNP también puede designarse como una mutación con frecuencia de alelos baja mayor de aproximadamente el 1 % en una población definida. Los polimorfismos de un único nucleótido según la presente solicitud pueden encontrarse dentro de secuencias codificantes de genes, regiones no codificantes de genes o en las regiones intrónicas entre genes.

El término “muestra”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra de una fuente biológica e incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos, material de biopsia obtenido a partir de un mamífero o extractos del mismo, y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros líquidos corporales o extractos de los mismos.

“Factores de riesgo convencionales” en el contexto de esta solicitud deben entenderse como los descritos en las tablas 1 y 2.

“Características sociodemográficas y clínicas” en el contexto de esta solicitud deben entenderse como edad, sexo, diabetes mellitus, tabaquismo, antecedentes familiares de acontecimiento tromboembólico, embarazo e índice de masa corporal.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un programa informático o a un medio legible por ordenador que contiene medios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

**Descripción detallada de la invención**

Los autores de la presente invención han resuelto los problemas identificados anteriormente en los métodos en uso actualmente para el cálculo del riesgo en un sujeto de desarrollar un acontecimiento tromboembólico, según se ha definido este término anteriormente.

Los autores de la presente invención han identificado una serie de variantes genéticas que están asociadas con un riesgo de presentar un acontecimiento tromboembólico. Estas variantes genéticas muestran valor predictivo y diagnóstico.

Método para resolver las limitaciones de los métodos para la predicción del riesgo de desarrollar un acontecimiento tromboembólico o para el diagnóstico de un acontecimiento tromboembólico.

La presente solicitud resuelve la limitación anteriormente descrita de los métodos usados actualmente para calcular el riesgo de acontecimiento tromboembólico y/o para diagnosticar un acontecimiento tromboembólico. Se usa, se selecciona y se evalúa una combinación particular (según se describió anteriormente) de marcadores genéticos por los inventores después de un análisis genuino y complejo de miles de posibles marcadores. De las diferentes posibilidades para construir una puntuación de riesgo genético (GRS), los inventores han seleccionado una en particular porque proporcionó los mejores resultados posibles. Para calcular la puntuación de riesgo genético, se considera el número acumulado de riesgo de alelos de riesgo de los SNP enumerados en la tabla 3 que están presentes en cada individuo. Para cada una de las variantes estudiadas, cada individuo puede tener 0, 1 o 2 alelos de riesgo. Habiendo calculado el sumatorio de alelos de riesgo acumulados en los diferentes conjuntos de variantes seleccionadas ( $n = 12$ ), para cada individuo se dio una puntuación que podía variar entre 0 y 24. Los inventores han generado nuevos algoritmos para la estimación del riesgo tromboembólico.

Tabla 3.

Gen	SNP (nombre provisional)	ID de referencia de la variante	rs	Alelo informativo	Otro alelo
FXII	46C>T	FXII, 46C>T	1801020	T	C
grupo sanguíneo ABO (alelo 1)	261delG	Grupo sanguíneo ABO	8176719	G	delG
	526C>G	Grupo sanguíneo ABO	7853989	C	G
	703G>A	Grupo sanguíneo ABO	8176743	G	A
	1059delC	Grupo sanguíneo ABO	8176750	C	delC
SERPINA A10	728C>T	Serpina A10, Arg67Stop	2232698	T	C
SERPINA C1	Serpina C1, Ala384Ser (Cambridge II)	Serpina C1, Ala384Ser (Cambridge II)	--	T	G
Factor de coagulación FV	FV de Leiden (1746G>A)	FV, R506Q (F5 de Leiden)	6025	A	G

	FV de Cambridge (1146G>C)	FV, R306T (F5 de Cambridge)	--	C	G
	FV de Hong Kong (1145A>G)	FV, R306G (F5 de Hong Kong)	--	G	A
Factor de coagulación XIII (polipéptido A1)	V34L (226G>T)	FXIII, Val34Leu, rs	5985	G	T
Factor de coagulación II	G20210A	Protrombina, G20210A	1799963	A	G

La lista de polimorfismos que se usan en este método de la presente invención se da en la tabla 3.

5 Cuando se usan los modelos de predicción, como por ejemplo, para realizar decisiones de tratamiento, los riesgos predictivos pueden categorizarse usando umbrales de corte de riesgo.

10 Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que el análisis de los nucleótidos presentes según el método de la invención en el ácido nucleico de un individuo puede realizarse mediante cualquier método o técnica capaz de determinar nucleótidos presentes en un sitio polimórfico. Como resulta evidente en la técnica, los nucleótidos presentes en los marcadores polimórficos pueden determinarse a partir de cualquier cadena de ácido nucleico o a partir de ambas cadenas.

15 Una vez que se ha obtenido una muestra biológica de un sujeto (por ejemplo, un líquido corporal, tal como orina, saliva, plasma, suero, o una muestra tisular, tal como una muestra tisular bucal o una célula bucal) se emprende normalmente la detección de una variación de secuencia o SNP de variante alélica. Se puede emplear prácticamente cualquier método conocido por el experto en la técnica. Quizá el método más directo es determinar realmente la secuencia o bien de ADN genómico o bien de ADNc y comparar estas secuencias con los SNP de alelos conocidos del gen. Esto puede ser un procedimiento bastante caro y prolongado. Sin embargo, esta tecnología es bastante común y se conoce bien.

20 Puede usarse cualquiera de una variedad de métodos que existen para detectar variaciones de secuencia en los métodos de la invención. El método particular usado no es importante en la estimación del riesgo cardiovascular o en la selección del tratamiento.

25 Existen otros métodos disponibles comercialmente para la identificación de SNP de alto rendimiento que no usan tecnologías de secuenciación directa, por ejemplo, tecnología Veracode de Illumina, química de genotipado de SNP Taqman® y química de genotipado de SNP KASPar.

30 Una variación en el método de determinación de secuencia directo es el método de Gene Chip™ disponible de Affymetrix. Alternativamente, también están disponibles comercialmente maneras robustas y más económicas de detectar variación de secuencia de ADN. Por ejemplo, Perkin Elmer adaptó su ensayo TAQman™ para detectar variación de secuencia. Orchid BioSciences tiene un método denominado SNP-IT™ (tecnología de identificación de SNP) que usa la extensión de cebadores con análogos de nucleótidos marcados para determinar qué nucleótidos se producen en la posición inmediatamente en 3' de una sonda oligonucleotídica, después se identifica la base prolongada usando fluorescencia directa, un ensayo colorimétrico indirecto, espectrometría de masas o polarización de fluorescencia. Sequenom usa una tecnología de captura de hibridación más MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo) para detectar genotipos de SNP con su sistema MassARRAY™. Promega proporciona el sistema de SNP/genotipado READIT™ (patente estadounidense n.º 6.159.693). En este método, se hibridan sondas de ADN o de ARN a secuencias de ácido nucleico objetivo. Las sondas que son complementarias a la secuencia objetivo en cada base se despolimerizan con una mezcla patentada de enzimas, mientras que las sondas que difieren del objetivo en la posición de consulta permanecen intactas. El método usa química de pirofosforilación en combinación con detección de luciferasa para proporcionar un sistema de puntuación de SNP altamente sensible y adaptable. Third Wave Technologies tiene el método Invader OS™ que usa enzimas de escisión patentadas, que reconocen y cortan sólo la estructura específica formada durante el procedimiento de Invader. Invader OS se basa en la amplificación lineal de la señal generada por el procedimiento de Invader, más que en la amplificación exponencial del objetivo. El ensayo de Invader OS no utiliza PCR en ninguna parte del ensayo. Además, hay varios laboratorios de pruebas de ADN forenses y muchos laboratorios de investigación que usan PCR específica de genes, seguida por digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel (u otra técnica de separación por tamaños) para detectar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).

55 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia de los SNP se identifica amplificando o no logrando amplificar un producto de amplificación a partir de la muestra. Las amplificaciones polinucleotídicas son normalmente dependientes de molde. Tales amplificaciones se basan generalmente en la existencia de una cadena de molde para hacer copias adicionales del molde. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos que son capaces de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un procedimiento dependiente de molde, que se hibrida con la cadena de molde. Normalmente, los cebadores tienen de diez a treinta pares de bases

de longitud, pero pueden emplearse secuencias más largas. Pueden proporcionarse cebadores en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere generalmente la forma monocatenaria. A menudo, se diseñan pares de cebadores para hibridarse selectivamente con regiones diferenciadas de un ácido nucleico de molde y se ponen en contacto con el ADN de molde en condiciones que permiten la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, pueden seleccionarse condiciones de hibridación de alta rigurosidad que sólo permitirán la hibridación con secuencias que sean completamente complementarias a los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación puede tener lugar con rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contienen uno o más apareamientos erróneos con las secuencias de los cebadores. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos", hasta que se produzca una cantidad suficiente de producto de amplificación.

#### Reacción en cadena de la polimerasa

Están disponibles varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias oligonucleotídicas presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa. En la PCR, se usan pares de cebadores que se hibridan selectivamente con ácidos nucleicos en condiciones que permiten la hibridación selectiva. El término "cebador", como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que es capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un procedimiento dependiente de molde. Pueden proporcionarse cebadores en forma bicatenaria y/o monocatenaria, aunque se prefiere generalmente la forma monocatenaria. Los cebadores se usan en uno cualquiera de varios procedimientos dependientes de molde para amplificar las secuencias de gen objetivo presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la PCR, que se describe en detalle en las patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159. En la PCR, se preparan dos secuencias de cebadores que son complementarias a regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia de gen(es) objetivo. Los cebadores se hibridarán para formar un complejo ácido nucleico:cebador si la secuencia de gen(es) objetivo está presente en una muestra. Se añade a la mezcla de reacción un exceso de desoxirribonucleósido trifosfatos junto con una ADN polimerasa, por ejemplo polimerasa de Taq que facilita síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Si se ha formado el complejo de secuencia de gen(es) objetivo:cebador, la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia de gen(es) objetivo añadiendo nucleótidos. Aumentando y disminuyendo la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del/de los gen(es) objetivo para formar los productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al/a los gen(es) objetivo y a los productos de reacción y el procedimiento se repetirá. Estas múltiples rondas de amplificación, denominadas "ciclos", se llevan a cabo hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación se puede digerir con una enzima de restricción antes del análisis. En aún otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la presencia o ausencia del SNP se identifica hibridando la muestra de ácido nucleico con un cebador marcado con un resto detectable. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el resto detectable se detecta en un ensayo enzimático, radioensayo, inmunoensayo o mediante detección de fluorescencia. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el cebador está marcado con un tinte detectable (por ejemplo, verde I de SYBR, YO-PRO-I, naranja de tiazol, Hex, verde pico, edans, fluoresceína, FAM o TET). En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores están localizados en un chip. En otras realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, los cebadores para amplificación son específicos para dichos SNP.

Otro método para amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"). La LCR difiere de PCR debido a que amplifica la molécula de sonda en lugar de producir un amplicón a través de polimerización de nucleótidos. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias y, en presencia de una secuencia objetivo, cada par se unirá a cadenas complementarias opuestas del objetivo de tal forma que hacen tope entre sí. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se unirán para formar una única unidad. Mediante la realización de un ciclo de temperaturas, como en PCR, las unidades ligadas unidas se disocian del objetivo y después sirven como "secuencias objetivo" para la ligación de pares de sondas en exceso. La patente estadounidense n.º 4.883.750 describe un método similar a la LCR para unir pares de sondas a una secuencia objetivo.

#### Amplificación isotérmica

Un método de amplificación isotérmica, en el que se usan endonucleasas de restricción y ligasas para lograr la amplificación de moléculas objetivo que contienen nucleótido 5'-[[alfa]-tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción también puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención. En una realización, se usa el método de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la tipificación de polimorfismos de un único nucleótido (SNP).

#### Amplificación por desplazamiento de cadena

La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es otro método de llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples rondas de desplazamiento de cadena y síntesis, es decir, traslado de mella.

Un método similar, denominado reacción de reparación de cadena (RCR), implica hibridar varias sondas a lo largo de una región seleccionada como objetivo para amplificación, seguido por una reacción de reparación en la que sólo dos de las cuatro bases están presentes. Las otras dos bases se pueden añadir como derivados biotinilados para detección fácil.

5 Amplificación basada en transcripción

10 Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen sistemas de amplificación basados en transcripción, incluyendo amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos. En la amplificación basada en

15 secuencias de ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos se preparan para la amplificación por extracción con fenol/cloroformo convencional, desnaturalización por calor de una muestra clínica, tratamiento con tampón de lisis y columnas Minispin para aislamiento de ADN y ARN o extracción con cloruro de guanidinio de ARN. Estas técnicas de amplificación implican hibridar un cebador, que tiene secuencias objetivo específicas. Tras la polimerización, los híbridos de ADN/ARN se digieren con ARNasa H mientras que las moléculas de ADN bicatenarias se desnaturalizan de nuevo por calor. En cualquier caso el ADN monocatenario se vuelve totalmente bicatenario por adición de un segundo cebador específico de objetivo, seguido por polimerización. Después se transcriben las moléculas de ADN bicatenario de forma múltiple por una polimerasa tal como T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los ARN se someten a transcripción inversa para dar ADN bicatenario y se transcriben una vez más con una polimerasa tal como T7 o SP6. Los productos resultantes, tanto si están truncados como si están completos, indican secuencias específicas de objetivo.

20 Se pueden usar otros métodos de amplificación según la presente invención. En una realización, se usan cebadores "modificados" en una síntesis similar a PCR, dependiente de molde y de enzima. Los cebadores se pueden modificar marcando con un resto de captura (por ejemplo, biotina) y/o un resto de detector (por ejemplo, enzima). En presencia de una secuencia objetivo, la sonda se une y se escinde catalíticamente. Después de la escisión, la secuencia objetivo se libera intacta para unirse a sonda en exceso. La escisión de la sonda marcada señala la presencia de la secuencia objetivo. En otro enfoque, un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos implica sintetizar cíclicamente ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc), que pueden usarse según la presente invención. El ARNmc es un primer molde para un primer oligonucleótido cebador, que se alarga mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN). Después se retira el ARN del dúplex de ADN:ARN resultante mediante la acción de ribonucleasa H (ARNasa H, una ARNasa específica para ARN en dúplex o bien con ADN o bien con ARN). El ADNmc resultante es un segundo molde para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de ARN polimerasa (mostrada a modo de ejemplo por ARN polimerasa T7) en 5' con respecto a su homología de molde. Después se extiende este cebador por ADN polimerasa (mostrada a modo de ejemplo por el fragmento de "Klenow" grande de ADN polimerasa I de *E. coli*), dando como resultado una molécula de ADN bicatenario ("ADNbc"), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora se puede usar por la ARN polimerasa adecuada para hacer muchas copias de ARN a partir del ADN. Después, estas copias pueden volver a entrar en el ciclo conduciendo a amplificación muy rápida. Con la elección apropiada de las enzimas, esta amplificación puede realizarse de manera isotérmica sin adición de enzimas a cada ciclo. Debido a la naturaleza cíclica de este procedimiento, la secuencia de partida puede elegirse para estar en forma o bien de ADN o bien de ARN.

#### 45 Métodos para la separación de ácidos nucleicos

Puede ser deseable separar los productos de ácidos nucleicos a partir de otros materiales, tales como molde y cebador en exceso. En una realización, los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel de agarosa, de agarosa-acrilamida o de poli(acrilamida) usando procedimientos convencionales (Sambrook *et al.*, 1989, véase más adelante). Los productos de amplificación separados pueden cortarse y eluirse del gel para manipulación adicional. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, la banda separada puede retirarse calentando el gel, seguido de la extracción del ácido nucleico. La separación de ácidos nucleicos también puede realizarse mediante técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchas clases de cromatografía que se pueden usar en la práctica de la presente invención, incluyendo cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de hidroxapatita, de tamiz molecular, de fase inversa, en columna, en papel, en capa fina y de gases así como HPLC. En determinadas realizaciones, los productos de amplificación se visualizan. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de bandas con luz UV. Alternativamente, si los productos de amplificación están marcados íntegramente con radionucleótidos o nucleótidos marcados fluorométricamente, los productos de amplificación separados pueden exponerse a película de rayos X o visualizarse con luz mostrando los espectros de excitación apropiados.

60 Alternativamente, la presencia de las posiciones polimórficas según los métodos de la invención puede determinarse por la hibridación o por la ausencia de hibridación con una sonda de ácido nucleico adecuada específica para un ácido nucleico polimórfico pero no con el ácido nucleico no mutado.

65 Por "hibridar" se quiere decir que un par forma una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias, o partes de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. Por ejemplo, una concentración

de sal rigurosa será normalmente de menos de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato de trisodio 75 mM, preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato de trisodio 50 mM y más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato de trisodio 25 mM. La hibridación de baja rigurosidad se puede obtener en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de alta rigurosidad se puede obtener en presencia de formamida a al menos aproximadamente el 35 % y más preferiblemente formamida a al menos aproximadamente el 50 %. Las condiciones de temperatura rigurosas incluyen normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37 °C y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C. Parámetros adicionales variables, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador, los conocen bien los expertos en la técnica. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según se necesite. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM y SDS al 1 %. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato de trisodio 50 mM, SDS al 1 %, formamida al 35 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNes) 100 [mu]g/ml. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1 %, formamida al 50 % y ADNes 200 [mu]g/ml. Variaciones útiles en estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en cuanto a la rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado se pueden definir por concentración de sal y por temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado se puede aumentar disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato de trisodio 3 mM y lo más preferiblemente menos de aproximadamente NaCl 15 mM citrato de trisodio 1,5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán habitualmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42 °C e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68 °C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM y SDS al 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM NaCl, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1 %. Variaciones adicionales en estas condiciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Las técnicas de hibridación las conocen bien los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science* 196: 180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel *et al.* (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989.

Las moléculas de ácidos nucleicos útiles para hibridación en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que muestra identidad sustancial para ser capaz de hibridarse específicamente con los ácidos nucleicos objetivo. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Por "sustancialmente idéntica" se quiere decir una molécula polipeptídica o de ácido nucleico que presenta al menos el 50 % de identidad con una secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico de referencia. Preferiblemente, una secuencia tal es idéntica a al menos el 60 %, más preferiblemente el 80 % o el 85 % y más preferiblemente el 90 %, el 95 % o incluso el 99 % a nivel de aminoácidos o ácido nucleico a la secuencia usada para comparación. La identidad de secuencia se mide normalmente usando software de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Tal software hace coincidir secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque a modo de ejemplo para determinar el grado de identidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad de entre  $e^{-3}$  y  $e^{-100}$  indicando una secuencia estrechamente relacionada.

Se puede usar un sistema de detección para medir la ausencia, presencia y cantidad de hibridación para todas las secuencias distintas simultáneamente. Preferiblemente, se usa un dispositivo de exploración para determinar los niveles y patrones de fluorescencia.

Otro método para detectar variaciones de secuencia se basa en la amplificación mediante PCR de objetivos humanos específicos y la detección subsiguiente de su genotipo mediante hibridación a sondas Hairloop™ específicas visualizadas en una micromatriz.

HairLoop™ es una molécula de ADN monocatenario, de tallo-bucle, que consiste en una secuencia de sonda incluida entre secuencias complementarias que forman un tallo en horquilla. El tallo está unido a la superficie de la micromatriz solamente por una de sus cadenas. En ausencia de un objetivo de ADN, el HairLoop™ se mantiene en el estado cerrado (figura 1a). Cuando el objetivo se une perfectamente (sin apareamiento erróneo) a su HairLoop™,



la mayor estabilidad del dúplex sonda-objetivo fuerza al tallo a desenrollarse, dando como resultado una apertura del HairLoop™ (figura 1b). Debido a estas propiedades estructurales y termodinámicas únicas, HairLoop™ ofrece varias ventajas con respecto a sondas lineales, una de las cuales es su especificidad aumentada que distingue entre dos secuencias objetivo de ADN que difieren en tan sólo un único nucleótido.

- 5 HairLoop™ actúa como interruptores que normalmente están cerrados o “desactivados”. La unión al objetivo de ADN fluorescente induce cambios conformacionales que abren la estructura y como resultado, después de lavar, la fluorescencia está visible o “activada”.
- 10 Un HairLoop™ se diseña para ser específico a un alelo dado. Por tanto, la valoración de una mutación puntual para un marcador bialélico requiere dos HairLoop™; uno para el alelo de tipo natural y uno para el alelo mutante. Las secuencias específicas para la detección de los polimorfismos descritos en la tabla 3 usando la tecnología de HairLoop se dan en la tabla 4.

Tabla 4.

SEQ ID NO:	Nombre de variante	Secuencia que comprende el polimorfismo	Alelo	Número de registro de dbSNP	Crom.	Posición en crom.	Cadena
1	FXII, 46 C>T	GGACGGATGCCATGA	Riesgo	rs1801020	5	176836532	+
2		GGACGGACGCCATGA	Sin riesgo				
3	ABO, 261delG	CTCGTGGTGACCCCT	Riesgo	rs8176719	9	136132908	-
4		CTCGTGGT_ACCCCCT	Sin riesgo				
5	ABO, 526C>G	GGAGGTGCGGCCCT	Riesgo	rs7853989	9	136131592	+
6		GGAGGTGGCGCCT	Sin riesgo				
7	ABO, 703G>A	TGCACCCCGGCTTCTAC	Riesgo	rs8176743	9	136131415	+
8		TGCACCCAGCTTCTAC	Sin riesgo				
9	ABO, 1059delC	TCCGGAAACCCGTGAGC	Riesgo	rs8176750	9	136131059	+
10		TCCGGAA_CCGTGAGCG	Sin riesgo				
11	SERPINA A10, 728 C>T	CCTGCTGTGAAAGATCT	Riesgo	rs2232698	14	9475669	+
12		CCTGCTGCGAAAGATCT	Sin riesgo				
13	SERPINA C1, Ala384Ser (Cambridge II)	CGGTACTTGAAGCTGCTT	Riesgo	NA	1	173873176	-
14		CGGTACTTGCAGCTGCTT	Sin riesgo				
15	F V, R506Q (FV de Leiden)FV,	ATTCCCTGCCCCTGCTCC	Riesgo	rs6025	1	169519049	-
16		ATTCCCTGCCCTGCTCC	Sin riesgo				
17	FV, R306T (FV de Cambridge)	GAAAACCCAGGAATCTTAAG	Riesgo	NA	1	169524537	+
18		GAAAACCCAGGAATCTTAAG	Sin riesgo				
19	FV, R306G (FV de Hong Kong)	AAGAAAACCCGGGAATCTTA	Riesgo	NA	1	169524536	+
20		AAGAAAACCCAGGAATC TTA	Sin riesgo				
21	FXIII, Val34Leu	GGGCACCAAGCCCTGA	Riesgo	rs5985	6	6318795	-
22		GGGCACCAAGCCCTGA	Sin riesgo				
23	Protrombina, G20210A	TCTCAGCAAGCCCTCAAT	Riesgo	rs1799963	11	46761055	+
24		TCTCAGCAGCCCTCAAT	Sin riesgo				

Método para establecer el estado de riesgo de una manera más apropiada.

Otro objeto de la presente invención es el desarrollo de un algoritmo para estimar el riesgo de desarrollar y/o de estar padeciendo un acontecimiento tromboembólico. El algoritmo se muestra como funciones 1.

5 Función 1

Estimando el riesgo de trombosis.

10 La estimación individual del riesgo de trombosis se basada en un modelo de regresión logística. El objetivo de este modelo es calcular la probabilidad que tiene una persona de presentar trombosis venosa según sus características genéticas, sociodemográficas y clínicas. Para calcular esta probabilidad se usa la siguiente ecuación:

15 Probabilidad ( $Y = 1 \mid x_1, \dots, x_n$ ) =  $1 / (1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n X_n + \beta_{f,g} X_f \cdot X_g + \dots + \beta_{h,i} X_h \cdot X_i))$ ,  
en la que:

- Probabilidad ( $Y = 1 \mid x_1, \dots, x_n$ ) = probabilidad de presentar un trombosis en un individuo particular con características concretas y medibles en varias variables 1, ..., n. Esta probabilidad puede oscilar entre 0 y 1;

20 - Exp = base natural exponencial;

-  $\beta_0$  = coeficiente que define el riesgo (la probabilidad) de trombosis non relacionada con las variables 1 a n. Este coeficiente puede adoptar un valor de desde  $-\infty$  hasta  $+\infty$  y se calcula como el logaritmo natural de la incidencia de trombosis venosa en la población;

25 -  $\beta_1$  = coeficiente de regresión que expresa el riesgo de (más alto o más bajo) de presentar trombosis asociado con el valor/la presencia de la variable predictora  $x_1$ . Este coeficiente puede adoptar un valor de desde  $-\infty$  hasta  $+\infty$ ;

30 -  $x_1$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_1$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable;

-  $\beta_n$  = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (más alto o más bajo) de presentar trombosis asociado con el valor/la presencia de la variable predictora  $x_n$ . Este coeficiente puede adoptar un valor de desde  $-\infty$  hasta  $+\infty$ ;

35 -  $x_n$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_n$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable.

40 Además, el modelo incluye el efecto de la combinación de algunas variables en cuanto a interacción o modificación del efecto. Es decir, el tamaño del efecto (coeficiente de regresión) de una única variable ( $x_f$ ) puede ser  $\beta_f$ , pero si esta variable está presente en combinación con otra variable ( $x_g$ ) el tamaño del efecto puede variar (aumentar o disminuir) y por tanto para considerar el tamaño del efecto de la variable  $x_f$  habrá que considerar no sólo  $\beta_f$  sino también un segundo coeficiente de regresión  $\beta_{f,g}$  sumando  $\beta_f$  y  $\beta_{f,g}$ . Por tanto:

45  $\beta_{f,g}$  = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (más alto o más bajo) de presentar trombosis asociado con la presencia combinada de las variables predictoras  $x_f$  y  $x_g$ . Este coeficiente puede adoptar un valor de desde  $-\infty$  hasta  $+\infty$ ;

50 -  $x_f$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_f$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable;

-  $x_g$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_g$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable;

55 -  $\beta_{h,i}$  = coeficiente de regresión que expresa el riesgo (más alto o más bajo) de presentar trombosis asociado con la presencia combinada de las variables predictoras  $x_h$  y  $x_i$ . Este coeficiente puede adoptar un valor de desde  $-\infty$  hasta  $+\infty$ ;

60 -  $x_h$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_h$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable;

-  $x_i$  = valor adoptado por la variable predictora  $x_i$  en un individuo. El intervalo de valores posibles depende de la variable.

65 Si el paciente no presenta ninguna mutación o variante genética de riesgo pero presenta unos antecedentes familiares positivos de trombosis venosa se incluirá esta variable en el modelo. El coeficiente de regresión de esta

variable es de 1,185 con un intervalo de valores posibles de desde 0,200 hasta 2,500.

Las variables incluidas en el modelo y los coeficientes de regresión de cada una de estas variables se muestran en la tabla 5.

5

Tabla 5.

Variable	Exposición de riesgo	Coefficiente de regresión	Límite inferior del coeficiente de regresión	Límite superior del coeficiente de regresión
<b>Clínica</b>				
Edad <55 años	No	0		
55-64	Sí	0,811	0,100	3,000
65-74	Sí	1,409		
75-84	Sí	1,681		
>84	Sí	2,534		
Hombre	Sí	0,336		
Diabetes	Sí	0,351		
Fumador	Sí	0,166		
Índice de masa corporal <25 kg/m <sup>2</sup>	No	0	0	0
25-29,9 kg/m <sup>2</sup>	Sí	0,412	0,050	1,500
≥30 kg/m <sup>2</sup>	Sí	0,820	0,100	3,000
Uso de anticonceptivos orales	Sí	1,131	0,100	3,000
Embarazo	Sí	1,435	0,100	3,000
Antecedentes familiares de trombosis*	Sí	1,185	0,100	3,000
<b>Genética</b>				
Heterocigoto para el factor V de Leiden	AG	0,993	0,100	3,000
Homocigoto para el factor V de Leiden	AA	2,890	0,500	6,000
Protrombina	AG	0,293	0,050	1,500
Serpina 10	TG	1,358	0,100	3,000
Factor XII	TC/TT	1,633	0,100	3,000
Factor XIII	GT/GG	0,198	0,050	1,500
Serpina C	TG	2,277	0,500	6,000
ABO (alelo A1)	(véase la tabla 6)	0,956	0,100	3,000
<b>Interacciones</b>				
Factor V de Leiden · Protrombina	AG · AG	1,114	0,100	3,000
Factor V de Leiden · ABO	AG (véase la tabla 6)	0,599	0,100	3,000
Factor V de Leiden · Anticonceptivos orales	AG · Sí	0,028	0,005	1,000
Factor V de Leiden · Embarazo	AG · Sí	1,191	0,100	3,000
Protrombina · Anticonceptivos orales	AG · Sí	0,542	0,100	3,000
Protrombina · Embarazo	AG · Sí	1,673	0,100	3,000
Protrombina · IMC ≥30 kg/m <sup>2</sup>	AG · Sí	0,772	0,100	3,000
Anticonceptivos orales · IMC ≥30 kg/m <sup>2</sup>	Sí · Sí	1,218	0,100	3,000

\* Incluido en el modelo sólo si el paciente no presenta ninguna mutación o variante genética de riesgo pero presenta unos antecedentes familiares positivos de trombosis venosa.

10

Tabla 6. Definición de alelo A1

El sujeto porta al menos un alelo A1 en el locus ABO si está presente alguna de las siguientes combinaciones:

Combinación	Genotipos			
	rs8176719	rs7853989	rs8176743	rs8176750
1	GG	CC	GG	CC
2	GG	CC	GG	CdelC
3	GG	CG	GA	CG
4	GdelG	CC	GG	CG
5	GG	CG	GG	CC

5 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la presente invención y expuestos en la tabla 3 y usando la función descrita en la función 1 han demostrado ser capaces de establecer el riesgo de desarrollar una enfermedad o acontecimiento tromboembólico con una exactitud más alta que la obtenida usando los métodos actualmente en uso o las funciones publicadas incluyendo información genética.

10 Sorprendentemente, la combinación de marcadores de SNP incluidos en la en la presente invención y expuestos en la tabla 3 y usando la función descrita en la función 1 han demostrado ser capaces de ayudar en el diagnóstico de una enfermedad o acontecimiento tromboembólico con una exactitud más alta que la obtenida usando los métodos actualmente en uso o las funciones publicadas incluyendo información genética.

15 Por medio del uso de las funciones descritas, se obtiene un riesgo personalizado para el desarrollo de acontecimiento tromboembólico, en particular infarto de miocardio mortal y no mortal, accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio, arteriopatía periférica, trombosis venosa profunda, embolia pulmonar o una combinación de los mismos.

Ejemplo 1

20 **Introducción.** La enfermedad tromboembólica tiene un componente genético importante. Además de las clásicas FV de Leiden (FVL) y G20210A de protrombina (PT), se han identificado variantes genéticas nuevas asociadas con esta patología. El objetivo de este estudio fue determinar si un conjunto de variantes genéticas seleccionadas (perfil genético) mejora la capacidad de FVL y PT para predecir la presencia de trombosis.

25 **Métodos.** Se incluyen dos estudios (trombosis) y controles: MARTHA (1150 casos/801 controles) diseñado para evaluar la asociación de FVL y PT con otros factores de riesgo y un estudio en la población española: PE (249 casos/248 controles). El perfil genético analizado fue: FVL, PT, ABO, C46T (F12), A384S (SERPINA C1), R67X (SERPINA A10). La asociación entre variantes genéticas y trombosis se calculó usando la OR ajustada por edad y sexo. La capacidad predictiva se calculó usando la estadística c (AUC-ROC) y la reclasificación (NRI, IDI) observada cuando se usa el FVL, PT o cuando se usa el perfil genético.

**Resultados.**

35 **Tabla 7:** Asociación entre variantes y trombosis [OR (95 %)] y la proporción de portadores de FVL y PT en comparación con portadores del perfil genético (solo casos)

Tabla 7	FVL	PT	A1	C46T	A384	R67X
MARTHA	2,3 (1,8-2,8)	0,9 (0,7-1,1)	1,8 (1,2-2,7)	0,9 (0,6-1,4)	0,9 (0,2-3,7)	2,3 (1,2-4,6)
Casos	50,4		87,5			
PE	7,2 (2,8-18,9)	2,8 (1,2-6,8)	2,62 (1,8-3,8)	3,1 (1,1-8,8)	4,1 (0,5-36,9)	2,5 (0,8-8,1)
Casos	19,7		71,5			

40 **Tabla 8:** Estadigrafía c y reclasificación, NRI (mejora de reclasificación neta) e IDI (mejora de discriminación integrada) comparando el uso del perfil genético con FVL y PT.

Tabla 8	Estadigrafía c		NRI		IDI	
	MARTHA	PE	MARTHA	PE	MARTHA	PE
FVL + PT	0,54 (0,51-0,57)	0,58 (0,56-0,62)	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
FVL + PT + Resto	0,58 (0,55-0,61)	0,69 (0,64-0,73)	5,3 (-1,1-11,6)	23,4 (11,1-35,6)	1 (0,3-1,8)	5,9 (3,71-7,88)
Valor de p	<0,001	<0,001	>0,05	<0,001	<0,05	<0,001

**Discusión.** Se demuestra que el perfil genético seleccionado mejora significativamente la predicción del riesgo de

trombosis identificando un riesgo genético de presentar un acontecimiento tromboembólico en el 51,6 % de personas que tuvieron un acontecimiento tromboembólico y mediante el análisis de FVL y PT no corrían riesgo genético. El perfil genético en la práctica clínica mejorará el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la enfermedad tromboembólica.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Kit que comprende reactivos para detectar la identidad de los siguientes nucleótidos: Arg67Stop de serpina A10 (inhibidor de la proteína Z) (rs2232698), Ala384Ser de serpina C1 (antitrombina) (Cambridge II), C46T de factor XII (rs1801020), Val34Leu de factor XIII (rs5985), G20210A de factor II (protrombina) (rs1799963), Arg506Gln de factor V de Leiden (rs6025), Arg306Thr de factor V de Cambridge, Arg306Gly de factor V de Hong Kong, grupo sanguíneo ABO rs8176719, grupo sanguíneo ABO rs7853989, grupo sanguíneo ABO rs8176743 y grupo sanguíneo ABO rs8176750, en el que el kit comprende el par de cebadores específico para la amplificación de las regiones que comprenden al menos Arg67Stop de serpina A10 (inhibidor de la proteína Z) (rs2232698), Ala384Ser de serpina C1 (antitrombina) (Cambridge II), de C46T factor XII (rs1801020), Val34Leu de factor XIII (rs5985), G20210A de factor II (protrombina) (rs1799963), Arg506Gln factor V de Leiden (rs6025), Arg306Thr de factor V de Cambridge, Arg306Gly de factor V de Hong Kong, grupo sanguíneo ABO rs8176719, grupo sanguíneo ABO rs7853989, grupo sanguíneo ABO rs8176743 y grupo sanguíneo ABO rs8176750.
2. Kit según la reivindicación 1, en el que los pares de cebadores son específicos para la amplificación de una región que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 a 24.
3. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para usar en un método de evaluación de riesgo tromboembólico, en el que la presencia de uno o más de los SNP anteriores es indicativa de un riesgo de tener un acontecimiento tromboembólico.

Figura 1a

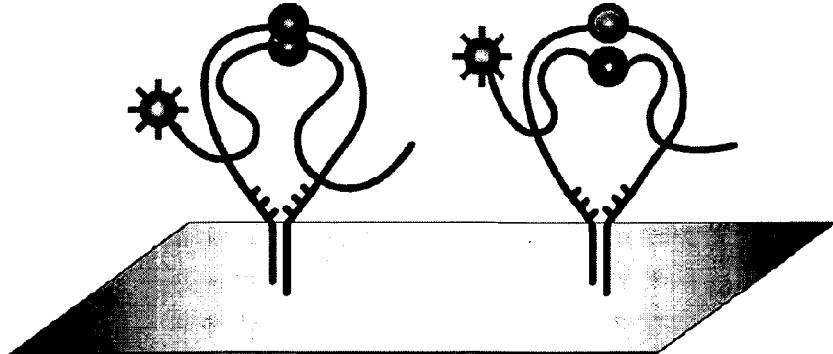


Figura 1b

