

HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU

DEPARTAMENT DE MEDICINA

FACULTAT DE MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA

**IMPLICACIÓN DEL TAFI Y EL POLIMORFISMO 46 C/T DEL GEN *F12*
EN LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA ARTERIAL.**

Tesis presentada por

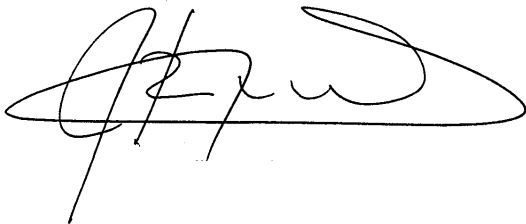
M^aAmparo Santamaría Ortiz

Para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Jordi Fontcuberta Boj, Cap de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosis, del Departament d'Hematologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

CERTIFICA

Que la tesi “*IMPLICACIÓN DEL TAFI Y EL POLIMORFISMO 46 C/T DEL GEN F12 EN LA ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA ARTERIAL*”
presentada per la Llicenciada en Medicina i Cirurgia, M^aAmparo Santamaría Ortiz per a accedir al grau de Doctor, ha estat realitzada sota la meva direcció i es troba en condicions d'ésser llegida.



Signat, Jordi Fontcuberta Boj

BARCELONA, a 18 d'abril de 2005.

A mi madre Amparo,

A mi padre Pepe,

A mis abuelos ,

A mis hermanos, Paloma, Pepito, Luis, y a mis sobrinos

por ser la mejor familia que se puede tener,

y estar siempre a mi lado, incluso en la distancia.

A Jordi Fontcuberta, por confiar en mi desde el principio y apoyarme profesionalmente incluso en los momentos difíciles. Es un gran maestro que reúne las cualidades necesarias para que nuestro grupo funcione. A nivel profesional no se puede tener mejor maestro, a nivel personal ni mejor apoyo. Es un privilegio trabajar con él.

A Miquel Rutllant, por acceder a tutelar esta tesis y por haber hecho posible el elevado nivel del Departamento que dirige. Por estar siempre dispuesto a ayudar y haberme apoyado en momentos difíciles.

A Jose Mateo, sin duda, el mejor compañero de trabajo que uno se puede encontrar en la vida. Uno de los mejores expertos en su campo, siempre dispuesto a ayudarte y a escucharte.

A Arturo Oliver, por haberme ayudado desde el principio tanto a nivel estadístico como a nivel personal.

A Isa Tirado, gran amiga y parte fundamental en el desarrollo de estos estudios, sin ella, no hubiera funcionado todo tan bien.

Al Profesor William H. Stone, una excelente persona, que me ha enseñado la pasión por el trabajo y la vida. Ser su amiga es uno de los mayores privilegios que se pueden tener.

A mis erres grandes y pequeñas entre ellos, “las hematolocas”, Charo López, Maricel Subirá, Rosa Manteiga, Luz Muñoz, Marina Carrasco, Clara Martínez.... Por haber hecho de mi residencia uno de los mejores periodos de mi vida y por haber mantenido nuestra amistad a través de los años. Juntas demostramos que la amistad, la cooperación en el trabajo, compartir conocimientos y estar unidas ante los problemas profesionales y personales en los duros momentos de la residencia y de la vida, son compatibles con ser buenas profesionales.

A Ana Sureda y Rodrigo Martino, ellos me enseñaron la capacidad de trabajo incansable, me introdujeron en el mundo de la investigación clínica con mis primeros trabajos publicados. Fueron sin duda, los mejores ejemplos a seguir durante mi residencia.

A Salud Brunet, porque con ella aprendí la importancia de la clínica, y por ser siempre un apoyo.

A mis chicas de “la tarde del Sintrom”, Rosa Ortín, Magda Carmona, Montse, Nuria y Vanesa. Ellas hacen que las tardes sean más amenas, y por haberme demostrado su capacidad de trabajo en equipo y amistad más allá del trabajo.

A Bea Carreras y Chus Gallego, que voy a decir, son la columna vertebral del departamento, y

además de su paciencia me han demostrado su amistad y comprensión.

A Angel Remacha, por ser la persona que más sabe de serie roja y haberme ayudado en el difícil mundo de la eritropatología.

A Montserrat Borrell, el fundamento de nuestro laboratorio, por explicarme con paciencia todas las dudas que me han surgido durante estos años sobre la hemostasia.

A todos los demás compañeros médicos del Departamento de Hematología, por su amistad y por compartir sus conocimientos.

A Antonio Martínez-Rubio, un cardiólogo experto, trabajador y excelente persona. Porque sin él, nunca se hubiese llevado a cabo el estudio en la patología cardíaca.

A Joan Martí-Fàbregas, Roberto Belvís y a los residentes de Neurología, por haberme ayudado sin esperar nada a cambio, en el difícil trabajo del reclutamiento de pacientes. Me han demostrado la importancia de trabajar conjuntamente con otros departamentos.

A J.C. Souto y J.M. Soria, A.Buil, y todos los coautores de los trabajos que aún no he citado por su ayuda y apoyo.

A Eli Martínez Marchán, Maria Sabater y Carolina Mordillo, por ser amigas y excelentes profesionales. Son de las personas que hacen que el trabajo sea compatible con divertirse.

A todos los técnicos de laboratorio que hacen posible todo lo que produce nuestra unidad: Rosa Felices, Tere Urrutia, Cris Vallvé, Dolors Llobet, Mercè Garí, Inma Coll, Ruth Forner, Eli Martínez,.....

A todos los miembros de extracciones, por su colaboración en la extracción de las muestras. Siempre están dispuestos a ayudarnos con la mejor disposición.

En general a toda la Unidad de Hemostasia y Trombosis, por hacer que ir a trabajar cada día sea, aparte de mi pasión en la vida, mucho más divertido y agradable. Por haberme acogido como parte de este gran grupo de trabajo, y además ser mis amigos. Hacen que estar lejos de mi familia no sea tan duro.

Creo que no olvido a nadie, si es así que me perdonen, ya saben lo despistada que soy.

ÍNDICE

Introducción y Justificación de la Unidad Temática	10
Generalidades.....	12
1. Fisiología de la trombosis.....	12
1.1. El endotelio.....	12
1.2. Las plaquetas	12
1.3. La coagulación.....	19
1.4. El sistema fibrinolítico.....	29
2. La enfermedad tromboembólica arterial.....	37
2.1. Los síndromes coronarios agudos.....	45
2.2. La enfermedad cerebrovascular isquémica.	45
3. Los factores de riesgo trombótico en la enfermedad tromboembólica arterial.....	47
3.1. Los factores biológicos de riesgo trombóticos	53
3.1.2. Los polimorfismos en genes que codifican glicoproteínas de membrana plaquetar.....	53
3.1.3. Los factores de la coagulación.....	54
3.1.4. Los factores del sistema anticoagulante natural.....	59
3.1.5. Los factores del sistema fibrinolítico.....	60
4. <i>Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)</i>.....	63
4.1. Descubrimiento del TAFI.....	63
4.2. Caracterizaciónm síntesis y propiedades del TAFI.....	64
4.3. Activación del TAFI.....	66
4.4. Inhibición de la fibrinólisis mediante el TAFIa.....	67
4.5. Regulación del TAFI.....	68
4.6. Papel fisiopatológico del TAFI.....	69
5. Polimorfismo 46 C/T del Factor XII.....	71
6. Justificación del tema unitario.....	75

7. Objetivos	76
8. Artículos publicados	7
Trabajo nº 1.	
Association of Functional <i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i> (TAFI) With Conventional Cardiovascular Risk Factors and Its Correlation With Other Haemostatic Factors in a Spanish Population. <i>Am J Haematol</i> 2004; 76(4):348-52.	
Trabajo nº 2.	
Risk of Ischemic Stroke Associated With <i>Functional Thrombin- Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i> Plasma Levels. <i>Stroke</i> 2003;34:2387-2391	
Trabajo nº3.	
Risk of Acute Coronary Artery Disease Associated With Functional <i>Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor</i> (TAFI) Plasma Levels. <i>Haematologica</i> 2004;89(7): 880-1.	
Trabajo nº4.	
Homozygosity of the <i>T</i> Allele of the 46 <i>C/T</i> Polymorphism in the <i>F12</i> Gene is a Risk Factor for Ischemic Stroke in the Spanish Population. <i>Stroke</i> 2004; 35:1795-9.	
Trabajo nº 5.	
Homogosity of the <i>T</i> allele of the 46 <i>C/T</i> Polymorphism in the <i>F12</i> Gene is a Risk factor for Acute Coronary Artery Disease in the Spanish Population. <i>Haematologica</i> 2004; 89(7): 878-9.	
9. Discusión conjunta	101
10. Conclusiones	110
11. Consideraciones finales	112
12. Bibliografía	114

Introducción y Justificación de la Unidad Temática de la Tesis

En los últimos años el concepto de enfermedad tromboembólica como enfermedad compleja, ha supuesto un gran avance en el mundo de la medicina, y por ello, la manera de abordar esta enfermedad a nivel terapéutico y biológico también ha cambiado sustancialmente (1). Otro gran hallazgo, y que justifica el hilo conductor de gran parte de los estudios de investigación que hemos llevado a cabo, y que seguimos realizando, ha sido el conocimiento de que la enfermedad tromboembólica, tanto arterial como venosa, presenta una alta heredabilidad ($h^2=60\%$) y que podrían poseer una base genética común (2,3). Por lo tanto, la enfermedad tromboembólica venosa y arterial serían fenotipos, que compartirían fenotipos intermediarios relacionados con la hemostasia y por supuesto, compartirían alteraciones genéticas. Estas variantes genéticas y su interacción con el ambiente estarían implicadas en la susceptibilidad a desarrollar bien trombosis arterial o trombosis venosa o ambas.

Es por ello necesario contemplar la enfermedad tromboembólica como un fenotipo con diferentes maneras de presentación, como sería la trombosis venosa, la enfermedad coronaria aguda o el accidente cerebrovascular isquémico.

A partir de este importante concepto, comenzamos en nuestra Unidad, con la inestimable colaboración de los Departamentos de Cardiología y Neurología, la realización de estudios caso-control. En uno de ellos, se reclutaron individuos que habían presentado el primer episodio de enfermedad coronaria aguda, como angina e infarto de miocardio y en el otro estudio se incluyeron individuos diagnosticados del primer episodio de accidente cerebrovascular isquémico.

Es importante conocer la fisiología de la hemostasia, para luego llegar a entender cómo en condiciones patológicas, el organismo puede llegar a producir alteraciones en el sistema cardiovascular y finalmente desarrollar la enfermedad tromboembólica.

GENERALIDADES

FISIOLOGÍA DE LA HEMOSTASIA

Cuando en el organismo se produce un daño capaz de producir una hemorragia, el sistema hemostático se encarga de la reparación de las alteraciones producidas.

Inicialmente será la formación del tapón o trombo plaquetario, como parte fundamental de la hemostasia primaria, lo que proporcionará de una manera provisional un substrato anatómico capaz de detener la hemorragia tras el daño sufrido. Su formación dependerá en gran parte de las plaquetas, del endotelio vascular y de la interacción de las células sanguíneas con la pared

vascular. Por tanto, el correcto desarrollo de todas las etapas hasta su formación estará en función de la integridad y buen funcionamiento de todos sus componentes.

EL ENDOTELIO

La superficie celular del endotelio en el adulto está compuesta aproximadamente por 1 a 6 x10¹³ células, con un peso aproximado de 1 Kg y una extensión de unos 10.000 m². Tiene varias funciones y, además de actuar como barrera estructural entre la circulación y el tejido a irrigar, también representa un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo y en el transporte de la mayoría de las sustancias nutritivas, de moléculas activas con diferentes acciones y también de las células sanguíneas (4,5).

El endotelio contribuye a la regulación de la presión sanguínea y el flujo sanguíneo mediante la liberación de vasodilatadores como el óxido nítrico y la prostaciclina, y vasoconstrictores como la endotelina y el factor activador de plaquetas (PAF).

El endotelio lleva a cabo un papel fundamental dentro de la coagulación y la fibrinólisis. Básicamente, su función consiste en facilitar el flujo sanguíneo, para ello exhibe una superficie antitrombótica que inhibiría la adhesión y agregación plaquetaria y, por tanto, la formación de trombos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, este equilibrio se puede perturbar por fenómenos físicos o químicos. Este desequilibrio, dará lugar a cambios en el endotelio, que se transforma en una superficie protrombótica. El endotelio, en función de la situación, puede presentar propiedades procoagulantes y anticoagulantes, lo que permite retornar al equilibrio hemostático, una vez el estímulo procoagulante o hemorrágico haya desaparecido(4-6).

LAS PLAQUETAS

Las plaquetas son pequeñas células discoides anucleadas, procedentes de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos medulares. Circulan por la sangre y su función principal es taponar rápidamente cualquier solución de continuidad producida en el endotelio vascular y dar lugar a la activación del sistema de la coagulación y la fibrinólisis. Además, en los últimos años se ha demostrado que intervienen en otro tipo de procesos como la inflamación, la cicatrización de las heridas, la fibrosis, arterioesclerosis, trombosis, diseminación de metástasis, etc. Están formadas estructuralmente por la membrana plaquetaria, el citoplasma, el citoesqueleto, gránulos específicos, los sistemas membranosos, incluyendo el sistema canalicular abierto, sistema tubular denso y complejos membranosos mixtos, y estructuras

inespecíficas. En la membrana plaquetaria existen receptores tanto glicoproteicos (GP) como no glicoproteicos. Las glicoproteínas de membrana actúan como receptores mediando, entre otras, dos funciones importantes: la adhesión de las plaquetas a la superficie vascular dañada y la interacción plaqueta-plaqueta o agregación plaquetaria (7-9).

Los receptores no glicoproteicos actúan regulando la activación y agregación plaquetaria. Esta acción se realiza mediante su unión al ADP, adrenalina (receptores adrenérgicos), trombina, los endoperóxidos protaglandínicos, tromboxano A₂, y también a diferentes fármacos.

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulantes no interactúan con la superficie endotelial. Durante una hemorragia, las plaquetas se adhieren a la pared vascular dañada, se activan y se forma el trombo plaquetario. El proceso de adhesión se puede dividir en una fase inicial de contacto y una fase posterior de extensión de las plaquetas sobre el endotelio vascular (9-13). Este proceso será más eficaz en condiciones de flujo sanguíneo ya que las plaquetas se disponen en la periferia de los vasos sanguíneos y aumenta la disponibilidad de las plaquetas. En estas condiciones, las plaquetas inactivadas se unirán al subendotelio a través de interacciones entre el complejo glicoproteico plaquetario Ib-IX-V con el factor von Willebrand (FvW) que se encuentra tanto en plasma como en la pared vascular. El FvW y la GP Ib se unirán por zonas de anclaje para las fibras de colágeno tipo I y III que quedan expuestas en el subendotelio, con la interrupción de la capa celular del endotelio. Una vez las plaquetas se adhieren a través de la GP Ib, se produce la activación plaquetaria mediante productos de secreción como el ADP, la adrenalina o moléculas de superficie como el colágeno, y se producirá un cambio conformacional en la glicoproteína de membrana GPIIb-IIIa. Este hecho favorecerá la interacción de las plaquetas con el FvW y, por tanto, la extensión de las plaquetas sobre el subendotelio. El cambio conformacional también permitirá la interacción de la GPIIb-IIIa con el fibrinógeno, lo que facilitará la agregación de las plaquetas. Durante todos estos procesos de adhesión y agregación, se produce, debido a cambios en el estado de polimerización del citoesqueleto plaquetario, un cambio de forma de la plaqueta, pasando de la discoidal a la esférica y desarrollando prolongaciones pseudopódicas, y la secreción activa del contenido de los gránulos plaquetarios (reacción de liberación). La agregación plaquetaria requiere la presencia de calcio y fibrinógeno. La unión de la GPIIb-IIIa con el fibrinógeno forma unos puentes de unión entre las células y de esa manera se produce la agregación. Los productos liberados inducen la activación de las plaquetas circulantes que, a

su vez, facilita la formación de agregados plaquetarios, es decir, el trombo plaquetario. A medida de que se va generando la trombina, que convertirá el fibrinógeno en fibrina, los agregados de plaquetas se contraen más y fortalecen la unión del trombo.

La activación plaquetaria es un proceso bastante complejo, que se inicia en la superficie de la célula, mediante la interacción de un agonista con su receptor, generalmente una glicoproteína de membrana (9-13). Para dicha interacción entre los receptores de superficie y los diferentes efectores intracelulares como la adenilciclase y las fosfolipasas A₂ y C, se necesita de un grupo de proteínas reguladoras, las proteínas G. Dentro de estas proteínas, las G_s y la G_i son las encargadas de la regulación de los niveles celulares de AMPc, estimulando e inhibiendo, respectivamente, la adenilciclase en las plaquetas. Los agentes que aumenten los niveles de AMPc, como la prostaglandina PGI₂ y la PGE₁, lo hacen a través de las G_s, mientras que a través de la G_i, los agonistas como la trombina y la adrenalina, inhiben el AMPc. La G_q, estimula la fosfolipasa C, mientras que la proteína G implicada en la estimulación de la fosfolipasa A₂, todavía no se conoce exactamente. La transducción de la señal se realiza a través de los segundos mensajeros. Dos vías intracelulares están implicadas en la activación, la vía de los fosfoinositoles y la vía metabólica del ácido araquidónico, que se inician con la hidrólisis enzimática de los fosfolípidos específicos de la membrana plaquetaria. Mediante estas dos vías se formarán los segundos mensajeros, encargados de la transducción de las señales implicadas en la secreción y activación plaquetaria

La vía de los inositoles se inicia por la acción de la fosfolipasa C, que al actuar sobre el fosfatidilinositol-difosfato (PIP₂), se formarán los segundos mensajeros como el inositol-trifosfato (IP₃), el diacilglicerol (DG) y el ácido fosfatídico. También, mediante esta vía se produce la liberación del Ca⁺⁺, que es un segundo mensajero que afecta a la actividad de muchos enzimas. El DG actúa como cofactor de la proteincinasa (PKC), que a su vez, está implicada en la secreción de las plaquetas, al igual que el ácido fosfatídico.

La segunda vía importante en la transducción de señales en las plaquetas es la del ácido araquidónico (AA). El AA es el ácido graso poliinsaturado más abundante. Su metabolismo requiere, ante todo, la acción de varias lipasas, que liberan el ácido graso al medio intracelular. La fosfolipasa A₂ y el DG liberan el AA. Éste puede ser oxidado vía lipooxigenasa hacia la producción de 12-HETE (12-hidroxi-eicosatetraenoico). Este producto es un potente agente quimiotáctico para los macrófagos y los neutrófilos, y parece que estaría implicado en la

adhesión de las plaquetas. El AA también puede ser oxidado vía ciclooxigenasa, dando lugar a los endoperóxidos cíclicos, que son los precursores de los prostanoïdes. Dentro de estos, encontramos principalmente el tromboxano A₂, un potente inductor de la agregación plaquetaria, de la contracción de la musculatura vascular y respiratoria, e induce el cambio de forma y la secreción plaquetaria. Otro prostanoïde importante, es la prostaciclina, (PGI₂) y otras PG, que aumentan el AMPc al activar la adenilciclase, y tienen, por tanto, efectos opuestos al tromboxano A₂.

La plaqueta, como consecuencia de la interacción con los elementos del subendotelio, sufre un proceso de activación que incluye una reestructuración de la membrana celular, de manera que la disposición de las glicoproteínas de membrana sea más funcional convirtiéndolas en un soporte eficaz para el asentamiento de los factores de la coagulación, lo que llevará a la formación de trombina, reforzando de este modo, la estimulación de las plaquetas. Todo este proceso, se acompaña de un cambio de forma, de discoidal a esférica, y la secreción del contenido de los gránulos. Para la secreción se precisan dos mecanismos fundamentales: la centralización de los gránulos por contracción del complejo actina-miosina y el establecimiento de una comunicación entre los gránulos y el sistema canalicular abierto.

El contenido de cada uno de estos compartimentos granulares plaquetarios es diferente. Los gránulos α contienen proteínas y carbohidratos, entre ellos destacan el factor 4 plaquetario, la β-tromboglobulina, el fibrinógeno, el FvW y otros. Los gránulos densos se componen de adenin-nucleótidos, aminas biógenas, fosfato inorgánico, entre ellos, el ADP, ATP, GTP, GDP, Ca⁺⁺ y serotonina.

Las plaquetas representan un papel muy importante en la formación del trombo, tanto por la adhesión y la agregación plaquetaria, como por las interacciones con los leucocitos, la pared vascular, y las células musculares (3,14,15). La interacción entre leucocitos y el endotelio dará lugar a una serie de contactos entre receptores y ligandos bidireccionales que será esencial en los procesos inflamatorios. Las plaquetas, además de establecer contactos con el subendotelio, también puede adherirse y activar al endotelio. En las interacciones que establecerán las plaquetas con los leucocitos y el endotelio, en situación fisiopatológica, desempeñan un papel fundamental las micropartículas plaquetarias. Las micropartículas plaquetarias se forman a partir de un fenómeno de vesiculación de las plaquetas activadas por agonistas como la trombina, el colágeno, etc. Estas micropartículas, pueden por si mismas, inducir la adhesión de

los monocitos al endotelio y amplificar todas las señales que darán lugar a un aumento de la actividad de las moléculas de adhesión, que culminará en la expresión del factor tisular y su transformación en una superficie protrombótica. Una vez formado el primer trombo hemostático, será la formación del trombo de fibrina mediante la activación de la coagulación, que culminará el proceso hemostático. (Figura 1)

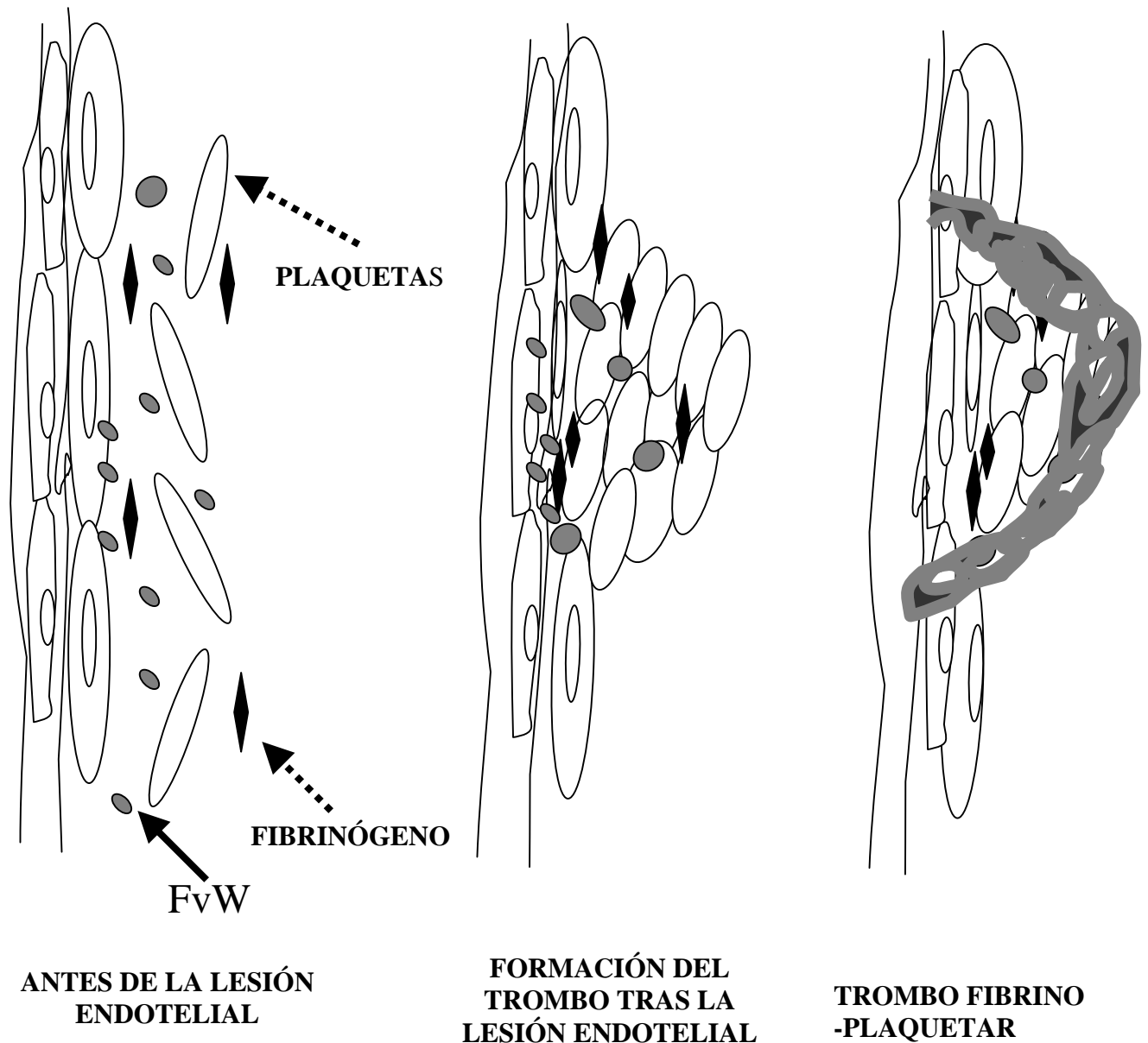


Figura 1. Inicio de la formación del trombo hemostático.

LA COAGULACIÓN

La coagulación es el conjunto de reacciones que conducen a la formación de fibrina, proteína insoluble que evita la pérdida de sangre cuando se lesiona un vaso (16-17).

Según su función, estas reacciones se pueden clasificar en: 1) procoagulantes, que conducen a la formación de la fibrina, evitando la pérdida de sangre; 2) anticoagulantes, que regulan o controlan la coagulación e impiden que los factores activados que se generan en un punto en que son necesarios para evitar una hemorragia, se extienda y se produzca una coagulación generalizada; y 3) fibrinolíticas, que son las encargadas de eliminar la fibrina cuando ya no es necesaria para evitar la pérdida de sangre, restableciendo el flujo sanguíneo.

La mayoría de los factores de la coagulación son proteínas que se encuentran en la sangre como zimógenos inactivos y que pueden ser activados y transformados en enzimas con actividad serin-proteasa mediante proteólisis limitada. Estas activaciones se realizan en una serie de reacciones encadenadas en las que el producto de la 1^a reacción funciona como enzima para la 2^a reacción, y el producto de la 2^a funciona como enzima para la 3^a, etc...

La mayoría de los factores de la coagulación se sintetizan en el hígado. Entre ellos los factores II, VII, IX, X, proteína C y proteína S necesitan la vitamina K para su síntesis completa. Estos últimos, llamados factores vitamina-K dependientes, precisan una carboxilación de los residuos de ácido glutámico (Glu) en una reacción en la que actúa como cofactor la vitamina K. Esta transformación les confiere una gran afinidad por los fosfolípidos. De esta manera las reacciones entre factores que en fase fluida serían muy poco eficientes, se realizan sobre superficies fosfolipídicas (membranas celulares) formando complejos enzimáticos que aumentan considerablemente la eficiencia de la reacción.

A parte de los precursores de serin-proteasas hay otras proteínas que no tienen actividad por sí mismas pero actúan como cofactores en los complejos enzimáticos aumentando la eficiencia de la reacción. Son por una parte los factores plasmáticos V y VIII que una vez han sufrido una pequeña proteólisis por la trombina forman parte de los complejos protrombinasa (Va-Xa-II) y X-asa (VIIIa-IXa-X). Por otra parte están las proteínas de membrana: factor tisular (TF) y la trombomodulina (TM), que actúan en los complejos VIIa-TF-X y trombina-TM-proteína C. Actualmente se acepta que el mecanismo hemostático fisiológicamente relevante está asociado

fundamentalmente a 3 complejos enzimáticos procoagulantes, formados por proteínas con actividad serin-proteasa y vitamina-K dependientes, reunidas sobre una superficie fosfolipídica y asociadas con cofactores que también están unidos a la membrana.

En cada caso el complejo enzimático conduce a un incremento significativo (10^5 - 10^6 veces) de la velocidad de reacción en la activación del sustrato. La formación de estos complejos catalíticos sobre la membrana celular sitúa la actividad proteolítica en el punto en que las células dañadas del vaso, o las células activadas de sangre periférica, aportan el sitio requerido para la formación del complejo. El requerimiento de complejos enzimáticos para desarrollar la actividad catalítica atenúa la propagación de las reacciones de coagulación lejos del sitio donde se ha iniciado. (Figura 2)

El primer proceso es el inicio de la coagulación, mediante la vía del factor tisular (18,19). El factor tisular (TF) es una proteína transmembrana y forma parte de la familia de receptores de citocinas. Bajo condiciones normales no está en contacto con el plasma ni en las células de la sangre ni en el endotelio. Constitutivamente, está presente en la adventicia que rodea los vasos sanguíneos y en tejidos del cerebro, pulmones, riñón, músculo y otros órganos. Entra en contacto con la sangre cuando se lesiona el vaso, o cuando se activan las células vasculares o monocitos mediante citocinas inflamatorias.

Aproximadamente 1-2% del factor VII circula en plasma en forma activada, aunque su centro activo no se expresa eficientemente a menos que se una al factor tisular. Cuando el factor tisular entra en contacto con la sangre el factor VIIa circulante se une rápidamente a él y se inicia la coagulación activando al factor X y al factor IX. El factor Xa también activa al factor IX acelerando el proceso de formación de IXa. El factor IXa forma un segundo complejo con el factor VIIIa y el factor X (complejo X-asa) formando factor Xa de una forma 50 veces más eficientemente que el que se forma en el complejo TF-VIIa- X, ya que el TFPI actúa inhibiendo rápidamente este complejo. El factor Xa formado por cualquiera de las dos fuentes forma un complejo con el factor Va y el factor II o protrombina (complejo protrombinasa) para transformarla en trombina. El factor Xa producido mediante el complejo TF-VII-X, puede generar una pequeña cantidad de trombina pero es una reacción extremadamente ineficiente. Sin embargo, una vez producida, la trombina y el factor Xa formados activan pequeñas cantidades de factor V, de factor VIII y a las plaquetas. La activación de estos 2 cofactores es esencial para que los complejos catalíticos IXa-VIIIa-X y

Xa-Va-II sean eficientes para convertir el factor X a Xa y el factor II a IIa respectivamente. El inicio de la coagulación está regulado por el TFPI (tissue factor pathway inhibitor) proteína que inhibe el complejo Xa-TF-VIIa y limita la producción de Xa y IXa por esta vía. Una vez esto ocurre el factor Xa se produce por el complejo IXa-VIIIa-X. De allí la importancia de los factores VIII y IX en la hemostasia y la diátesis hemorrágica que acompaña a su déficit.

La vía intrínseca de la coagulación no parece tener mucha importancia en el inicio de la coagulación (20), pero desempeña un papel en el mantenimiento de la coagulación (Figura 2). La activación de esta vía se inicia cuando el factor XI se activa ya sea por trazas de trombina o bien por la activación de lo que se conoce como fase de contacto (21). Ésta se inicia cuando el plasma entra en contacto con una superficie cargada negativamente como fibras de colágeno o superficies externas cristal, caolín etc. El factor XII se activa y el XIIa activa a la precalicreína. La calicreína formada junto con el quininógeno de alto peso molecular amplifican la activación del factor XII que a su vez activa al factor XI. El factor XIa formado por la vía que sea activa al factor IX a IXa en presencia de calcio, hidrolizando el mismo enlace peptídico que rompe el complejo TF-VIIa. De esta manera se continúa y amplifica el proceso como se ha descrito antes. El descubrimiento de la activación del factor XI de forma independiente del factor XII, precalicreína y del quininógeno de alto peso molecular, ayuda a clarificar el papel del factor XI en la vía intrínseca y explica porque pacientes con déficit severo de factor XI sufren diátesis hemorrágica mientras que esto no ocurre en individuos con deficiencias de factor XII, precalicreína o quininógeno de alto peso molecular. Estas 3 últimas proteínas están implicadas en la activación del factor XI cuando el plasma entra en contacto *in vitro* con superficies cargadas negativamente como el cristal o el caolín, pero podrían ser importantes cuando la sangre entra en contacto con superficies artificiales como válvulas cardíacas o membranas de diálisis. El factor von Willebrand (FvW) es una proteína multimérica de elevado peso molecular que circula en plasma unido al factor VIII. Se sintetiza en el endotelio y en los megacariocitos y es transportado por las plaquetas. De ellas se libera por diferentes estímulos (estrés, ejercicio, hormonas, etc) pasando a la sangre donde se une al factor VIII. Su actividad contribuye al fenómeno de la adhesión plaquetaria actuando como puente entre la plaqueta y el subendotelio. En una primera reacción el FvW se une al colágeno del subendotelio vascular a continuación sufre algunos cambios que le permiten unirse al receptor plaquetario glicoproteína Ib.

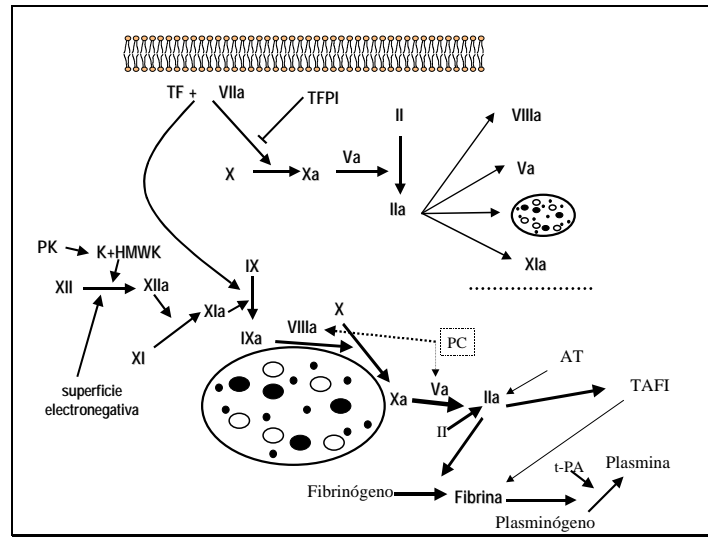


Figura 2. Representación esquemática de la coagulación. En una fase inicial el factor tisular (TF) que, en condiciones normales, no está en contacto con la sangre, se expone a ella y tras unirse al factor VIIa, inicia la vía extrínseca (su inhibidor es el TFPI). Se genera una cantidad de trombina (IIa) suficiente para activar las plaquetas, y los factores VIII y V (fase de inicio). Casi simultáneamente se activa el factor IX, que junto al factor VIIIa genera Xa. Éste, con el Va como cofactor, genera trombina (IIa) en grandes cantidades (fase de propagación). Esta fase es inhibida fundamentalmente la antitrombina (AT) y por la vía de la proteína C (PC). Además la trombina activa el TAFI que actúa inhibiendo la fibrinólisis. Regulación de la formación de fibrina por el TAFI. La fibrinólisis se inicia cuando el plasminógeno se convierte en plasmina por el tPA. La plasmina degrada el trombo de fibrina en productos de degradación solubles. EL tPA y el plasminógeno se unen e interaccionan con los residuos carboxi-terminal de lisina de la fibrina parcialmente degradada, y amplifica su acción. El TAFI actúa eliminando dichos residuos y por tanto, previene la formación del complejo fibrina-tPA-Plasminogeno , inhibiendo de esta manera la formación de plasmina y la degradación del trombo.

La trombina es el enzima que se genera al final del proceso de la coagulación que es capaz de transformar una proteína soluble, el fibrinógeno, en una red polimérica insoluble: la fibrina. Además, activa al factor XI, a las plaquetas, al factor XIII y a los cofactores V y VIII. Tiene una gran afinidad por la trombomodulina que se encuentra en el endotelio. Al unirse a la trombomodulina, forma un complejo, pierde sus propiedades procoagulantes y adquiere otras anticoagulantes ya que activa la proteína C. Un efecto recientemente identificado de la trombina unida a la trombomodulina es su capacidad para inhibir la fibrinólisis mediante la activación del TAFI (*thrombin activable fibrinolysis inhibitor*).

La formación de la fibrina a partir del fibrinógeno, es el último paso de la coagulación (22,23). El fibrinógeno es una glicoproteína de 340 kD sintetizada en el hígado. Tiene una vida media de unos 3-4,5 días y en plasma se encuentra en una concentración de 2 a 4 g/l. La molécula está compuesta por 2 mitades simétricas cada una formada por 3 tipos de cadenas polipeptídica. La conversión del fibrinógeno en fibrina se realiza en tres etapas. Primero la trombina rompe el enlace Arg16-Gly17 de la cadena α liberando el fibrinopéptido A (Ala1-Gly16). A continuación la trombina rompe el enlace Arg14-Gly15 de la cadena β liberando el fibrinopéptido B (Gly1-Arg14) y formándose el monómero de fibrina. En segundo lugar, tras la liberación de los fibrinopéptidos, la molécula expone unos sitios de polimerización en la zona aminoterminal de la cadena α y β , que reaccionan con estructuras complementarias en la zona carboxiterminal de la cadena γ . De esta manera los dominios D de una molécula interactúan con la zona E de otra molécula, formándose una fibra de 2 hebras en la que los monómeros están medio solapados. A continuación se produce una asociación lateral de las fibras aumentando su grosor. Finalmente, en presencia de factor XIIIa, la fibrina que inicialmente estaba unida por interacciones no covalentes, sufre una serie de uniones intermoleculares mediante la formación de enlaces entre residuos lisina de una cadena γ y glutamina de otra. Posteriormente, se realizan otros enlaces entre las cadenas α , y entre cadenas α y γ . La incorporación de estos enlaces covalentes entre las fibras de fibrina aporta una mayor resistencia a la degradación por la plasmina así como una mayor resistencia y elasticidad del coágulo.

Una vez formado el trombo, existen mecanismos reguladores de este proceso, y que evitarán un exceso de formación de fibrina (20,24). Los mecanismos que regulan la hemostasia son

fundamentalmente de 2 tipos:

1. Los inhibidores de serin-proteasas que inhiben los factores activados: antitrombina, cofactor II de la heparina, TFPI, α_2 .macroglobulina, inhibidor de la proteína C activada, inhibidor del C1q-esterasa y α_1 -antitripsina.
2. Los reguladores de los cofactores activados: Vía de la proteína C (Proteína C, Proteína S y Trombomodulina).

Inhibidores de serin-proteasas:

La antitrombina (25), es un inhibidor de serin-proteasas sintetizado en el hígado que se encuentra en plasma a una concentración de 2,4 μ M. Es el principal inhibidor de la trombina y del factor Xa pero también inactiva los factores IXa, XIa, XIIa, calicreína y plasmina. También inhibe al factor VIIa unido al factor tisular. La actividad inhibitoria se incrementa unas 1.000 veces en presencia de heparina que *in vivo* tiene su equivalente en el proteoglicano sulfato de heparán, presente en el endotelio vascular.

La molécula de antitrombina se une a la molécula de heparina a través de una secuencia discontinua de residuos básicos (Lys, Arg) en la zona aminoterminal. La trombina se une también a la cadena de heparina de una manera no específica mediante cargas electrostáticas. De esta manera se forman complejos ternarios heparina-AT-trombina en los que el sitio activo de la trombina se acerca al sitio reactivo de la AT. Inicialmente la trombina rompe el enlace Arg 393-Ser 394 en el sitio reactivo de la AT, esto produce un cambio conformacional de la AT que atrapa de forma irreversible a la trombina. Una vez formado el complejo AT-trombina se libera a la circulación y forma complejos ternarios con la vitronectina. Se cree que estos complejos ternarios se eliminan de la circulación por unión a los proteoglicanos sulfato de heparán que son posteriormente internalizados. El factor Xa y otros factores activados de la coagulación se unen sólo débilmente a la heparina y son inhibidos por el complejo heparina-AT gracias al cambio conformacional que induce la heparina en la AT.

El Cofactor II de la heparina, es un inhibidor de serin-proteasas con una homología de un 25% con la AT . Se sintetiza en el hígado. En sangre se encuentra en una concentración de 1,2 μ M. A diferencia de la AT sólo inhibe la trombina y no a los demás factores activados. Su acción inhibitoria se incrementa extraordinariamente en presencia de glicosaminoglicanos pero el estímulo más potente es el sulfato de dermatán que difiere del sulfato de heparán por la composición del disacarido (D-galactosamina en lugar de D-glucosamina).

El TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*), es un inhibidor de especial importancia en la regulación del inicio de la coagulación (19). A diferencia de otros inhibidores de factores activados no pertenece a la familia de los inhibidores de las serin-proteasas (Serpinas). Posee 3 dominios inhibidores de tipo *Kunitz*. En condiciones normales el TFPI circula en plasma mayoritariamente unido a lipoproteínas y entre un 5-10 % en forma libre. Después de la administración de heparina los niveles plasmáticos de TFPI se incrementan entre 2 y 8 veces. Este TFPI que se libera del endotelio no parece estar asociado a las lipoproteínas. Una pequeña parte de TFPI está asociado a las plaquetas y se libera cuando se activan por la trombina.

La actividad anticoagulante del TFPI se desarrolla en 2 etapas: en la primera se forma un complejo reversible estequiométrico 1:1 con el factor Xa produciendo la pérdida de actividad catalítica del factor Xa, en la segunda etapa este complejo binario se une al factor VIIa-TF unido a la membrana en una reacción que necesita calcio formándose el complejo cuaternario Xa-TFPI-VIIa-TF resultando la pérdida de actividad catalítica del factor VIIa-TF.

Reguladores de los cofactores activados(24-26):

Vía anticoagulante de proteína C

La Proteína C (PC) es una glicoproteína vitamina-K dependiente sintetizada en el hígado que circula en plasma a una concentración de 50-80 nM. Es el precursor de una serin-proteasa y contiene residuos γ -carboxilados que le confieren la capacidad de unirse a los fosfolípidos mediante el calcio. Una vez activada la proteína C (PCa) se une a los fosfolípidos de membrana o al receptor endotelial de la proteína C y actúa como un potente anticoagulante degradando los factores Va y VIIIa. En esta actividad proteolítica actúan como cofactores la proteína S y el propio factor V.

La Trombomodulina es una proteína integral de membrana. Consta de una zona aminoterminal parecida a la lectina (*lectin-like domain*), seguida de 6 dominios parecidos al factor de crecimiento epitelial (*EGF*), un dominio rico en los aminoácidos serina y treonina, un dominio transmembrana, y una cola citoplasmática. El 5^o y 6^o *EGF* son esenciales para la unión a la trombina mientras que la unión calcio-dependiente a la proteína C requiere la región que une el 3^{er} y 4^o *EGF*. En el residuo Ser 474, la TM contiene una cadena de sulfato de condroitín. Se ha identificado TM humana en diferentes tejidos como vasos linfáticos, placenta, plaquetas, megacariocitos, macrófagos, neutrófilos y células musculares. En la vasculatura se localiza principalmente en los capilares y en menor cantidad en las arterias y venas. La actividad

anticoagulante de la TM consiste en que tras su unión a la trombina, neutraliza la actividad procoagulante de ésta y el complejo formado activa la proteína C. La trombina se une con gran afinidad a la trombomodulina. Una vez unida, la trombina pierde su actividad procoagulante: no transforma el fibrinógeno en fibrina, no activa el factor V, el VIII ni el XIII y tampoco activa las plaquetas ni las células endoteliales. La TM induce un cambio conformacional en la trombina resultando en un eficiente reconocimiento y activación de la proteína C. La expresión de TM en la superficie endotelial es susceptible a diversas condiciones patológicas: disminuye por diversos agentes inflamatorios como el factor de necrosis tumoral, la interleucina-1, endotoxinas bacterianas, hipoxia, etc.

La proteína S (PS) es una glicoproteína vitamina-K dependiente. Se sintetiza en el hígado pero también en las células endoteliales y megacariocitos. Se encuentra en plasma a una concentración de 250-350 nM. Está formada por un dominio C-terminal homólogo a la proteína que une a los andrógenos (*androgen binding protein*), 4 EGF, un dominio sensible a la trombina, y un dominio Gla aminoterminal que le facilita su unión al calcio y a la membrana celular. La unión al calcio protege a la PS de la degradación por la trombina y, además, induce un cambio de conformación que es necesario para que actúe como cofactor de la PCA. La interacción con la PCa se cree que se realiza mediante el dominio sensible a la trombina y el EGF. La zona parecida al transportador de andrógenos está relacionada con la unión al C4b *binding protein* (C4bBP). El C4bBP es una glicoproteína de alto peso molecular, reguladora del complemento, reactante de fase aguda. Está formada por 7 subunidades α idénticas y una subunidad β . Las subunidades α se unen al C4b y la subunidad β se une a la proteína S. En plasma un 40 % de PS circula libre y posee actividad cofactor para la PCA. El 60% restante está unido al C4bBP y en esta forma no participa en la actividad anticoagulante de la PCA.

El mecanismo anticoagulante de la PC, se inicia cuando se genera una pequeña cantidad de trombina. Ésta se une a la trombomodulina y el complejo trombina-trombomodulina activa a la proteína C unida a los fosfolípidos de membrana o al receptor endotelial de la PC. La PC activada junto con la proteína S y el factor V que actúan como cofactores, tiene como principal sustrato al factor Va, al que degrada rompiendo 3 enlaces: el primero en la Arg506 que produce una rápida pero incompleta pérdida de actividad y después en la Arg 306 y Arg 706, con lo que la inactivación del factor Va es completa. Una alteración en la molécula del factor V relativamente frecuente y asociada a trombofilia es el Factor V Leiden. Consiste en un factor

V en el que el aminoácido Arg 506 ha sido substituido por una Gln y por ello la molécula es más resistente a la degradación por la PCA. El factor VIIIa es también un substrato para la PCA pero debido a la inestabilidad del factor VIIIa no parece ser muy relevante desde el punto de vista fisiológico. La PS y el factor V actúan de forma sinérgica como cofactores en la degradación del factor Va.

Después de su activación la PCA es lentamente neutralizada por al menos tres inhibidores de proteinasas: El inhibidor de la PCA (PCI), la α_2 -macroglobulina (α_2M) y la α_1 -antitripsina (α_1AT).

SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El sistema fibrinolítico tiene como objetivo la lisis de la fibrina depositada en el árbol vascular (27,28). Es decir, es un sistema reactivo a la activación de la coagulación y a la generación final de trombina. La plasmina, una serin-proteasa de 85-Kd, es el enzima central de este sistema. En condiciones normales circula por el plasma humano en forma de proenzima, el plasminógeno. La transformación del plasminógeno en plasmina la llevan a cabo los denominados activadores del plasminógeno: activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador tipo uroquinasa (u-PA). La plasmina es una enzima extraordinariamente inespecífica capaz de degradar a la fibrina, al fibrinógeno, a los factores de la coagulación V y VIII y a otros muchos substratos. Para regular esta actividad proteolítica de la plasmina, el plasma humano posee un inhibidor muy selectivo y potente, llamado α_2 -antiplasmina. Asimismo para regular a los activadores del plasminógeno el organismo humano esta dotado de los llamados inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo I (PAI-1), tipo II (PAI-2) y tipo III (PAI-3).

Los activadores fisiológicos del plasminógeno t-PA y u-PA están siendo utilizados en la actualidad como agentes trombolíticos en el tratamiento del infarto agudo de miocardio, el embolismo pulmonar, trombosis arteriales periféricas, etc.

Todos los enzimas que constituyen el sistema fibrinolítico están compuestos por cadenas unidas por uno o varios puentes disulfuro. En la región amino-terminal de dichas enzimas se halla la zona que les confiere especificidad por los distintos substratos. En esta zona se encuentran unas estructuras en forme de bucle denominadas *kringles* compuestas por unos 80 aminoácidos unidos entre sí por 3 puentes disulfuro. La cantidad de *kringles* varía para cada componente del sistema fibrinolítico y en general dichas estructuras tienen una alta afinidad

para los aminoácidos lisina. También se encuentran, en esta zona amino-terminal, las regiones homólogas al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el centro activo compuesto sistemáticamente por los aminoácidos ácido aspártico, histidina y serina. El plasminógeno humano es una glicoproteína de una sola cadena con un peso molecular próximo a los 90.000 d., contiene aproximadamente un 2% de carbohidratos y el gen que codifica para esta proteína se ha localizado en el cromosoma 6. La molécula de plasminógeno posee 791 aminoácidos, 24 puentes disulfuro y 5 estructuras homólogas denominadas *kringles* que le confieren una gran afinidad por la fibrina, la α 2-antiplasmina y la trombospondina. El plasminógeno nativo tiene un ácido glutámico en su extremo amino-terminal (glu-plasminógeno), pero es fácilmente convertido por una proteólisis limitada a las formas amino-terminales conteniendo lisina, valina o metionina que son comúnmente designadas como lis-plasminógeno. Esta conversión se realiza por hidrólisis de los enlaces peptídicos Arg 67-Met 68, Lis 76-Lis 77 o Lis 77-Val 78. Tanto el glu-plasminógeno como el lis-plasminógeno son proenzimas inactivos. La activación del lis-plasminógeno a plasmina se realiza por la rotura de un simple enlace peptídico entre los aminoácidos Arg 560-Val 561. La molécula de plasmina está compuesta por dos cadenas: cadena A o cadena pesada, originada por el fragmento correspondiente al NH₂-terminal del plasminógeno, y cadena B o cadena ligera, que contiene la parte COOH-terminal y el centro activo de la molécula. La plasmina formada puede degradar de una forma ordenada y secuencial tanto a la fibrina como al fibrinógeno, produciendo fragmentos conocidos como productos de degradación de la fibrina o fibrinógeno (27). La vida media del plasminógeno ha sido estudiada en humanos normales y es de $2,2 \pm 0,29$ días para el glu-plasminógeno y de 0,8 días para el lis-plasminógeno. Las hipoplasminogenemias congénitas y algunos tipos de displasminogenemias se han asociado a problemas trombóticos de repetición en algunas familias muy concretas. Sin embargo dichas alteraciones no se consideran una causa muy prevalente de trombofilia hereditaria.

Los activadores del plasminógeno, tanto el t-PA como el u-PA, fundamentalmente regulan la fibrinólisis intravascular y la proteólisis extracelular. La fibrinólisis intravascular, básicamente llevada a término por el t-PA, ha adquirido últimamente una gran relevancia, desde el punto de vista farmacológico y terapéutico. La actividad fibrinolítica extravascular (u-PA), representa un papel muy importante en la capacidad invasiva de determinados tipos de neoplasias y, en condiciones fisiológicas, es básica para la normal embriogénesis y la reparación e involución

de los tejidos. El t-PA es una serin-proteasa tipo tripsina compuesta por 527 aminoácidos y de un peso molecular próximo a los 88.000 d. El gen humano que codifica para el t-PA tiene más de 20 Kb con 14 exones y se halla situado en el cromosoma 8. El t-PA es sintetizado y secretado por las células endoteliales vasculares en la forma de una glicoproteína de una sola cadena (sct-PA) y con un contenido de hidratos de carbono próximo al 12,8%. En presencia de pequeñas cantidades de plasmina, la forma monocatenaria del t-PA puede convertirse en forma bicatenaria, esta última forma de t-PA parece que posee mayor afinidad por la fibrina. En la cadena pesada del t-PA se halla la zona de la molécula que le confiere una gran afinidad por la fibrina. La concentración plasmática de t-PA es muy baja, aproximadamente del orden del 5 ng/ml. La mayoría del t-PA circulante se halla formando un complejo con el inhibidor de activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y menos de un 5% se halla en su forma libre. No obstante, en determinadas situaciones, cuando se genera fibrina dentro del árbol vascular, la concentración de t-PA es extremadamente alta en el punto donde se ha producido la trombosis y en esa zona se produce la activación del plasminógeno en plasmina. En ausencia de fibrina, la eficiencia del t-PA para activar el glu-plasminógeno circulante es muy baja. Sin embargo, en presencia de fibrina el t-PA tiene una afinidad 500 veces superior por el plasminógeno fijado a la fibrina. También se sabe que la forma parcialmente degradada del plasminógeno (lis-plasminógeno) es transformada en plasmina por el t-PA 10 veces más rápidamente que la forma nativa del plasminógeno (glu-plasminógeno). *In vivo* el t-PA tiene una vida media muy corta, aproximadamente de unos 5 minutos, y su rápida desaparición de la circulación parece ser independiente de la formación de complejos con el PAI-1.

La u-PA se han encontrado en la orina, en diversos cultivos celulares (células endoteliales) y también en el plasma. La uroquinasa de alto peso molecular (HMW-UK), de 55.000 d y de dos cadenas es el más conocido, en cuanto a su estructura primaria. No obstante, se sabe que esta UK de alto peso molecular, por el efecto de la plasmina, se puede degradar en UK de bajo peso molecular (LMW-UK), de 33.000 d. La HMW-UK se sintetiza en una forma inactiva y de una sola cadena denominada pro-UK o scu-PA (*single chain* u-PA). La concentración de scu-PA en plasma no está bien establecida, pero puede variar entre 2-20 ng/ml. También se conoce que el gen de la scu-PA tiene 6,4 Kb y se halla situado en el cromosoma 10. La plasmina y la calicreína rompen a la scu-PA en el aminoácido 158, y la transforman en una molécula de 2 cadenas (tcu-PA, o *two chain* u-PA) con una alta afinidad por el plasminógeno fijado en la

fibrina. Al igual que el t-PA, los activadores tipo uroquinasa (de 2 cadenas) transforman el plasminógeno en plasmina solamente en las zonas del árbol vascular donde existe presencia de fibrina. La vida media de la scu-PA nativa o recombinante es muy corta, del orden de 5-8 minutos, muy similar a la del t-PA.

Se han caracterizado distintos inhibidores de la activación del plasminógeno, el más importante de ellos es el denominado PAI-1 (inhibidor de la activación del plasminógeno tipo I). El PAI-1 es una glicoproteína, de 52.000 d aproximadamente, compuesta por 379-381 aminoácidos y el gen que sintetiza para dicha proteína se halla situado en el cromosoma 7. El PAI-1 se halla en el plasma a una concentración baja, 1.000 veces inferior a la α_2 -antiplasmina, pero 3-4 veces superior a la concentración de t-PA. El PAI-1 es un inhibidor de serin-proteasas y como tal tiene la estructura típica de serina, arginina, aspártico en el centro reactivo. El PAI-1 inhibe adecuadamente y con una cinética similar al sct-PA, tct-PA y tcu-PA, pero no a la scu-PA ni a la SK. La reacción entre PAI-1 y estos activadores del plasminógeno es en dos tiempos, en un primer estadio la reacción es reversible y en un segundo se forman uniones de tipo covalente y la reacción es irreversible.

En el ámbito plasmático, se halla un tercio del PAI-1 existente, pues una gran cantidad se encuentra en las plaquetas, almacenado en los gránulos alfa, y su liberación se realiza cuando se produce una activación de las plaquetas. El resto del PAI-1 se encuentra en la célula endotelial vascular y en el hepatocito.

Una gran variedad de estímulos pueden condicionar la producción o liberación de PAI-1 de las células endoteliales. La trombina, a concentraciones de 1 U/ml, provoca un importante incremento de la actividad del PAI-1, superando ampliamente los niveles de t-PA, también estimulados por la trombina. La dexametasona, en cultivos de células de hepatoma (HTC), provoca un importante incremento del PAI-1. También las endotoxinas provocan considerables aumentos de PAI-1, por las células endoteliales vasculares, tanto en modelos animales como el hombre.

Los otros inhibidores de la activación del plasminógeno: el PAI-2, PAI-3 y la proteasa-nexina son inhibidores de segundo orden en la hemostasia. Cabe destacar que el PAI-2 se encuentra de forma abundante en el plasma de mujeres embarazadas y su síntesis probablemente se localiza en la placenta. El PAI-3 se ha detectado en orina y plasma, y en la actualidad se sabe que es un inhibidor importante de la proteína C activada. La proteasa-nexina se sintetiza en los

fibroblastos, las células musculares cardíacas y en las células epiteliales del riñón. En plasma no se ha podido detectar, sin embargo, se cree que su función tiene una gran importancia en la matriz extracelular.

En cuanto a los inhibidores de la plasmina, la α_2 -antiplasmina es el principal inhibidor fisiológico de la plasmina. La α_2 -antiplasmina es una glicoproteína de cadena simple con un peso molecular aproximado de 70.000 d y que posee aproximadamente un 13% de carbohidratos. En esta molécula, cabe distinguir funcionalmente dos regiones, una con residuos lisina capaz de unirse al plasminógeno o la plasmina y otra, donde se localiza el centro inhibidor propiamente dicho que se une al centro activo de la plasmina.

La α_2 -antiplasmina forma un complejo estequiométrico (1:1) con la plasmina, muy estable, el cual está desprovisto de actividad proteásica o esterásica. El complejo se produce por una fuerte interacción entre la cadena ligera de la plasmina y el inhibidor. La acción de la α_2 -antiplasmina sobre proteasas distintas a la plasmina parece ser muy escasa.

La vida media de la α_2 -antiplasmina marcada isotópicamente con I¹²⁵, ha sido estudiada en sujetos normales y en pacientes sometidos a tratamiento trombolítico. En el grupo control, la vida media hallada fue de $2,64 \pm 0,32$ días, mientras que en los pacientes bajo tratamiento, la vida media resultaba de aproximadamente 0,5 días, debido a la formación de complejos plasmina- α_2 -antiplasmina. Este complejo posee una vida media mucho más larga.

La concentración de la α_2 -antiplasmina en la sangre de individuos normales es de aproximadamente de 1 μM , pero puede decrecer por debajo del 30% en casos severos de enfermedad hepática o coagulación intravascular. En cambio, es normal en pacientes con enfermedades cardiovasculares, renales o malignas. La α_2 -antiplasmina es agotada temporalmente durante el tratamiento trombolítico con estreptoquinasa.

La α_2 -macroglobulina es un inhibidor más lento de la plasmina que la α_2 -antiplasmina y, parece tener como misión, neutralizar a la plasmina formada en exceso, cuando se ha sobrepasado la capacidad inhibitoria de la α_2 -antiplasmina. Así pues, cuando el plasminógeno plasmático (concentración entre 1,5 y 2 μM) es activado, la plasmina formada sería neutralizada inicialmente por la α_2 -antiplasmina (concentración aproximadamente 1 μM), hasta su saturación, a partir de este momento, el exceso de plasmina sería neutralizado por la α_2 -macroglobulina. A pesar de que, en teoría, la presencia de α_2 -macroglobulina podría suplir

un déficit de α_2 -antiplasmina, la velocidad de inactivación a través de la α_2 -macroglobulina es tan lenta, que los pacientes con un déficit congénito de α_2 -antiplasmina, presentan un cuadro hemorrágico importante, similar al encontrado en pacientes con hemofilia grave.

Recientemente se ha descubierto una molécula que juega un papel muy importante como conexión del sistema de la coagulación y el sistema fibrinolítico. Es el llamado TAFI (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*) o procarboxipeptidasa B plasmática, del que hablaremos en más profundidad más adelante (29).

La Activación y regulación de la fibrinólisis fisiológica es un proceso en el que participan muchos factores. En condiciones de normalidad sólo un 20% del plasminógeno circula libre en el plasma. El 50% del plasminógeno forma un complejo disociable con la HRG (glicoproteína rica en histidina), y alrededor de un 15% forma complejos disociables con la α_2 -antiplasmina. El resto, aproximadamente un 15%, circula unido al fibrinógeno. Este equilibrio se mantiene con concentraciones plasmáticas del plasminógeno, y de los otros componentes citados, dentro del rango de la normalidad. Así pues, al formarse fibrina dentro del árbol vascular, ésta contiene plasminógeno, el cual se halla unido a la fibrina por una o más regiones denominadas *lysine-binding-sites* (LBS), que poseen una elevada afinidad por los residuos lisina.

Por estímulos todavía mal definidos, (hipoxina local, estrés, ejercicio físico, desmopresina, etc) las células endoteliales próximas al coágulo o trombo liberan activadores del plasminógeno tipo t-PA, u-PA. Dichos activadores, sobre todo el t-PA, tienen una gran afinidad por la fibrina (unas 100 veces superior a la del fibrinógeno) y prácticamente no interactúan con el plasminógeno circulante sino sólo con el que se halla unido a la fibrina por sus LBS. En estas condiciones, estos activadores transforman el plasminógeno en plasmina en la superficie del trombo. Dicha plasmina no es inhibida por la α_2 -antiplasmina, inhibidor específico de la misma, por poseer sus LBS ocupados por la fibrina. De esta forma se genera plasmina en el interior del trombo y éste es degradado. Cuando este hecho se produce y la plasmina se libera de la fibrina, inmediatamente es inhibida en el medio plasmático por la α_2 -antiplasmina.

Esta activación de la fibrinólisis, localizada en el punto donde se halla la fibrina, está sujeta al influjo de diversos moduladores. El PAI-1 liberado durante la activación de las plaquetas o secretado por las propias células endoteliales probablemente contribuye a la estabilización del trombo a través de la inactivación del t-PA libre. En la Figura 1 se esquematiza de forma global los procesos de activación e inhibición del sistema fibrinolítico.

ENFERMEDAD TROMBOEMBOLICA ARTERIAL

Los trombos pueden formarse en cualquier localización del sistema cardiovascular, incluyendo las venas, las arterias, el corazón y la microcirculación. Las complicaciones de la trombosis están ocasionadas por los efectos de la obstrucción del vaso o por embolización a distancia de material trombótico y, con menor frecuencia, por consumo de factores hemostáticos. La trombosis arterial normalmente se asocia a patología vascular previa, fundamentalmente la aterosclerosis (8). La trombosis arterial produce manifestaciones clínicas causadas por la isquemia tisular, por obstrucción o por embolización en la microcirculación distal. Los trombos intracardiacos se forman sobre las válvulas lesionadas o inflamadas, en el endocardio adyacente a una zona de infarto de miocardio, en una cavidad cardiaca discinética o dilatada o en válvulas protésicas o dispositivos endovasculares. Suelen ser asintomáticos si permanecen dentro del corazón pero pueden causar importantes y desastrosas complicaciones si embolizan en la circulación sistémica. La trombosis diseminada en la microcirculación es una complicación de la coagulación intravascular sistémica. Los microtrombos pueden producir necrosis isquémica o hemorragias por consumo de plaquetas y factores de coagulación (30-33). Los trombos están formados por fibrina y células sanguíneas. La proporción relativa de un tipo y otro de células y de la fibrina está influida por factores hemodinámicos. Por ello, las proporciones son diferentes en los trombos arteriales o venosos. El trombo arterial se forma en un ambiente de alto flujo y está formado principalmente de filamentos de fibrina y plaquetas. El trombo venoso se forma en áreas de estasis y está compuesto por hematíes entremezclados con fibrina y relativamente pocas plaquetas.

A medida que envejecen, los trombos cambian estructuralmente. Los leucocitos acuden atraídos por factores quimiotácticos liberados por las plaquetas o por fragmentos de proteínas plasmáticas y se incorporan al trombo. Los agregados de plaquetas son reemplazados progresivamente por fibrina, la cual es eventualmente digerida por los enzimas fibrinolíticos liberados por los leucocitos y las células endoteliales. El trombo arterial se suele formar en zonas de flujo alterado y en los lugares de ruptura de placas de aterosclerosis que exponen el subendotelio trombogénico a las plaquetas y a los factores de la coagulación. Además la ruptura de la placa puede producir una estenosis adicional por hemorragia intraplaca. Cuando el flujo es rápido, el trombo puede ocluir parcialmente el vaso o embolizar a distancia. Cuando el flujo es bajo y el grado de estenosis importante, o si el estímulo protrombótico es muy

intenso, el trombo puede ser totalmente oclusivo. Los trombos no oclusivos pueden ser incorporados a la pared vascular y producir una aceleración del crecimiento de las placas de ateroma. (Figura 3) (32). La patogenia de la trombosis puede ocurrir cuando existe un fracaso en el balance entre los factores trombogénicos y los mecanismos antitrombóticos protectores. Los factores protrombóticos son: 1) alteración de las células endoteliales; 2) pérdida del endotelio y exposición del subendotelio; 3) activación de las plaquetas por interacción con agonistas circulantes o con el colágeno subendotelial; 4) activación de la coagulación; 5) inhibición de la fibrinólisis; y 6) estasis.

La trombosis arterial está íntimamente relacionada con la aterosclerosis. En una primera fase, se produce el desarrollo de las placas de ateroma, en la que están implicadas la proliferación de músculo liso y el acúmulo de lípidos en la íntima. Esto produce un estrechamiento de la luz de los vasos y puede causar obstrucción crónica al flujo. Esto es lo que ocurre por ejemplo en la angina estable. En una segunda fase, la placa de ateroma puede volverse inestable, fisurarse, sufrir hemorragias intraplaca, y producirse una trombosis sobre la placa. Esto lleva a los síndromes isquémicos agudos como el infarto de miocardio, la angina inestable, la muerte súbita y el ictus isquémico. La aterosclerosis es una enfermedad de la íntima de las arterias de mediano o gran calibre, del tamaño de las arterias coronarias o cerebrales hasta la aorta. No afecta a arterias de menos de 300 μm de diámetro que están dentro de los órganos. La afectación de la íntima es parcheada, no difusa, llevando a la formación de placas fácilmente visibles macroscópicamente. La localización de las placas está determinada probablemente por la interacción de fuerzas hemodinámicas sobre la superficie endotelial. Las lesiones más tempranas se producen en las zonas de poca tasa de cizallamiento, que son zonas de máxima adhesión de leucocitos y de transferencia de lípidos. Las placas están formadas fundamentalmente por proteínas constituyentes del tejido conectivo (colágeno, proteoglicanos, elastina) producidas por las células musculares lisas, que han migrado desde la media a la íntima. Además, las placas tienen lípidos procedentes del plasma bien libres o en el interior de células *espumosas*. El interior de las placas es muy rico en factor tisular. Esto es importante en los procesos de inestabilización de la placa ya que su exposición a la sangre es muy trombogénica. Recientemente se está reconociendo el importante papel que tiene la inflamación en las complicaciones de las placas de ateroma. Las células *espumosas* son macrófagos activados capaces de liberar IL-1 y TNF. Estas citocinas incrementan la expresión

de moléculas de adhesión y favorecen la migración de monocitos dentro de la íntima y favorecen la expresión de TF. Recientemente se sospecha que agentes infecciosos como clamidias o citomegalovirus, pueden estar relacionados en la inestabilización y complicación de las placas. El curso clínico de los pacientes con aterosclerosis está jalonado por episodios agudos de infarto de miocardio, angina inestable, ictus o incluso muerte súbita. Existen pruebas abundantes de que estos episodios están desencadenados por trombosis sobre placas ateroscleróticas. Existen factores precipitantes de trombosis sobre placas de ateroma. En la cuarta parte de los casos, los trombos se superponen a la placa sin que en ella existan cambios recientes, pero en la mayoría de los casos existen lesiones profundas en la placa como desgarros que se extienden desde la luz vascular a lo más profundo de la íntima. Esto hace que esté expuesta una mayor cantidad de colágeno y de TF que iniciarían la trombosis, y el trombo se iniciaría en el interior de la placa, inflando la placa y haciendo que se ocluya más rápidamente la luz. El tamaño de los desgarros que se ven en las placas oscila entre fisuras microscópicas y lesiones visibles a simple vista. Incluso puede desprenderse la parte que recubre el núcleo de la placa produciéndose una ulceración. El interior de la placa es intensamente trombogénico, ya que es capaz de activar las plaquetas y la coagulación. La aterosclerosis es, por tanto, una enfermedad sistémica con gran componente inflamatorio, que envuelve a la íntima de las arterias medianas y grandes. El endotelio juega un papel muy importante, y se conoce que los factores de riesgo cardiovasculares alteran la función endotelial y pueden desencadenar aterosclerosis sin la necesidad de alteración de la capa endotelial (32,33). El endotelio regula la producción de factores protrombóticos y antitrombóticos(Figura 3)

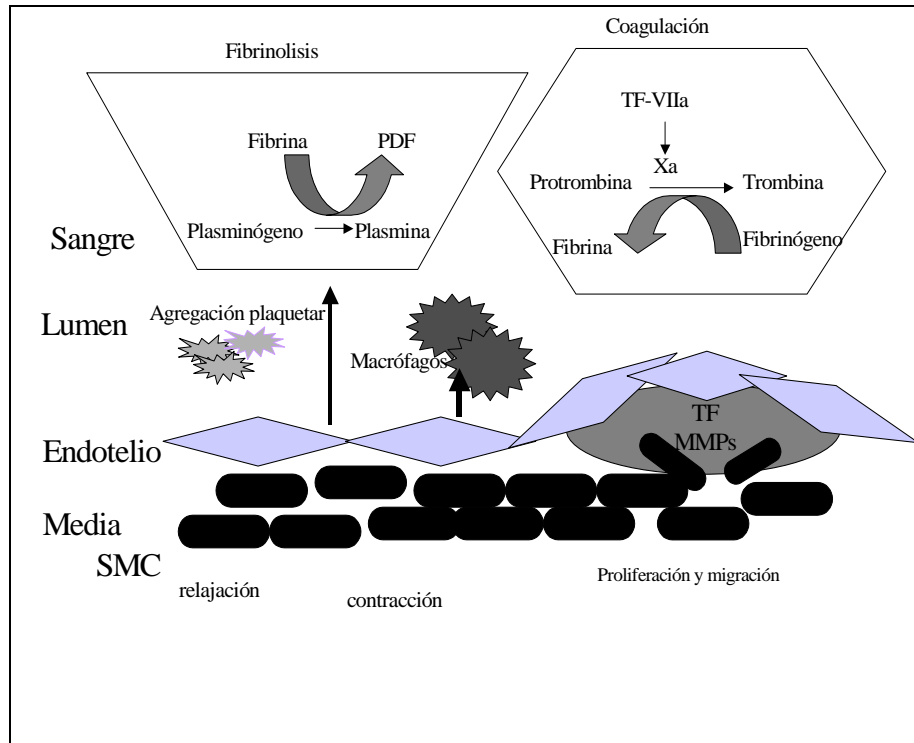


Figura 3. Propiedades antitrombótica y antiaterogénicas del endotelio. Existe una clara predilección de las placas de ateroma por determinadas ramas de las arterias, lo que indica la importancia de las condiciones reológicas de la zona. Una disfunción endotelial genera un ambiente proaterogénico favoreciendo la formación de aterosclerosis y complicaciones trombóticas. Se produce un reclutamiento de células endoteliales dentro de la pared vascular, y el inicio de la placa ateromatosa.

Los monocitos y los macrófagos juegan un papel muy importante en el desarrollo de placas vulnerables. Este tipo de placas, que están compuestas normalmente por un núcleo lipídico abundante separada del la luz vascular por una capa gruesa fibrosa, son particularmente débiles y con capacidad de ruptura. Las plaquetas y las células endoteliales pueden ser una fuente y también la diana de muchos mediadores inflamatorios. Tres factores importantes determinan la vulnerabilidad de la capa: la llamada capa fatigada (*circumferential wall stress*), las características de la lesión como la localización, tamaño y consistencia, y las características del flujo sanguíneo. Sin embargo la ruptura de la placa, no es un proceso puramente mecánico. Las células inflamatorias activadas se detectan en las áreas de ruptura y son capaces de secretar

enzimas proteolíticas como las metaloproteasas. Los macrófagos parecen ser una fuente de factor tisular circulante. La trombogenicidad de la lesión ateromatosa se correlaciona con el contenido de factor tisular. Un hecho que lo corrobora es que la inhibición del factor tisular local reduce dicha trombogenicidad. En la diabetes, la hiperlipidemia y los síndromes coronarios agudos se han objetivado altos niveles de factor tisular circulante. También parecen existir micropartículas circulantes con actividad procoagulante.

La aterotrombosis es el fenómeno final responsable del inicio de los síndromes coronarios y cerebrales agudos. Una vez que se produce la ruptura de la placa, se produce la formación del trombo, y la severidad del síndrome dependerá de la estabilidad del trombo y de la zona donde se sitúe. Además, sucesivas rupturas de la placa y formación de trombos asintomáticos pueden ser responsables de la progresión de la lesión. Una vez que la placa se rompe, la predisposición a nivel local y sistémico son los factores que finalmente dan lugar a la formación del trombo, y la aparición de los síndromes arteriales agudos. Los factores locales incluyen las características reológicas y la composición de la placa. La ruptura de placas ricas en lípidos facilita la interacción entre el factor tisular y la sangre, desencadenando la activación de la coagulación, la generación de trombina, y la formación del trombo. La composición de la placa puede media también la activación plaquetar. Los altos niveles de tromboxano A₂ en los síndromes coronarios agudos apoyan el papel de las plaquetas en la aterotrombosis.

Resumiendo, la aterosclerosis puede contemplarse como una enfermedad compleja, en la que genes polimórficos que actúan como *modificadores* de respuesta en situaciones de riesgo ambientales (dieta, tabaco, ejercicio,...) o en situaciones de riesgo fisiopatológicas.

Las interacciones entre genotipo y fenotipo son complejas como consecuencia de la pleiotropía (un gen puede influir diversos fenotipos), la variación con la edad, la selección por la letalidad de la enfermedad y las interacciones entre los genes y ambiente. (Figura 4)

Dentro de la enfermedad tromboembólica arterial, encontramos dos importantes fenotipos, los síndromes coronarios agudos y la enfermedad cerebrovascular isquémica. Siendo, sin duda, una de las mayores causas de morbimortalidad en los países llamados “desarrollados”, y que se han extendido como una verdadera pandemia de nuestro siglo.

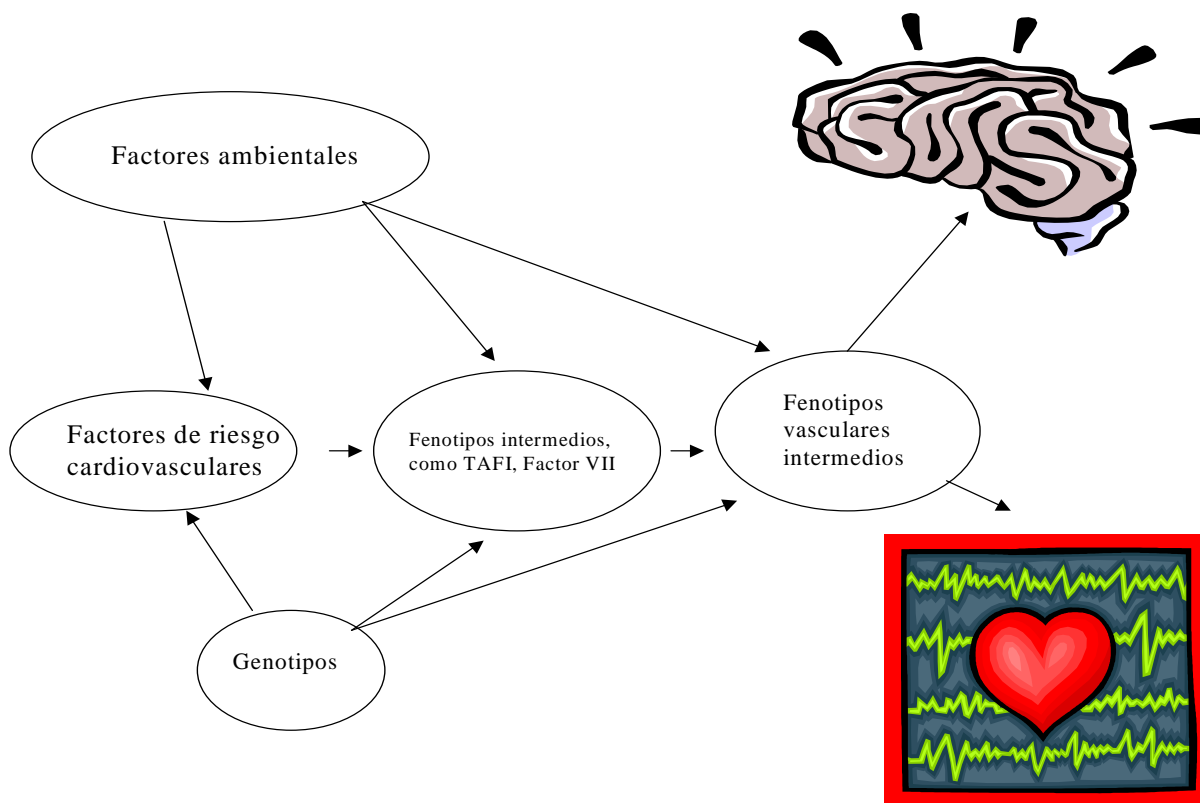


Figura 4. Esquema de la enfermedad tromboembólica como enfermedad compleja, resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales que interactúan con diversos factores de riesgo cardiovasculares, fenotipos plasmáticos intermedios plasmáticos o vasculares que dan lugar bien al desarrollo de enfermedad coronaria aguda o enfermedad cerebrovascular isquémica.

SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS

La angina inestable y el infarto de miocardio son 2 de los síndromes coronarios agudos causados por la ruptura o inestabilidad de las placas de ateroma, resultado de la aterosclerosis y finalmente, de la aterotrombosis en las arterias especialmente afectadas. La ruptura de la placa vulnerable y la formación de trombos, parecen ser los mecanismos etiopatogénicos más plausibles a la hora de explicar el síndrome coronario agudo, y no la simple progresión de la oclusión de la placa y por tanto de la arteria. La existencia de factores de riesgo, tales como la hipercolesterolemia, y la interacción de fenómenos inflamatorios y procoagulantes, serían factores desencadenantes de la oclusión del vaso sanguíneo, y por tanto favorecerían la transición de placa estable a inestable (32).

ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR ISQUEMICA

Dentro de la enfermedad cerebrovascular existen 2 subtipos, el isquémico y el hemorrágico. Dentro de los accidentes isquémicos encontramos 4 entidades diferenciadas básicamente por la etiopatogenia o por la cronología de su presentación clínica. Existen varias maneras consensuadas de clasificar dicha enfermedad, aunque la más utilizada se basa en el estudio, TOAST (34,35). Se distinguen 5 subtipos:

- Aterosclerosis de grandes vasos, con una proporción del 25% del total.
- Enfermedad oclusiva de pequeños vasos (También denominada infarto lacunar), con una proporción del 25%.
- Enbolismo de origen cardiaco, con una proporción del 25 % de la prevalencia total.
- Enfermedad cerebrovascular isquémica criptogénica, que constituye el 20% o más de los casos.
- Existe un 5% de casos que se asocian a enfermedades sistémicas, como enfermedades Moya-Moya, vasculitis,...

Es importante tener en cuenta que hasta un 20% de los casos no se conoce la etiología, es decir, no se puede detectar aterosclerosis ni enfermedad cardiológica. En el resto de los casos parece que la aterosclerosis es una parte fundamental en su desarrollo, aunque no parece ser la única causa. Por ello, esta enfermedad, a pesar de que se conoce bastante sobre su forma de presentación, de su diagnóstico y tratamiento, todavía forma parte de un fenotipo complejo. Existen diversos fenotipos intermediarios, como factores locales o alteraciones de

factores de la coagulación, cuyo papel etiopatogénico todavía no se conocen. Conocer el papel de estos fenotipos intermediarios, nos ayudaran a conocer porque unas personas traspasan el umbral entre no-enfermedad a enfermedad.

FACTORES DE RIESGO TROMBÓTICO EN LA ENFERMEDAD TROMBOEMBOLICA ARTERIAL

En la enfermedad tromboembólica arterial y venosa, como veremos más adelante, existen proteínas plasmáticas y mutaciones o polimorfismos en el DNA, que se han relacionado con el riesgo de padecer trombosis (36-40). Diversos estudios han investigado el papel de alteraciones en genes relacionados con la hemostasia así como diversos factores hemostáticos en pacientes con enfermedad trombótica arterial. La identificación de biomarcadores dentro de los factores hemostáticos, o marcadores genéticos, es de gran importancia para el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad tromboembólica. Además permitirá establecer el perfil cardiovascular protrombótico de cada individuo, y consiguientemente poder llegar a desarrollar terapias personalizadas en un futuro no muy lejano. Como ya se ha mencionado, la enfermedad cardiovascular es una enfermedad compleja, y en los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las bases genéticas y el papel de diferentes fenotipos intermedios, como el factor VII, en la susceptibilidad de desarrollar trombosis. Estos marcadores, solos o en combinación, están asociados con el fenotipo “enfermedad”, y su presencia confiere un alto nivel de probabilidad de enfermedad, tienen un alto poder predictivo, y por tanto pueden ser útiles para establecer el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Hay diferentes maneras de enfocar la búsqueda de marcadores genéticos y existen diferentes estrategias para localizarlos y establecer el riesgo de enfermedad tromboembólica asociado a dichos marcadores. La mayoría de las enfermedades complejas o multifactoriales se han considerado como una variable discreta, dicotómica, con 2 posibles estados: enfermo o no enfermo. Pero la aplicación de la moderna genética de las enfermedades complejas ha permitido interpretar la predisposición de cada individuo a padecer una enfermedad como una variable continua de riesgo, es el concepto de susceptibilidad o *liability* de desarrollar la enfermedad. Esta variable es un fenotipo complejo, que no se puede medir directamente, pero se puede deducir a partir de modelos matemáticos. El conjunto de genes responsables y las diferentes interacciones determinan la susceptibilidad genética. Aquel sujeto que sobrepase el umbral del gradiente de susceptibilidad, manifestará el fenotipo complejo o enfermedad. En otras palabras, lo que está regulado genéticamente es la predisposición a padecer una enfermedad, no la enfermedad en sí misma. De ello se desprende que la mayoría de las

enfermedades no siguen un modelo de herencia monogénica mendeliana, sino que siguen un patrón de herencia oligogénica o poligénica, y son multifactoriales (2,3,41).

Tradicionalmente, el diseño y la metodología empleada para abordar el estudio de las enfermedades cardiovasculares se basaban en el estudio de factores de riesgo mediante los estudios de asociación con cohortes o de caso-control. Estos estudios han sido ampliamente utilizados en la literatura médica, generalmente utilizando marcadores genéticos en genes candidatos. En función de los resultados se establece la relación de este factor con el riesgo a padecer la enfermedad. Pero, esta asociación no implica causalidad. Estos tipos de estudios, *a priori*, no son adecuados para establecer causalidad de las variantes genéticas con el desarrollo de la enfermedad, aunque son útiles tanto para la identificación de factores de riesgo como son factores ambientales o fenotipos intermedios tipo factores hemostáticos plasmáticos. Debido a la accesibilidad de la realización de estos estudios de asociación con marcadores genéticos de genes candidatos, se han generado una gran cantidad de resultados variables y muy contradictorios, lo que ha generado una gran confusión en el ámbito de la medicina (41,42). Gracias a los avances y a la sofisticación de la estadística genética y capacidad computacional, se han desarrollado modelos matemáticos más eficaces y muy potentes para la disección genética de rasgos cuantitativos complejos. La metodología que se utiliza se basa en la genética de rasgos cuantitativos en estudios familiares.

Los efectos genéticos se cuantifican en términos de heredabilidad (h^2), que se define como la proporción de la variancia en un fenotipo atribuible a los genes. La estimación de la heredabilidad es indispensable para posteriormente intentar localizar los genes implicados. Los métodos estadísticos se basan en el análisis de los componentes de la variancia. Una vez que se demuestra que el fenotipo tiene una alta heredabilidad, el siguiente paso es encontrar los *loci* que contienen genes que influyen en la variabilidad del fenotipo. Estos *loci* son los llamados QTL (*quantitative trait loci*). La metodología estadística para localizar QTL se basa en los análisis de ligamiento para rasgos cuantitativos. Los estudios de ligamiento permiten demostrar la cosegregación dentro de una familia de una enfermedad y de las variantes genéticas responsables. Permite no sólo localizar el QTL responsable del fenotipo observado, bien enfermedad bien un fenotipo intermediario, sino también permite estimar la variabilidad fenotípica atribuible a ese QTL en la población estudiada. Por ello, y a diferencia de los estudios de asociación genéticos, permiten detectar genes desconocidos causantes de

enfermedad, y establecer relaciones de causa-efecto. En la búsqueda del QTL, tras localizar la posible región cromosómica candidata, existen diferentes estrategias para continuar explorando la zona candidata. Dependerá de si en la región a estudiar existe algún gen candidato conocido o no, que pueda ser responsable de la señal de ligamiento con el fenotipo a estudio. Si no tenemos ningún gen candidato dentro de la región estudiada, se puede utilizar el análisis de desequilibrio de ligamiento y posteriormente realizar la secuenciación de la zona para localizar el gen. Si por el contrario, tenemos algún gen candidato en la región, la tarea puede ser más fácil. Pero, a pesar de ello, antes de aceptar dicho gen candidato ha de ser sometido a un riguroso proceso de evaluación, que implica inicialmente la completa secuenciación del gen para detectar todos los posibles polimorfismos o variantes alélicas funcionales. A partir de aquí, se necesitarán estudios de asociación que demuestren la correlación entre los polimorfismos funcionales y la variabilidad fenotípica, y posteriormente establecer su funcionalidad. Ello se conoce como Genómica Funcional. Actualmente el Proyecto Genoma Humano ha permitido localizar una gran cantidad de genes ubicados en diferentes regiones, y que se podrán utilizar posteriormente para conocer su función (2,3,42).

En nuestra Unidad se comenzó en el año 1995, el Proyecto GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia). El último objetivo de este proyecto es la localización de los genes que influyen sobre los fenotipos de la hemostasia y sobre el riesgo de enfermedad tromboembólica. La muestra se compone de familias extensas, por definición con 3 o más generaciones y con más de 10 miembros por familia. En total, 21 familias y 398 individuos. A todos estos individuos se les realizó una batería de análisis plasmáticos de 45 fenotipos relacionados con la coagulación, la fibrinólisis, el metabolismo lipídico y de la homocisteína y otra batería de marcadores genéticos. Para ello se siguieron dos estrategias, el análisis de genes candidatos y el análisis global del genoma. Dentro de los genes candidatos, se realizaron marcadores genéticos completamente ligados a genes conocidos que codifican para proteínas de la hemostasia. Se incluyeron también polimorfismos dialélicos asociados con la trombosis como es el dimorfismo 46 C/T en el gen estructural del factor XII (2,3,43).

Todos los fenotipos estudiados fueron cuantitativos y continuos, es decir, son fenotipos complejos. En la mayoría de ellos se observó que existía una importante base genética. Por ejemplo, el componente genético del tiempo de la coagulación que explora la vía intrínseca (TTPa) es de un 83%. Y en la mayoría presentaban valores superiores al 40 %. Un importante

hallazgo, fue el análisis de la trombosis como un fenotipo muy particular: el riesgo o susceptibilidad de trombosis tanto arterial como venosa. La heredabilidad de este fenotipo es alta, de un $61\% \pm 16$. Este resultado implica que el 61% de las causas de un episodio de trombosis se debe a la estructura genética del individuo, y es la primera cuantificación del componente hereditario de esta enfermedad. Otro dato relevante, es el concepto de que tanto la enfermedad tromboembólica arterial como venosa comparten parte de la base genética. Por ello muchos de los marcadores genéticos pueden tener efecto en el desarrollo de la enfermedad tromboembólica (2,3).

Ante el problema arrastrado durante décadas en la investigación médica, y para evitar el mal uso y las posibles falsos positivos y negativos derivados de los estudios de asociación que utilizan marcadores genéticos, se han publicado recientemente 2 editoriales que establecen los pasos a seguir a la hora de realizar estudios de asociación con polimorfismos genéticos (44,45). Las recomendaciones a seguir incluyen:

1-La heredabilidad del fenotipo a estudio debe haber sido establecida, a menos que exista evidencia de que ese fenotipo está influido por factores genéticos.

2-La elección del marcador genético a estudio, debe basarse en una hipótesis *a priori* establecida, y siempre con argumentos bien posicionales o funcionales.

3-En los estudios caso-control, los sujetos deben de ser incluidos si proceden del mismo origen étnico y geográfico, y evitando otras posibles covariables confusoras, como indicadores sociales, etc.

4-Si el estudio no se diseñó primariamente para establecer una asociación, los datos se deben replicar en una población independiente, o bien se deben realizar estudios funcionales *in vitro*. Si no es posible, se debe argumentar en la discusión la necesidad de validar los resultados en muestras independientes.

5-Las asociaciones se deben establecer en términos estadísticos tales como el efecto estimado y medidas tales como *odds ratio* y los intervalos de confianza. Si se utilizan los valores de *P*, la hipótesis y los resultados en función de las diferentes correcciones deben de ser explicadas.

6-No sólo se deben publicar asociaciones positivas, porque ello lleva a resultados sesgados. Por ello se deben publicar los resultados negativos, sobre todo si existen ya datos de asociaciones positivas. En cualquier caso los autores deben ilustrar el poder de su muestra y el efecto negativo que ha servido para excluir la asociación.

7-La publicación de asociaciones si ya son conocidas, debe basarse en la aportación de nuevos aspectos científicos.

Otro concepto importante, a tener en cuenta es la existencia y el conocimiento de las posibles interacciones gen-gen y gen-ambiente, aunque por el momento apenas existe información sobre estas interacciones. La interacción gen-ambiente es un ejemplo de la variabilidad de la respuesta biológica a los factores ambientales tanto externos como internos, como sería el tabaco o la comida rica en colesterol, en función de las diferentes variaciones genéticas de cada individuo. Este concepto, toma mayor relevancia, cuando se habla de enfermedad tromboembólica arterial. Factores como la dieta, el estrés, el tabaco y otros factores de riesgo ambientales, como los anticonceptivos orales, pueden hacer que la balanza hemostática se incline a favor de la interacción con los genes de algunos individuos relacionados con la susceptibilidad de desarrollar trombosis, y finalmente, dar lugar a enfermedad. Se conoce la importancia de estos factores gracias a estudios epidemiológicos, pero lo que todavía no se ha podido dilucidar es la respuesta biológica de los diferentes genes a los factores ambientales. Es sin duda, un campo a explorar en los próximos años, y que nos ayudará a desarrollar campañas de Salud Pública e individuales, basadas en el conocimiento científico de la carga genética protrombótica de cada individuo y su respuesta biológica a la exposición de los diferentes factores de riesgo ambientales.

FACTORES BIOLÓGICOS DE RIESGO TROMBÓTICOS (GENÉTICOS Y PLASMÁTICOS)

Existen infinidad de estudios de asociación de polimorfismos y fenotipos hemostáticos con el riesgo de enfermedad tromboembólica y algunos fenotipos intermedios como serían la aterosclerosis de la carótida. En cuanto a los factores hemostáticos, estos se consideran fenotipos intermedios, y por tanto, su estudio y relevancia en la susceptibilidad de la enfermedad tromboembólica son muy importantes. Tanto establecer si son niveles altos como bajos, los que se van a relacionar con la enfermedad nos permitirá conocer la etiopatogenia.

Por supuesto existen muchos en la literatura, aunque sólo hablaremos de los más comúnmente aceptados (46-55). Entre ellos a pesar de que los resultados en los diferentes estudios de asociación son contradictorios, se encuentran:

Polimorfismos en genes que codifican glicoproteínas de membrana plaquetar.

Glicoproteína Ia-IIa.

El polimorfismo *C708T* se ha asociado en diferentes estudios al riesgo de enfermedad tromboembólica arterial. Otro polimorfismo recientemente estudiado es el *Glu505Lys*, aunque se relaciona con enfermedad vascular no se ha demostrado correlación funcional.

Glicoproteína Ib-V-IX.

Se han descrito 2 polimorfismos, el HPA-2 perteneciente al sistema de los aloantígenos y el polimorfismo VNTR (variable number of tandem repeat), aunque existen resultados contradictorios en los diferentes estudios de asociación. Otro polimorfismo se ha descrito en la secuencia Kozak de la GpIb, un dimorfismo T/C en el nucleótido B5, aunque el papel en la enfermedad tromboembólica todavía está por esclarecer.

Glicoproteína IIb-IIIa.

Se han descrito varios polimorfismos. Uno de ellos se encuentra en el gen de la GpIIIa, el polimorfismo T155C, otro es el polimorfismo PLA2 que se ha relacionado más con el riesgo de enfermedad cerebrovascular isquémica. El polimorfismo GpIIb Ile-843Ser también se ha relacionado con el riesgo de infarto agudo de miocardio.

Factores de la Coagulación

Fibrinógeno

El fibrinógeno se ha relacionado con bastante consistencia y en repetidos estudios con el riesgo de tromboembolismo arterial, aunque con la venosa esa asociación no parece confirmarse. El fibrinógeno se incrementa con la edad y en fumadores. También los exfumadores muestran niveles superiores. Otras situaciones que incrementan los niveles de fibrinógeno son las siguientes: embarazo, menopausia, anticonceptivos hormonales, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes, estrés, estacional (invierno), y la infección, y también factores hereditarios como el polimorfismo G455A en el promotor del gen de la cadena β del fibrinógeno. Puede disminuir con el ejercicio físico y el consumo moderado de alcohol. Los niveles de fibrinógeno aumentan crónicamente en presencia de factores de riesgo vascular y de manera aguda en respuesta a la lesión, cirugía, infecciones e infartos. También es el principal cofactor en la agregación plaquetaria mediante la unión a su receptor en la superficie de las plaquetas, la glicoproteína IIb/IIIa.

Diversos trabajos han mostrado que el fibrinógeno está asociado a cardiopatía isquémica de la misma manera que los niveles de colesterol y que también está elevado en pacientes con ictus

isquémico y con enfermedad arterial periféricos. Estudios prospectivos han confirmado que el fibrinógeno es un factor de riesgo primario de enfermedad cardiovascular en individuos considerados sanos. Los niveles elevados predisponen a eventos fatales y no fatales. Así, los individuos con niveles en el tercio superior de la distribución tenían más riesgo de problemas cardiovasculares que los del tercio inferior. El incremento de fibrinógeno parece aumentar el riesgo de manera sinérgica con los niveles de colesterol-LDL y la presión arterial. Además, la hipertensión y la hipercolesterolemia, sólo comportaron riesgo de cardiopatía isquémica si el fibrinógeno estaba elevado. En pacientes que ya han sufrido problemas cardiovasculares, los niveles elevados son indicativos de un incremento de la mortalidad y de las recurrencias. Así, también puede considerarse como un factor de riesgo pronóstico.

Diferentes polimorfismos o variantes genéticas se han descrito en los tres genes codificantes localizados en el brazo largo del cromosoma 4. Recientemente, se ha descrito la asociación de algunos haplotipos contruidos a partir de polimorfismos en los genes estructurales con el riesgo de infarto de miocardio, aunque esta asociación es débil, y ni los haplotipos ni los SNPs (Single nucleotide polymorphisms) estudiados se asociaron a los niveles de fibrinógeno (56). En el proyecto GAIT se han descrito varios SNPs en el cromosoma 12 dentro del gen TCF1 asociados a los niveles de fibrinogeno, aunque no se ha establecido su posible relación con el riesgo de trombosis (57). El papel de otro polimorfismo, el Thr-312Ala, todavía no se conoce, aunque parece estar relacionado con la región de unión con el factor XIII, y por tanto, parece que daría lugar a trombos con fibras más gruesas. También parece estar relacionado con trombosis venosa y el fenómeno tromboembólico.

Factor II

Los niveles altos se han relacionado con el riesgo de trombosis venosa, pero los resultados en diferentes estudios no permiten establecer un nivel a partir del cual se pueda establecer como factor de riesgo

El polimorfismo más conocido es el FII G20210A que, además de dar lugar a un aumento de los niveles de protrombina, se asocia con la enfermedad tromboembólica venosa y arterial. Está asociado a un aumento entre 2-3 veces de riesgo de trombosis venosa. Aunque los resultados han sido contradictorios en función de las diferentes poblaciones estudiadas, sobre todo en relación a la enfermedad tromboembólica arterial.

Factor Tisular (TF)

La secuenciación de la zona promotora del gen, ha dado lugar a la identificación de 6 nuevos polimorfismos, que se distribuyen en 2 haplotipos de igual frecuencia, designados como 1208D y 1208I. Aunque están asociados con los niveles de fibrinógeno, no existe evidencia de asociación del genotipo 1208 D/I con la enfermedad trombótica arterial.

Factor V

Se ha estudiado la asociación de niveles de factor V, funcional y antigénico en pocos estudios. El factor V funcional se asoció con el riesgo de infarto agudo de miocardio en unos trabajos, mientras que los niveles de factor V antigénico no se asociaron con enfermedad tromboembólica venosa en otros. Dentro de los polimorfismos, la mutación factor V Leiden ha sido la más estudiada, y ampliamente asociada al riesgo de enfermedad tromboembólica venosa. No obstante, ni la resistencia a la proteína C activada ni esta mutación se ha asociado de manera inequívoca al riesgo de enfermedad tromboembólica arterial.

Factor VII

Los niveles altos de factor VII se han asociado con el riesgo de trombosis, aunque en los últimos estudios no se ha confirmado dicha asociación.

Varios polimorfismos en el gen *F7* se han indentificado, e influyen en los niveles de factor VII. Los más conocidos son el polimorfismo -402 y la mutación Arg-353Gln. Aunque el proyecto GAIT ha demostrado que esta última mutación está en desequilibrio de ligamiento con otros polimorfismos, lo que explicaría los contradictorios resultados de los diferentes estudios de asociación. Además, en la mayoría de los polimorfismos no se ha podido demostrar su asociación con la enfermedad tromboembólica (58,59).

Factor VIII

En cuanto a los niveles de factor VIII, parece que todos los estudios coinciden en asociarlos con el riesgo de enfermedad tromboembólica venosa. También existe una asociación entre los niveles de factor VIII y el grupo sanguíneo, siendo el grupo O, el que mostraría niveles más bajos de factor VIII (60). Sin embargo, en cuanto a la enfermedad arterial, no existe el mismo consenso. Parece que la deficiencia de factor VIII sería un factor protector de enfermedad arterial. Y en varios estudios longitudinales, parece que se ha establecido la relación entre niveles altos y mortalidad por eventos trombóticos agudos.

Hoy en día no se han descrito polimorfismos asociados al riesgo de trombosis.

Factor IX

En varios estudios, los niveles altos del factor IX funcional y el antigénico se han asociado con trombosis venosa (61). Hay pocos estudios en cuanto al riesgo de trombosis arterial. Pero en un estudio sobre infarto de miocardio se demostró que de la activación del factor IX era muy importante en el desarrollo del trombo. Otro estudio en enfermedad cerebrovascular isquémica observó que el uso terapéutico en modelos animales de inhibidores del factor IX mejoraba el pronóstico y la evolución de la enfermedad.

Factor X

Se ha comprobado que los niveles de factor X se elevan en el embarazo y con el uso de anticonceptivos orales. Aunque la relación entre los niveles altos y la trombosis arterial no ha sido demostrada. Aunque el estudio LETS estableció que era un factor de riesgo de trombosis venosa.

Factor XI

El factor XI tanto funcional como antigénico se han asociado con el riesgo de desarrollar trombosis venosa. En cuanto al síndrome coronario agudo, hay estudios que han encontrado relación con los niveles de factor XI. En datos de nuestra cohorte hemos encontrado asociación de enfermedad cerebrovascular isquémica en pacientes dislipémicos con niveles altos de factor XI (62,63).

Factor von Willebrand

El factor von Willebrand ha sido extensamente estudiado. Todos los estudios realizados asocian niveles altos de este factor con el desarrollo de enfermedad tromboembólica arterial, tanto enfermedad cerebrovascular, como infarto de miocardio, enfermedad arterial periférica, y muerte súbita. En cuanto a la trombosis venosa es un factor de riesgo que pierde poder estadístico cuando se introducen los niveles de factor VIII, lo que refleja la importante relación entre ambos factores.

Algunos polimorfismos, como el C1234T y el G1051A en el gen estructural que codifica dicho factor se han asociado con el riesgo de infarto de miocardio, aunque sin duda la asociación es muy débil y poco contrastada.

Factor XIII

La mutación FXIII Val-34Leu se ha asociado a un efecto protector contra el infarto de miocardio y el riesgo de recurrencia. Aunque su papel en esta enfermedad todavía está por determinar (64).

Factores del sistema anticoagulante natural

Antitrombina, Proteína C y proteína S

La deficiencia de estos inhibidores y las diferentes mutaciones asociadas no se han relacionado claramente con el riesgo de enfermedad tromboembólica arterial. A excepción del riesgo de enfermedad cerebrovascular isquémico descrito en niños con dichas deficiencias.

Trombomodulina

El polimorfismo C2136A se ha asociado con el riesgo de infarto de miocardio. Otros polimorfismos estudiados, son el Asp-468Tyr y el Ala-25Thr, con diferentes resultados, en cuanto a su asociación a riesgo de enfermedad trombótica, en la bibliografía. Otro polimorfismo potencialmente asociado con el riesgo de tromboembolismo arterial es el polimorfismo en la región promotora del gen de la trombomodulina (-33 G/A) (65,66).

Tissue-factor pathway inhibitor (TFPI)

La secuenciación sistemática del gen del TFPI ha dado como resultado la identificación de varios polimorfismos, como el Pro-151Leu, Val.264Met, pero no se conoce su relación con los niveles de TFPI ni el riesgo protrombótico.

Receptor endotelial de la proteína C (EPCR)

Se ha identificado recientemente el gen del EPCR, así como una inserción de 23-pb en el exón 3. Parece estar implicado en el desarrollo de la aterosclerosis, aunque su papel de la enfermedad tromboembólica necesita la realización de estudios prospectivos.

Proteína Z

Los niveles bajos de proteína Z, un glicoproteína vitamino-k dependiente, se han asociado con el riesgo de desarrollar enfermedad tromboembólica, tanto síndromes coronarios agudos como enfermedad tromboembólica arterial, aunque esta asociación no ha sido confirmada en otros estudios. En cuanto a polimorfismos, se han descrito algunos que se han relacionado con los niveles de proteína Z, pero no existen estudios sobre su posible asociación con la enfermedad tromboembólica (67,68).

Factores de Sistema Fibrinolítico

Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1)

La hipofibrinólisis parece estar implicada en la formación y la progresión de la enfermedad aterotrombótica. Los niveles elevados de PAI-1 se han implicado como posibles causantes de hipofibrinólisis, pero no existe consenso en este punto. Recientemente se está trabajando en identificar los factores que pueden intervenir en la arquitectura del trombo, ya que se han identificado trombos con diferente porosidad hacia los factores que intervienen en la fibrinólisis, lo que podría condicionar la resistencia del trombo a la degradación.

Varias variantes genéticas en el gen del PAI-1, una VNTR o una inserción/delección 4G/5G en

la región promotora. Esta última se ha relacionado con el riesgo de enfermedad cardiovascular, que no se ha confirmado en estudios posteriores.

Activador tisular del plasminógeno (t-PA)

De los muchos cambios en las secuencias de nucleótidos que se han descrito en el gen del t-PA, el más estudiado es una inserción/delección de 311-bp Alu en el intrón 8. Aunque los resultados de asociación con los niveles t-PA y la trombosis no fueron muy alentadores, se buscaron nuevos polimorfismos en desequilibrio de ligamiento relacionados con la liberación de t-PA local, el B7351C/T en la región amplificadora, 20 099T/C en el exón 6 y 27 445T/A en el intrón 10. Parece ser que en el caso del primero, se ha encontrado asociación con el riesgo de infarto agudo de miocardio.

TAFI

Se han descrito varios polimorfismos en el gen del TAFI, 9 en la región promotora, 2 en la región 3 no traductora (3'UTR) y 3 en la región codificadora. Están en desequilibrio de ligamiento y forman principalmente 4 haplotipos. Aunque el estudio de los diferentes polimorfismos ha demostrado que están en desequilibrio de ligamiento con otro QTL todavía desconocido. Solo el polimorfismo Ala147Thr ha mostrado asociación con la enfermedad coronaria arterial aunque en otro estudio el alelo 147Thr confería un efecto protector (71-76).

Anticuerpos antifosfolípidos

Los anticuerpos antifosfolípidos son un heterogéneo grupo de autoanticuerpos dirigidos contra estructuras fosfolípicas unidas a determinadas proteínas. La positividad del anticoagulante lúpico es el factor más relacionado tanto con la trombosis venosa como arterial (77). Otros anticuerpos más implicados en trombofilia son los anticardiolipina y los antifosfatidilserina. Las proteínas que participan son en algunos casos la propia protrombina y en otros la β_2 -glicoproteína-I. Clínicamente, los pacientes con anticuerpos antifosfolípidos presentan un riesgo incrementado de trombosis. Se han encontrado positivos en el 4.18% de pacientes con trombosis venosa. En el caso de que además se asocie trombocitopenia autoinmune, *livedo reticularis* y pérdidas fetales de repetición, se habla de síndrome antifosfolípido primario si no se asocia a ninguna enfermedad subyacente, o secundario en caso de que exista esta asociación.

THROMBIN-ACTIVABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI)

El TAFI es una procarboxipeptidasa, miembro de la familia de las metalocarboxipeptidasas. Estas enzimas circulan en plasma y también están presentes en tejidos como el páncreas e hidrolizan los puentes peptídicos C-terminal. El grupo de las carboxipeptidasas consiste en las serin-carboxipeptidasas, las arginin-carboxipeptidasas y las anteriormente mencionadas, metalocarboxipeptidasas. Dentro de las metalocarboxipeptidasas, se encuentra la llamada carboxipeptidasa N (CPN) y el TAFI (78-88).

Descubrimiento del TAFI

En 1988, ya se constató la presencia de una actividad carboxipeptidasa lábil en suero que interfería en la medida de los niveles de CPN. Esta nueva carboxipeptidasa no tenía actividad en plasma pero aparecía tras la activación de la coagulación en sangre. Era diferente de la CPN en términos de estabilidad, pH óptimo y especificidad de sustrato.

Debido a su gran inestabilidad térmica, se llamó inicialmente CPU (carboxipeptidasa U, U de “*unstable*”). Luego debido a su actividad arginin-carboxipeptidasa inducida por la coagulación, se denominó CPR, y más tarde otro grupo en el contexto de otro experimento descubrieron esta misma enzima con actividad pancreática similar a CPB, por lo que la denominó CPB. Wang y colegas constataron finalmente que CPU y CPB eran la misma enzima. Bajzar y colegas, en 1995, purificaron dicha enzima y demostraron que podía ser activada por la trombina y que estando activa era capaz de inhibir la fibrinólisis, por lo que la llamaron TAFI. Siendo TAFI el zimógeno, mientras que la forma activa se denomina TAFI activada o funcional.

Caracterización, síntesis y propiedades del TAFI

Se sintetiza en el hígado y megacariocitos como un prepropéptido que consiste en 423 aminoácidos. TAFI es una glicoproteína con un peso molecular de 55 KDa.

El gen del TAFI se encuentra en el cromosoma 13q14.11 y contiene 11 exones y tienen una longitud de 48 kb. La transcripción se puede iniciar en múltiples regiones. Se codifica un producto de 423 aminoácidos. Pero existe, debido a diferentes mecanismos moleculares, disparidad en cuanto a la masa molecular. Se conocen 2 isoformas, que funcionalmente son iguales. En la Figura 5, se puede observar la organización del gen del TAFI, la proteína y el proceso proteolítico. Como la transcripción se puede iniciar al menos en 9 regiones, la región 5' no-traducible puede estar compuesto desde 9 a 49 bases. Existe una mayor variación en la

longitud de la transcripción facilitado por 3 regiones de poliadenilización que produce productos de transcripción de diferentes tamaños en la región 3`no-traducible. Se forma el llamado, Pre-TAFI. En el proceso proteolítico actúa una proteasa que libera la señal peptídica y se libera el TAFI del pre-TAFI. La activación proteolítica del TAFI, por medio de la trombina- trombomodulina, la plasmina o por liberación de tripsina da lugar a un péptido de activación y la formación del TAFIa. Posteriormente, un cambio conformacional y potencialmete reversible del TAFIa, resulta en la formación de un producto inactivo, el TAFIai. La fragmentación por medio de la trombina o la plasmina en la posición Arg302 del TAFIai, produce una inactivación irreversible del TAFIa.

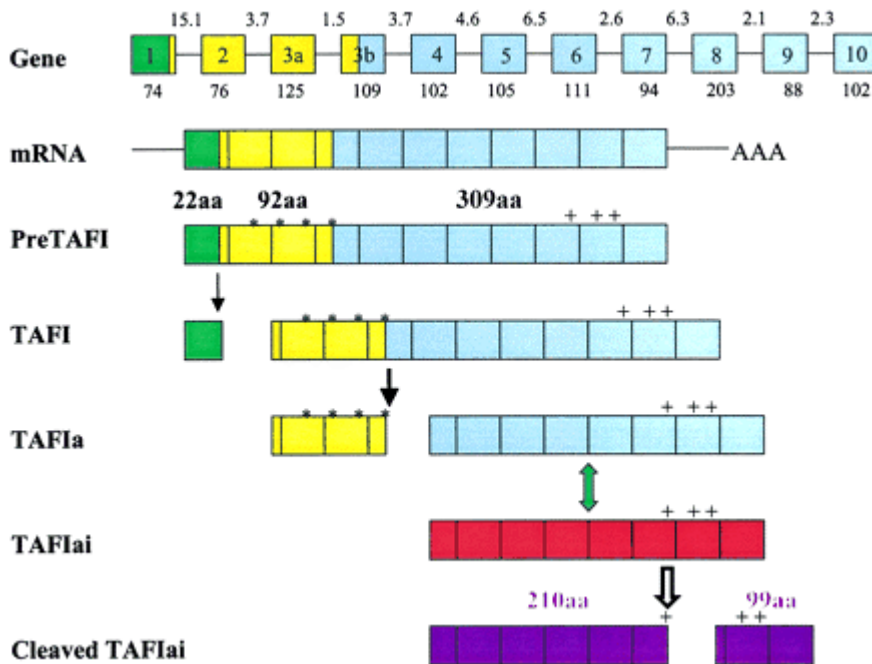


Figura 5. Visión general del gen y la proteína del TAFI. El gen del TAFI está compuesto por 11 exones. A partir del mRNA se sintetiza en hígado el PreTAFI, un propéptido compuesto por 423 aminoácidos. La región N-terminal es eliminada por secreción, y posteriormente se produce una fragmentación a nivel de Arg-92 y da lugar al TAFIa. Posteriormente se inactiva por un cambio conformacional, el llamado TAFIai. Por proteólisis a nivel de la Arg-302 mediante trombina se degrada y se producen diferentes fragmentos

Activación del TAFI

La activación del TAFI es catalizada por la plasmina, tripsina y la trombina, y el lugar de fragmentación esta en la región Arg92. El TAFIa exhibe al menos una afinidad 10 veces inferior por el plasminógeno, lo que parece indicar que la unión al plasminógeno podría ser potenciada por el péptido de activación, aunque el papel fisiológico de esta interacción no ha sido elucidado. La trombina no activa el TAFI y requiere concentraciones elevadas de alrededor de 500 nmol/L para activar el TAFI en 10 minutos, mediante Hippuryl-Arg hidrólisis. La activación del TAFI ocurre simultáneamente a la formación de fibrina en sangre. Esta activación por trombina se potencia con la presencia de trombomodulina. Parece que la trombomodulina amplifica la eficacia catalítica de la activación del TAFI dependiente de la trombina unas 1250 veces. La activación del TAFI se produce de una forma similar a la activación de la proteína C por la trombomodulina, y en dicha activación están implicados los dominios EGF-like del 1 al 6, presentes en la trombomodulina soluble. Pero en el caso del TAFI, están implicados los dominios EGF-like del 3 al 6, y del 4 al 6 en la activación de la proteína C. Los anticuerpos anti-EGF-like, impiden tanto la activación del TAFI como de la proteína C. Estos datos sugieren que diferentes elementos de la trombomodulina, formando un complejo con la trombina, interactúan con la proteína C y el TAFI, produciendo una mayor activación y potenciación de ambos sustratos. La trombina también contiene diferentes dominios para mediar la activación de la proteína C y el TAFI. Aunque hay diferencias estructurales en el complejo trombina-trombomodulina en ambos procesos, el modelo muestra un paralelismo entre ellos y también asegura un equilibrio hemostático. La trombomodulina celular y la soluble son capaces de activar al TAFI. Y aunque la trombomodulina celular es la más importante en este proceso, la trombomodulina soluble alarga el tiempo de lisis del coágulo. Otro importante punto a tener en cuenta, es la cantidad de protrombina en plasma, como la activación cuantitativa de la protrombina puede darse en el trombo, las altas concentraciones de trombina pueden tener un papel importante en su activación. Esta posibilidad es la que puede dar alguna explicación racional a la prolongación del tiempo de lisis XI-dependiente. Además, se ha descrito una activación dosis-dependiente de trombomodulina, ya que a menor cantidad parece activar al TAFI, mientras que a altas concentraciones activa a la proteína C. Ambos hechos, explican la paradoja de ambos procesos, la activación de la proteína C y del TAFI, por el mismo modelo, ya que dependen de

diferentes cambios conformacionales y de sus concentraciones en los diferentes lugares del organismo.

También se produce la activación del TAFI de manera fisiológica mediante la plasmina, y es 8 veces más potente que la trombina, sobre todo en presencia de glicosaminoglicanos como los encontrados en la matriz extracelular.

Inhibición de la Fibrinólisis mediante el TAFIa

El tiempo de lisis se incrementa en función de la concentración del TAFIa,. Con una concentración de 10 nmol/L se obtenía la máxima prolongación y se saturaba el proceso. Dado que la concentración de TAFIa en plasma es de 75 nmol/L, es más que suficiente como para inhibir la fibrinólisis. Sin embargo, la concentración en plasma varía entre individuos. Mosnier y colegas demostraron en su población una variación entre el 38% y 169%, dependiendo del tipo de ensayo utilizado, con una media de 275 nmol/L y que la concentración de TAFI se correlacionaba positivamente con el tiempo de lisis. Teniendo en cuenta que el complejo trombina-trombomodulina activa el TAFI en función de la concentración, se puede esperar que la activación del TAFI también dependa de su concentración en plasma, lo que puede tener implicación en los síndromes hemorrágicos y trombóticos.

De esta forma, la trombina generada en la activación de la coagulación no solamente es responsable de la formación de fibrina sino que también es capaz de protegerla de su lisis mediante la activación del TAFI. Una vez activado el TAFI, actúa sobre la fibrinólisis. Se sabe que la proteólisis de la fibrina, mediada por la plasmina, constituye un potente proceso de retroalimentación positiva que aumenta la activación del plasminógeno. El TAFIa inhibe la fibrinólisis mediante una proteólisis de residuos lisina y arginina de la región carboxi-terminal de la fibrina durante el proceso de lisis, concretamente precisa que la plasmina haya iniciado el proceso de lisis de la fibrina. Como es conocido, son esenciales para la unión y activación del plasminógeno en la superficie de la fibrina. Asimismo, el TAFIa impide la activación del Glu-plasminógeno por el t-PA, en presencia de fibrina parcialmente degradada, no en presencia de fibrina intacta. El TAFIa también inhibe la transformación de Glu-plasminógeno en Lis-plasminógeno mediada por la fibrina y la plasmina. El TAFIa a concentraciones relativamente altas inhibe directamente a la plasmina. Así pues, el efecto antifibrinolítico del TAFIa, reside en su capacidad de la lisis de los residuos lisina C-terminal de la fibrina, ya parcialmente

degradada por la plasmina.

Regulación del TAFI

No se conoce con exactitud como se inhibe el TAFI activo, pero diversos experimentos *in vitro* sugieren que la plasmina y la trombina a concentraciones relativamente altas pudieran inhibirlo mediante una proteólisis parcial de la molécula de TAFIa. Pero en principio parece que es la misma inestabilidad térmica y conformacional del TAFIa la que regula su acción y su conversión en TAFIai. La posterior fragmentación del TAFIai evita su reactivación de una manera permanente. También se ha descrito un potente inhibidor del TAFI activo procedente de la patata (PCI), aunque no se conoce ningún inhibidor natural del TAFI en el organismo humano.

Papel Fisiopatológico del TAFI

El TAFI, al inhibir la fibrinólisis, actúa como un procoagulante de forma que su defecto podría llevar a un estado permanente de fibrinólisis con el consiguiente riesgo de sangrado, y por el contrario su exceso podría causar procesos trombóticos (71-76,90-96). En modelos animales a los cuales se les ha inducido una trombosis arterial se ha demostrado que la infusión del inhibidor PCI junto con el t-PA, incrementa muy considerablemente el efecto trombolítico del t-PA. También se ha estudiado en modelos caninos con trombosis, la actividad del TAFI aumenta durante la trombosis y la terapia trombolítica. En humanos existe poca información sobre su acción y papel en diferentes patologías, en parte debido a la dificultad inicial de los diferentes ensayos utilizados por diferentes grupos. Se ha estudiado en pacientes con leucemia aguda promielocítica, encontrándose una disminución de su actividad, cercana al 60% con niveles normales de TAFI antigénico. En esta entidad se sospecha que esta disminución de la actividad del TAFI se debe a la acción de la plasmina, ya que en estos pacientes habitualmente se detecta una hiperfibrinólisis. También se ha estudiado el TAFI en la angina inestable encontrándose unos niveles elevados que podrían contribuir a la oclusión de los vasos coronarios. Este incremento se cree que es debido a un estado inflamatorio crónico detectado en los pacientes con angina inestable. En pacientes con insuficiencia renal crónica, el TAFI, tanto funcional como antigénicamente, es absolutamente normal y no presenta correlación con los incrementos de complejos plasmina- α 2antiplasmina (PAP), con los complejos trombina-

antitrombina (TAT) ni con la severidad de la insuficiencia renal. También se ha relacionado con el riesgo de trombosis venosa. Además, parece que no sólo tiene acción antifibrinolítica, en algunos casos se ha descrito como una proteína reactiva, y también se ha relacionado con sustratos como la bradiquinina, lo que sugiere que también tendría acción sobre el tono vascular. Estamos por tanto ante una molécula que tiene un papel crucial de puente entre la coagulación y la fibrinólisis, y con posibles mecanismos de acción aún desconocidos. Ello nos conduce a la importancia de profundizar en el posible rol del TAFI en la trombosis así como las posibles variaciones en plasma tanto del TAFI antigénico como el funcional o activo en las diferentes poblaciones.

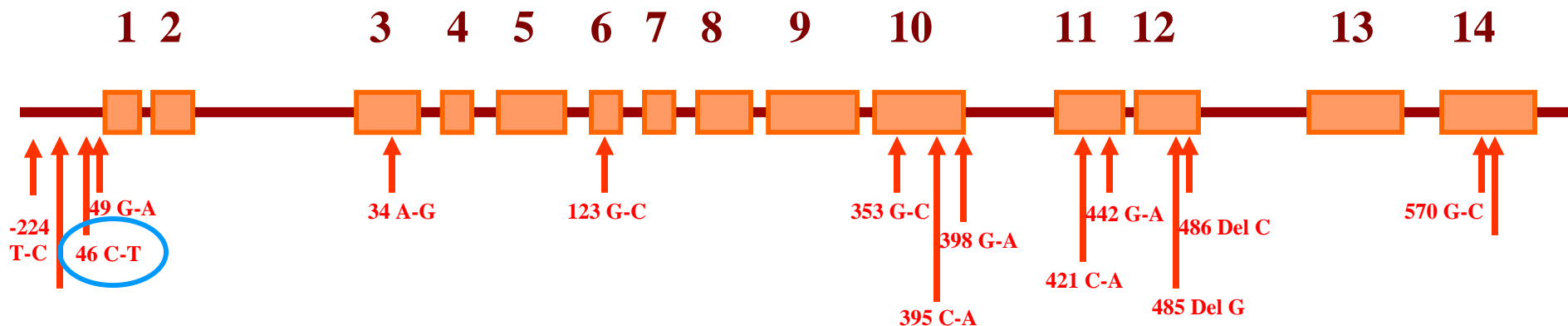
POLIMORFISMO 46 C/T DEL GEN *F12*

El factor XII plasmático es una serin-proteasa que se sintetiza y libera en el hígado. Forma parte de la fase de contacto que activa la vía intrínseca de la coagulación. Aunque también juega un papel importante en la fibrinólisis, en la generación de bradiquinina y en el sistema del complemento. La activación de la vía intrínseca de la coagulación se inicia cuando el plasma entra en contacto con una superficie cargada negativamente como fibras de colágeno o superficies externas como vidrio, caolín etc. El factor XII se activa y el XIIa activa a la precalicreína. La calicreína formada junto con el quininógeno de alto peso molecular amplifican la activación del factor XII que a su vez activa al factor XI, dando lugar a la iniciación de la coagulación a través de la vía intrínseca(41,97-108).

El gen estructural del Factor XII contiene 12 kb y está compuesto de 14 exones. Y está localizado en el cromosoma 5q33. Existe una gran variabilidad en la concentración de factor XII plasmático entre poblaciones y razas, por ejemplo, los orientales presentan aproximadamente la mitad que los caucásicos. La deficiencia de este factor, produce un alargamiento del tiempo de tromboplastina activada, y paradójicamente, no se asocia a desórdenes hemorrágicos, sino que se ha descrito en individuos con tendencia a enfermedades tromboembólicas y se denominó enfermedad de Hageman. En 1995, en la búsqueda de la causa genética de la deficiencia de factor XII, se realizó el análisis de la secuencia de nucleótidos de una familia japonesa, con deficiencia congénita de factor XII, que mostraba una sustitución de Arg por Pro como responsable de la deficiencia. Se identificó un nuevo polimorfismo, la sustitución de citosina por timidina en el exón 1 del gen del factor XII, localizado en la región 5' no-traducible, cerca del codón de traducción ATG, que sugería que sería un polimorfismo funcional que afectaría a los niveles de factor XII. En la Figura 6, se esquematiza la estructura del gen y la secuencia de nucleótidos de la región 5' y el exón 1. Su localización, *in vitro*, demostró que el alelo 46T reducía la eficiencia de la traducción a la proteína factor XII. Se han postulado dos mecanismos que lo explicarían. El primero se basaba en la creación de otro codón de iniciación ATG, que disminuiría la eficiencia de traducción y de reconocimiento por parte de los ribosomas del segundo codón ATG. La segunda explicación vendría avalada por la pérdida del consenso de secuencia de Kozak debido al alelo 46T, que sirve como señal de iniciación de la traducción. Por lo tanto, este polimorfismo, a la vez que reduce la eficiencia de la traducción y también regula la concentración plasmática del producto de la traducción. Por

ello se realizaron estudios en diferentes poblaciones que confirmaron la asociación entre el polimorfismo 46 C/T del gen *F12* y los niveles de factor XII plasmático y antigénico. También se observó que en los orientales la frecuencia de 46T era del 73%, mientras que en los caucásicos, la frecuencia del 46C era del 80%. Este fenómeno explicaría las diferencias raciales de los niveles de factor XII. Dentro del proyecto GAIT (41), se cuantificó la heredabilidad del factor XII que era del 67% y se demostró una correlación significativa con la susceptibilidad de desarrollar trombosis. Además, y como resultado del análisis global del genoma, se detectaron 2 QTL, uno en el cromosoma 5 y otro en el cromosoma 10. El QTL localizado en el cromosoma 5q mostraba relación con los niveles de factor XII. Teniendo en cuenta que el gen candidato del *F12* se localizaba en esa región, se genotipó el polimorfismo 46 C/T en todos los individuos. Al incluirlo en los análisis, se demostró que influenciaba en los niveles del factor XII, y representaba el 40 % de la variancia del factor XII plasmática. Adicionalmente, mediante análisis bivariante se correlacionó la susceptibilidad de desarrollar trombosis y los niveles de XII, y se encontró evidencia de que este QTL en el cromosoma 5 influenciaba el riesgo de trombosis, mientras que el otro QTL en el cromosoma 10 no mostró evidencia de influir el riesgo de trombosis. Además mediante análisis de ligamiento condicional, se demostró que este polimorfismo era funcional, pero que deben existir otros QTL en esa región que también influyen los niveles de XII y la susceptibilidad de desarrollar enfermedad tromboembólica.

Figura 6. Polimorfismos en el gen *F12*, incluyendo el polimorfismo 46 C/T. La sustitución de 46 C por T está localizada a unas bases del codón de iniciación traslacional ATG en el exón 1.



JUSTIFICACIÓN UNITARIA DEL TEMA

La enfermedad tromboembólica arterial es una de las enfermedades de mayor morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. La identificación de los factores de riesgo asociados al incremento del desarrollo de esta patología es de gran importancia, tanto para el conocimiento de su fisiopatología como para llevar a cabo prevención primaria y secundaria. Tanto el TAFI funcional como el polimorfismo 46 *C/T* del gen *F12* son dos factores que se han relacionado con enfermedad tromboembólica venosa, pero no existía información sobre su asociación con la enfermedad tromboembólica arterial incluyendo la enfermedad cerebrovascular isquémica y el síndrome coronario agudo.

Por ello, estudiamos la prevalencia del genotipo 46 *C/T* del gen *F12* y su asociación con la enfermedad tromboembólica en 2 estudios de asociación (caso-control) en población española, incluyendo pacientes con síndrome coronario agudo y enfermedad cerebrovascular, siguiendo las recomendaciones de los expertos a la hora de estudiar la asociación de polimorfismos y enfermedad, y basándonos en los resultados obtenidos en el proyecto GAIT.

En cuanto al TAFI funcional, y teniendo en cuenta la posible importancia de este nuevo factor hemostático en el desarrollo de la enfermedad tromboembólica, llevamos a cabo en ambos estudios de asociación el análisis del riesgo asociado a los niveles de TAFI funcional para establecer su posible papel como nuevo biomarcador de riesgo de trombosis. También analizamos la variabilidad en población española en función de la edad, sexo y otros factores de riesgo cardiovasculares, ya que existe poca información al respecto.

OBJETIVOS

1. Conocer las variaciones del TAFI funcional en función de la edad, sexo y factores de riesgo cardiovasculares convencionales en población española y establecer las correlaciones del TAFI funcional con diferentes factores de la hemostasia.
2. Existencia de asociación entre los niveles de TAFI funcional y el riesgo de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica y síndromes coronarios agudos.
3. Establecer la prevalencia en la población española del polimorfismo del 46 *C/T* del gen *F12* y la asociación entre el genotipo del polimorfismo del 46 *C/T* del gen *F12* con los niveles de factor XII plasmático.
4. Investigar la asociación entre el genotipo del polimorfismo del 46 *C/T* del gen *F12* y los niveles de Factor XII con el riesgo de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica y síndromes coronarios agudos.

Trabajo número 1.

Association of Functional Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) With Conventional Cardiovascular Risk Factors and Its Correlation With Other haemostatic Factors in a Spanish Population. Am J Haematol 2004; 76(4):348-52.

En este trabajo, estudiamos la posible asociación de los niveles de TAFI funcional en población española y sus diferencias en función del sexo y la edad. Se analizó además la relación con diferentes factores de riesgo cardiovasculares como el alcoholismo, la diabetes mellitus, la dislipemia, el tabaquismo y la historia familiar. También se contemplaron las posibles correlaciones con otros factores hemostáticos como el Factor von Willebrand, Factor VIIag, Factor VIIIc, Factor XIIc, Factor XIc, Resistencia a la proteína C activada, proteína C y S, antitrombina, fibrinógeno y t-PA antigénica. Se incluyeron 303 individuos, 167 mujeres y 136 hombres. La edad media fue de 53 años en los hombres y de 48 años en las mujeres.

En cuanto al sexo y a los diferentes factores de riesgo cardiovasculares no encontramos diferencias en los valores medios de los niveles de TAFI funcional. Sólo en las mujeres con edad inferior a 30 años se observaron niveles de TAFI funcional inferiores a las mujeres de mayor edad. Las mujeres con dislipidemia presentaron niveles superiores de TAFI funcional. No se encontró correlación entre los niveles de TAFI funcional y los diferentes factores hemostáticos tras ajustar por edad y sexo.

Trabajo número 2:

Risk of Ischemic Stroke Associated With Functional Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Plasma Levels. Stroke 2003;34:2387-2391.

El objetivo de este estudio fue evaluar el riesgo de desarrollar un accidente cerebrovascular isquémico asociado a los niveles de TAFI funcional en plasma.

Se incluyeron 264 individuos, 114 con accidente cerebrovascular isquémico y 150 controles emparejados en sexo, edad y origen étnico. Se realizó una entrevista que incluía los factores de riesgo cardiovasculares convencionales como la hipertensión arterial, la diabetes, dislipemia, obesidad mórbida, historia familiar de enfermedad tromboembólica arterial, tabaquismo e ingesta de alcohol. En cuanto al estudio de marcadores protrombóticos se incluyeron el Factor VIII, anticuerpos antifosfolípidos, fibrinógeno, la mutación Factor V Leiden y la mutación PT20210A del gen de la protrombina.

En los pacientes con niveles de TAFI funcional superiores al 120% se demostró un aumento del riesgo de desarrollar accidente cerebrovascular isquémico aproximadamente 6 veces superior.

Trabajo número 3:

Risk of Acute Coronary Artery Disease Associated With Functional Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) Plasma Levels. Haematologica 2004;89(7):880-1.

La importancia y el papel del TAFI funcional en el desarrollo de la enfermedad tromboembólica arterial no se conoce bien. Por ello, realizamos un estudio caso-control para evaluar el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria aguda asociado a los niveles de TAFI funcional en plasma.

Se incluyeron 385 individuos, 174 con enfermedad coronaria aguda y 211 controles pareados en sexo, edad y origen étnico. Se realizó una entrevista que incluía los factores de riesgo cardiovasculares convencionales como la hipertensión arterial, la diabetes, dislipidemia, obesidad mórbida, historia familiar de enfermedad tromboembólica arterial, tabaquismo e ingesta de alcohol. En cuanto al estudio de marcadores protrombóticos se incluyeron el Factor VIII, anticuerpos antifosfolípidos y fibrinógeno.

En los pacientes con niveles de TAFI funcional superiores al 126% se demostró un aumento del riesgo de desarrollar síndrome coronario agudo aproximadamente 4 veces superior.

Trabajo número 4.

Homozygosity of the T Allele of the 46 C/T Polymorphism in the F12 Gene is a Risk Factor for Ischemic Stroke in the Spanish Population. Stroke 2004; 35:1795-9.

A raíz de los resultados obtenidos en el Proyecto GAIT (Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia), en el que se demostraba una heredabilidad del fenotipo Factor XIIc del 67%, y que el polimorfismo 46 C/T en el exón 1 del gen *F12* influía tanto los niveles del factor XIIc como el riesgo de trombosis, y siguiendo las nuevas directrices establecidas para el estudio de polimorfismos genéticos en estudios de asociación, en este trabajo se investigó el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico asociado al polimorfismo 46 C/T del gen del Factor XII en población española.

Se incluyeron 436 individuos, 205 pacientes con accidente cerebrovascular isquémico y 231 controles emparejados por edad, sexo y origen español. Se realizó un cuestionario que incluía la recogida de factores de riesgo cardiovasculares como hipertensión, dislipemia, diabetes, tabaquismo, ingesta de alcohol e historia de enfermedad tromboembólica. En el análisis de los marcadores protrombóticos se midieron los antifosfolípidos, el factor VIIIc, el fibrinógeno, y el factor XIIc. En los resultados se observó una importante asociación de los niveles de Factor XIIc en función de los diferentes genotipos. El genotipo T/T, además de asociarse a niveles inferiores de Factor XII, también se asoció a un riesgo superior de desarrollar un accidente isquémico cerebrovascular (OR: 4.1 (95% IC:1.1-15.9). Los niveles de Factor XII inferiores al 68% se asociaron a un mayor riesgo de accidente isquémico cerebrovascular.

Trabajo número 5:

Homozygosity of the T allele of the 46 C/T Polymorphism in the F12 Gene is a Risk factor for Acute Coronary Artery Disease in the Spanish Population. Haematologica 2004; 89(7): 878-9.

En este trabajo se investigó el riesgo de enfermedad coronaria aguda asociado al polimorfismo 46 C/T del gen del Factor XII en población española. Se incluyeron 385 individuos, 174 pacientes con enfermedad coronaria aguda y 211 controles emparejados por edad, sexo y origen español, Se recogieron datos sobre factores de riesgo cardiovasculares como hipertensión, dislipidemia, diabetes, tabaquismo, ingesta de alcohol e historia de enfermedad tromboembólica. En el análisis de los marcadores protrombóticos se midieron los antifosfolípidos, el factor VIIIc y el fibrinógeno, y el factor XIIc. En los resultados se observó una importante asociación de los niveles de Factor XIIc en función de los diferentes genotipos. Los niveles de Factor XII inferiores a 68% se asociaron a un riesgo superior de desarrollar enfermedad coronaria aguda (OR:5.1, 95% IC: 1.7-15.5). El genotipo T/T, además de asociarse a niveles inferiores de Factor XII, también se asoció a un riesgo 6 veces superior de desarrollar enfermedad coronaria aguda.

Association of Functional Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) With Conventional Cardiovascular Risk Factors and Its Correlation With Other Hemostatic Factors in a Spanish Population

Amparo Santamaría,* Montserrat Borrell, Arturo Oliver, Rosa Ortín, Ruth Forner, Inmaculada Coll, Jose Mateo, Juan Carlos Souto, and Jordi Fontcuberta

Unit of Haemostasis and Thrombosis, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Our aim was to determine the associations of functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in plasma with conventional cardiovascular risk factors, sex and age, and possible correlations with other hemostatic factors in a Spanish population. We included 303 individuals from a Spanish population. Hemostatic factors such as von Willebrand Factor, VII ag, VIIIc, XIc, XIIc, APCR, protein S, protein C, antithrombin, fibrinogen, and t-PA antigen were assayed. The functional TAFI assay was based on the activation of plasma TAFI with thrombin–thrombomodulin, and the measure of TAFIa activity on the hippuryl-Arg substrate. There were no statistical differences in mean values of functional TAFI among the various female age groups or among the different male age groups, with or without cardiovascular risk factors. Only women younger than 30 years of age showed lower levels of functional TAFI compared to older women. No differences were found among men of different ages. Adjusted for sex and age, hemostatic factors did not show a correlation with functional TAFI levels in plasma. Women with hypercholesterolemia showed higher levels of TAFI; other conventional cardiovascular risk factors did not modify functional TAFI levels either in men or in women. We also found no correlation of functional TAFI levels related to any other hemostatic factors. *Am. J. Hematol.* 76:348–352, 2004. © 2004 Wiley-Liss, Inc.

Key words: TAFI; hemostatic factors; cardiovascular risk factors

INTRODUCTION

Disturbances in the hemostatic system predispose and precipitate arterial thrombosis disease [1,2]. One important factor in this system is thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), which has been described recently [1–4]. It circulates as procarboxypeptidase B, which is converted into an active form, carboxypeptidase U (also called TAFIa), after thrombin cleavage during coagulation. TAFIa suppresses fibrinolysis by removing carboxy-terminal lysine residues from partly degraded fibrin polymers, preventing the binding of the fibrinolytic components, plasminogen, and tissue type plasminogen activator, and thereby limiting plasmin formation so that TAFIa may function more efficiently during progressive fibrinolysis [2]. The activation of TAFI by thrombin implies that the coagulation system plays a role in the regulation of fibrinolysis and that any

disturbance in the generation of thrombin will result in an increased rate of clot lysis [2]. Activation of TAFI takes place via both Factor XI-dependent and Factor XI-independent mechanisms. This implies that part of the thrombin needed for the activation of TAFI may be mediated by the extrinsic pathway [7]. Another point to take into account in the activation of TAFI is the role of the physiological anticoagulant pathway, including

*Correspondence to: Dra. Amparo Santamaría, Unitat d' Hemostàsia i Trombosi, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Avda. Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: msantamaria@hsp.santpau.es

Received for publication 14 October 2003; Accepted 14 March 2004

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ajh.20108

protein S, protein C, and antithrombin, since these enzymes also regulate the formation of thrombin [8–10]. Therefore, TAFI is important in the balance between coagulation and fibrinolysis. Thus, modifications of its concentration and the generation of TAFIa might be involved in thrombotic diseases [5]. Physiological variations of plasma TAFI antigen have been reported [6], as well as its association with cardiovascular risk factors [5]. An assay for functional TAFI has been described by Mosnier et al. [3] and is based on the activation of TAFI with thrombin–thrombomodulin and the amount of TAFIa activity generated.

Variability of functional TAFI levels in relation to various physiological states such as age and sex are not known. Modifications of functional TAFI levels may be related to conventional cardiovascular risk factors and thrombotic disease. Thus, it is important to establish possible interactions between lifestyle and TAFI levels and the risk of developing arterial thrombotic disease [5].

It is also important to determine the possible correlation of TAFI with other hemostatic factors, since different coagulation and fibrinolytic factors influence the activation of TAFI such as Factor XI, protein C, and others and may allow us to understand the complex interactions of TAFI with other hemostatic factors [3,7–10].

To our knowledge, the physiological variations of functional TAFI levels in plasma related to age and sex, and its association with cardiovascular risk factors, as hypertension, diabetes, and family history of arterial disease have not been reported. No studies have reported the correlation of plasma functional TAFI levels with other hemostatic factors. Our aim was to determine if there were modifications of functional TAFI levels associated with conventional cardiovascular risk factors, sex, and age and also if there were a correlation of other hemostatic factors with functional TAFI levels in plasma in a Spanish population.

SUBJECTS AND METHODS

We included 303 individuals, 167 women and 136 men. The subjects were between 20 and 80 years old, without a personal history of either arterial and/or venous thromboembolic disease. Pregnant women and subjects with malignant disorders or with a previous history of chronic or acute liver disease or nephrotic syndrome were excluded. The interview included questions on personal and family history of cardiovascular diseases and the conventional cardiovascular risk factors. We considered such conditions as hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia only if the individual had ever been diagnosed by a physician or was currently taking prescription drugs

for any one or more of these conditions. Alcohol intake of more than 300 g per week was considered important. Morbid obesity was defined if weight was > 30% of body mass index. Individuals were considered as smokers if they were smoking currently.

Blood was obtained by venipuncture after a 12-hr fast. Samples for hemostatic tests were collected in Vacutainer® tubs containing 1/10 volume of 0.129 M of sodium citrate. Platelet-poor plasma was obtained by centrifugation at 2000g for 20 min at room temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Assays for Factor VIII were performed immediately on fresh plasma samples. The remaining plasma samples were stored at -80°C until used. The inter-assay coefficient of variation was 10%. All assays were performed in duplicate, in different days during the study. Functional assays for Factor XII, XI, and VIII activity were performed in an automated coagulometer STA (Roche, Basel, Switzerland) using deficient plasmas from Diagnostica Stago (Asnières, France). Activated Protein C resistance (APCR) was measured according to the test described by Dahlbäck et al. [11] using a kit from Chromogenix (Mölnådal, Sweden). Antithrombin and protein C were measured in a biochemical STA automated coagulometer using chromogenic methods from Chromogenix. Total Protein S and free Protein S were measured using ELISA methods (Asserachrom total PS, Diagnostica Stago). Fibrinogen was measured by the von Clauss method (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France). Factor VII antigen and t-PA antigen were measured by ELISA methods from Diagnostica Stago and von Willebrand Factor was measured by an "in house" ELISA method using antibodies from Dako AS (Glostrup, Denmark).

Plasma functional TAFI was measured as described by Mosnier et al. [3]. It is based on the activation of TAFI in plasma with the complex thrombin–thrombomodulin and the measure of activated TAFI with hippuryl-arginine substrate. The method consists of a first step in which TAFI is activated with thrombin–thrombomodulin complex and a second step in which activated TAFI is measured using the substrate hippuryl-Arg.

Briefly, 15 μL of plasma is activated with 12 μL of thrombin (5 U/mL)–thrombomodulin (7.5 U/mL), with 8.5 μL of 60 mM CaCl_2 and with 24 μL of activation buffer (20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4). After 10 min at room temperature, activation is stopped by addition of 20 μL of 1.11 mM PPACK (Bachem, Bubendorf, Switzerland). Activated TAFI is then measured by adding 20 μL of 20 mM Hippuryl-Arg (Bachem) and incubated for 10 min at room temperature. The substrate reaction is stopped with 20 μL of 1 M HCl. After that, 20 μL of 1 M NaOH and 25 μL of 1 M phosphate buffer is added to each sample. Finally, 60 μL of 3% cyanuric

chloride dissolved in 1,4-dioxan is added, and color is allowed to develop. Samples were centrifuged 2 min at 14000g, and the absorbance is measured at 405 nm. A standard curve was prepared by serial dilutions of normal plasma in heat-inactivated serum (30 min at 56°C), and the samples were run in duplicate at 50% in heat-inactivated serum.

Statistical analyses were performed using conventional software (SPSS v10.1, SPSS Inc., Chicago, IL). Values are expressed as mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to calculate the mean differences between groups. One-way ANOVA tests were performed for comparison between age groups. Spearman correlation coefficients were calculated to determine if there were associations between hemostatic parameters. Stepwise multiple linear regression analysis was performed to evaluate independent correlates of hemostatic parameters. A value of $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

The characteristics of the population are given in Table I. Mean age was 48 years (range 20–78) in women and 53 years (range 21–80) in men. Hypertension was diagnosed in 10.8% of the men and 18.4% of the women. About 5.9% of the men and 2.4% of women were diabetic. Twenty-one per cent of the men and 14% of the women had a positive family history of arterial disease. Hypercholesterolemia was diagnosed in 18% of men and 16.2% of women. Thirty-eight per cent of the women and 26.5% of the men were smokers. Two per cent of the women and 7.4% of the men were considered to have an important alcohol intake. Only 2.2% of men and 2.4% of women were diagnosed as obese.

The population was divided into three subgroups of different ages: a group with members of age 20–30 years with 21 women (85.8% \pm 17.9%) and 16 men (98.5% \pm 15.1%), a group with members of age 31–50 years with 67 women (96.8% \pm 21.9%) and 43 men

(99.4% \pm 14.6%), and a group with members of age 51–80 years including 79 women (98.9% \pm 17.3%) and 32 men (93% \pm 20.3%).

A statistically significant difference was found between mean values of functional TAFI between the younger subgroup of women compared to the other subgroups of women. Mean values in the younger subgroup were lower [85.8% (range 57–120%)] than in women in the other age groups from 31 to 80 years. There was no difference between the different groups in the male population.

Functional TAFI Plasma Levels and Conventional Cardiovascular Risk Factors

Associations of TAFI functional levels with different conventional cardiovascular risk factors in women and in men are summarized in Table II.

Women showed no statistical difference in mean values of functional TAFI with or without a given cardiovascular risk factor. Only women diagnosed with hypercholesterolemia had a significantly higher level of TAFI functional level as compared to women without this cardiovascular risk factor (10.3.6% and 94.7%, respectively).

Men with hypertension had similar levels of functional TAFI than non-hypertensive men (89.3% and 97.0%, respectively). Also, men with different

TABLE II. Correlation of Conventional Cardiovascular Risk Factors with Functional TAFI Levels (Values Given as mean \pm SD)

	Functional TAFI (%)	
	Women	Men
Hypertension		
No	96.1 \pm 20.2	97.0 \pm 17.8
Yes	98.3 \pm 15.1	89.3 \pm 19.1
Smoking		
No	98.4 \pm 15.9	95.5 \pm 15.9
Yes	92.8 \pm 23.7	95.9 \pm 23.7
Alcohol intake		
No	96.6 \pm 23.5	95.1 \pm 23.5
Yes	83.3 \pm 17.8	91.7 \pm 17.8
Diabetes mellitus		
No	96.3 \pm 18.2	95.9 \pm 18.2
Yes	99.5 \pm 19.4	90.8 \pm 19.4
Family history of arterial disease		
No	90.8 \pm 21.6	91.4 \pm 18.3
Yes	92.2 \pm 12.7	86.0 \pm 19.4
Obesity		
No	96.5 \pm 19.6	95.4 \pm 18.1
Yes	91.5 \pm 26.1	104.3 \pm 26.5
Hypercholesterolemia		
No	94.7 \pm 17.9	96.8 \pm 17.9
Yes	103.6* \pm 18.8	89.3 \pm 18.8

* $P < 0.03$.

TABLE I. Main Characteristics of the Population

	Men (<i>n</i> = 136)	Women (<i>n</i> = 167)
Age, years (range)	53 (21–80)	48 (20–78)
Hypertension, % (<i>n</i>)	10.8 (18)	18.4 (25)
Smoking, % (<i>n</i>)	26.5 (36)	22.8 (38)
Alcohol intake, % (<i>n</i>)	7.4 (10)	2 (3)
Diabetes mellitus, % (<i>n</i>)	5.9 (8)	2.4 (4)
Family history of arterial disease, % (<i>n</i>)	21 (35)	14 (19)
Obesity, % (<i>n</i>)	2.2 (3)	2.4 (4)
Hypercholesterolemia, % (<i>n</i>)	18 (30)	16.2 (22)

cardiovascular risk factors (such as smokers, important alcohol intake, family history of arterial disease, obesity, or hypercholesterolemia) had similar TAFI functional levels compared with men without these risk factors.

Functional TAFI Plasma Levels and Hemostatic Factors

A significant positive correlation was found between functional TAFI levels and Factor VII:antigen levels, Factor VIIIc, XIc, XIIc, protein S, protein C, and antithrombin levels. APCR showed a weak negative correlation with functional TAFI levels. However, when adjusted for sex and age, no correlation was found between functional TAFI levels and these hemostatic parameters.

DISCUSSION

In this study, we did not find any important modifications of functional TAFI levels related to age in men. Only women below 31 years of age showed lower levels of functional TAFI than older women. This observation may be related to oral contraceptive intake by the 31–50 age group and to estrogen hormone replacement or menopause in the group of women older than age 51. Some studies have shown that hormonal treatment causes an increase of thrombin and consequently an increase of TAFI plasma levels [12,13]. We did not observe important modifications of functional TAFI levels associated with conventional cardiovascular risk factors. Only women diagnosed with hypercholesterolemia had significantly higher TAFI functional levels than did non-hypercholesterolemic women. This observation may be related also to hormonal status and its impact on lipoprotein levels [14,15]. It is important to point out that our results agree with those of other studies on the variation of antigen TAFI levels [6]. Chetaille et al. [6] and Juhan-Vague et al. [5] found significant variations of antigen TAFI levels only with age in women. In this study, older women had greater levels of antigen TAFI levels. They suggested that this result was related to hormonal status. They did not find a statistically significant difference in antigen TAFI levels between males and females. All these results are similar to those found in our study with functional TAFI levels. Our results suggest that, similar to plasma antigenic TAFI levels [5,6], functional TAFI levels exhibit a large inter-individual variability poorly explained by biological or anthropometrics parameters.

We observed a lack of correlation between conventional cardiovascular risk factors with modifications of functional TAFI levels. Similar results were observed by Juhan-Vague et al. [5]. They did not find an association between conventional cardiovas-

cular risk factors such as smoking [5]. These observations are similar to our results and may be related to the weak effect of lifestyle on variations of antigen and functional TAFI levels.

It is noteworthy also that we did not observe a significant correlation of functional TAFI levels with some hemostatic factors that are implicated with the risk of thrombosis and also may play a role in the activation of TAFI such as fibrinogen, Factor XI, or the inhibitor coagulation pathway. We did not find a lineal correlation of plasma functional TAFI levels with those hemostatic factors, but we could not exclude that there was a possible association among these levels that would explain their role in the activation of TAFI. All these observations may confirm that, as the antigen TAFI plasma levels [16,17], the variability of functional TAFI plasma levels are influenced by gene–environment interactions, although no analyses on the effect of different polymorphisms on functional TAFI levels have been performed.

In conclusion, we found that functional TAFI plasma levels are lower in women younger than 31 years of age and also in women without hypercholesterolemia irrespective of their ages. We have not observed correlations with the rest of conventional cardiovascular risk factors either in women or in men. There were no statistically significant differences in men, in any age group of functional TAFI levels. In addition, we found no correlation of functional TAFI levels with some hemostatic factors. Further studies should elucidate the importance of environmental and genetic factors in variations of functional TAFI and the correlation with hemostatic and thrombotic factors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Distinguished Professor William H. Stone for critically reviewing and revising the manuscript.

REFERENCES

1. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an anti-fibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2511–2518.
2. Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers J. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Thromb Res* 2001;101:329–354.
3. Mosnier LO, von dem Borne P, Meijers J, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998;80:829–835.
4. Nesheim ME. TAFI. *Fibrinolysis Proteolysis* 1999;13:72–77.
5. Juhan-Vague I, Renucci JF, Grimaux M, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2156–2161.
6. Chetaille P, Alessi MC, Kouassi AD, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000;83:902–905.

352 Santamaría et al.

7. Bouma BN, Mosnier LO, Meijers J, Griffin JH. Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation. *Thromb Haemost* 1999;82:1703–1708.
8. Mosnier LO, Elisen MG, Bouma BN, Meijers JC. Protein C inhibitor regulates the thrombin–thrombomodulin complex in the up- and downregulation of TAFI activation. *Thromb Haemost* 2001;1057–1064.
9. Mosnier LO, Meijers JC, Bouno BN. Regulation of fibrinolysis I plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 2001;85:5–11.
10. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and the regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2001;8:1040–1046.
11. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterised by a poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1004–1008.
12. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Bouma BN, Grobbee DE. Increased fibrinolytic activity during the use of oral contraceptives is induced by the estrogen component and counteracted by an enhanced factor XI independent down regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost* 2001;(Suppl 1):abstract P2984.
13. Arkel YS, Spratt D, Ku DH, et al. Increased thrombin generation as per endogenous thrombin potential (ETP), coagulation activation markers (TpP, TAT, and PF1.2), and TAFI levels in subjects treated with estrogens hormone replacement (HRT). *Thromb Haemost* 2001;(Suppl 1):abstract P3018.
14. Bittner V. Lipoprotein abnormalities related to women's health. *Am J Cardiol* 2002;90(8A):77i–84i.
15. Kuller LH, Women's Health Initiative. Hormone replacement therapy and risk of cardiovascular disease: implications of the results of the Women's Health Initiative. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:11–16.
16. Trégouët DA, Aubert H, Henry M, et al. Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphism. *Hum Genet* 2001;109:191–197.
17. Henry M, Aubert H, Morange PE, et al. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood* 2001;97:2053–2058.

Risk of Ischemic Stroke Associated With Functional Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Plasma Levels

A. Santamaría, MD; A. Oliver, MD; M. Borrell, PhD; J. Mateo, MD, PhD; R. Belvis, MD; J. Martí-Fàbregas, MD, PhD; R. Ortín; I. Tirado, PharmD; J.C. Souto, MD, PhD; J. Fontcuberta, MD, PhD

Background and Purpose—Recently, a novel procarboxypeptidase B-like proenzyme, called thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), has been described. It plays an important role in the delicate balance between coagulation and fibrinolysis. TAFI leads to potent inhibition of tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis. The relevance of TAFI in thromboembolic disease is unclear. We have investigated the risk of ischemic stroke (IS) in relation to plasma levels of functional TAFI.

Methods—In a case-control study, we enrolled 264 individuals; 114 had IS, and 150 were recruited as controls who were age and sex matched and had no history of arterial disease. The individuals supplied information on their personal and family histories of cardiovascular diseases and conventional cardiovascular risk factors. Functional TAFI assays were performed by use of a method based on the activation of TAFI with thrombin-thrombomodulin and the measure of the TAFI activity generated. Other hemostatic parameters assayed were factor VIIIc, anti-phospholipid antibodies, fibrinogen, factor V Leiden, and the prothrombin gene G20210A mutations (PT20210A).

Results—Functional TAFI levels were significantly higher in patients with IS ($113.7 \pm 25\%$; range, 57% to 209%) than in controls ($102.6 \pm 19\%$). The odds ratio for IS in patients with functional TAFI levels $>120\%$ was 5.7 (95% confidence interval, 2.3 to 14.1).

Conclusions—We found that functional TAFI levels in plasma ($>120\%$) increased the risk of IS ≈ 6 -fold. Further studies should elucidate the physiological role of TAFI in arterial disease and possibly provide clues to therapeutic approaches. (*Stroke*. 2003;34:2387-2391.)

Key Words: fibrinolysis ■ stroke, ischemic ■ thrombosis

Arterial thrombotic disease is the most frequent cause of morbidity and mortality in developed countries.¹ There is good evidence that an imbalance in the hemostatic system can lead to arterial thrombosis.^{1,2} The arterial thrombotic diseases such as ischemic stroke (IS) arise from 2 processes: atherosclerosis and thrombosis. Research on the nature of the interaction between hemostatic factors and the endothelial cell surface of blood vessels should help to identify risk factors for arterial disease and individuals at increased risk.

Deficiencies in or increased levels of some hemostatic factors such as fibrinogen and factor VIIIc have been associated with increased risk of arterial thrombotic disease. However, the results of some studies are controversial.¹⁻⁵ It is known that impaired fibrinolytic system factors are involved in the pathogenesis of atherosclerotic disease.²

A novel procarboxypeptidase B-like proenzyme, called thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), has been described recently.^{6,7} It plays an important role in the delicate hemostasis balance between coagulation and fibrinolysis. TAFI is converted to an active carboxypeptidase (TAFIa) by

thrombin, plasmin, trypsin, and more efficiently the thrombin-thrombomodulin complex.⁸⁻¹⁰ Activated TAFI inhibits fibrinolysis by removing carboxy-terminal lysine residues that appear during proteolysis of the fibrin polymers during the process of clot lysis. These residues are important for binding and activating plasminogen. Thus, TAFI leads to a potent inhibition of tissue plasminogen activator-induced fibrinolysis.⁸⁻¹¹ It is clear that plasma TAFI levels are major determinants of clot lysis time because of the downregulation of plasminogen activation and fibrinolysis.¹² Functional TAFI, described by Mosnier et al,¹¹ is based on the activation of TAFI with thrombin-thrombomodulin and the measure of the generated TAFI activity.

Although the precise relevance of TAFI in thromboembolic diseases is unclear, high plasma levels of TAFI may be related to thrombotic disorders. For example, reports have indicated that elevated antigenic TAFI levels constitute a mild risk factor for venous thrombosis.¹²⁻¹⁴ Only a few studies have investigated the role of TAFI levels in coronary arterial disease, suggesting that an increase in antigenic TAFI

Received January 30, 2003; final revision received May 13, 2003; accepted June 3, 2003.

From the Hemostasis and Thrombosis Unit, Hematology Department (A.S., M.B., J.M., R.O., I.T., J.C.S., J.F.), Neurology Department (R.B., J.M.-F.), and Fundació Puigvert (A.O.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

Correspondence to Dr A. Santamaría, Department of Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Antoni Ma Claret, 167, 08025-Barcelona, Spain. E-mail msantamaria@hsp.santpau.es

© 2003 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://www.strokeaha.org>

DOI: 10.1161/01.STR.0000088642.07691.15

TABLE 1. Basic Characteristics of Cases With IS and Controls

	IS (n=114)	Controls (n=150)	Unadjusted OR (95% CI)	P
Sex, F/M	52/62	83/67		NS
Mean age (range), y	56 (23–80)	48 (21–75)		NS
Smoking, n (%)	58 (51)	55 (36.7)	1.7 (1.1–2.9)*	
Dyslipidemia, n (%)	47 (41.2)	21 (14)	4.3 (2.3–7.8)*	
Family history of arterial disease, n (%)	64 (56)	12 (8)	14.7 (7.3–29.5)*	
Hypertension, n (%)	48 (42)	19 (12.7)	5.1 (2.7–9.22)*	
Atrial fibrillation, n (%)	14 (12.3)	3 (2)	6.9 (1.9–24.5)*	
Morbid obesity, n (%)	7 (6.1)	1 (0.7)	9.7 (1.2–80.4)*	
Alcohol intake, n (%)	34 (7.8)	24 (5.5)		NS
Diabetes mellitus, n (%)	22 (19.3)	4 (2.7)	8.7 (2.9–26.2)*	
Factor VIII levels (range), %	216 (76–516)	154.4 (42–328)		<0.0001
Fibrinogen (range), g/L	3.8 (0.8–8.4)	3.3 (2.1–5.7)		<0.001
Anti-phospholipids antibodies, n (%)	13 (11.4)	9 (6.3)	1.9 (0.8–4.6)	
FVL, n (%)	1 (0.9)	6 (4)	4.7 (0.6–39.7)	
PT20210A, n (%)	6 (5.3)	5 (3.3)	0.6 (0.2–2.1)	

FVL indicates heterozygosity for FVL mutation; PT20210A: heterozygosity for PT20210A mutation.

* $P < 0.0005$.

levels may be a risk factor, although this association has not been confirmed in other studies.^{15–19} To the best of our knowledge, no studies have investigated the relation of functional levels of TAFI with IS. Here, we report the results of our investigation into the association of plasma levels of functional TAFI with the risk of IS.

Methods

Patients and Control Subjects

A total of 264 consecutive individuals <80 years of age were included in our case-control study; 114 were admitted to the Neurology Unit in the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau with the diagnosis of IS, and 150 individuals (spouses and friends of patients) served as controls.

Patients assigned to the IS group had at least 1 episode of IS, including established or transient ischemic cerebrovascular attack, excluding patients with unusual causes of IS. The diagnosis of IS was based on findings of general clinical and neurological examination and at least 1 objective diagnostic method such as CT or MRI of the brain in all patients.

Control subjects had no previous history of thromboembolic disease (including venous and arterial thrombosis) and were matched to the patients in age and sex. Informed consent was obtained from all participants. The interview included questions on personal and family histories of cardiovascular diseases and conventional cardiovascular risk factors. We considered conditions like hypertension, diabetes, and dyslipidemia only if the individual had been diagnosed by a physician or was currently taking prescription drugs for any 1 or more of these conditions. Alcohol intake of >300 g/wk was considered significant intake. Morbid obesity was defined as a body mass index (weight in kilograms divided by height squared in meters) of at least >30 kg/m². Individuals were considered smokers if they were previous or current smokers of >5 cigarettes per day. Atrial fibrillation was recorded on the basis of ECG findings by a cardiologist.

Laboratory Methods

Blood samples were obtained from the antecubital vein at least 1 month after the acute thrombotic episode. Whole-blood samples for hemostatic tests were collected in 1/10 volume of 0.129 mol/L

sodium citrate as the anticoagulant. Assays for factor VIII were performed immediately on fresh plasma samples. The remaining plasma samples were stored at –80°C until used. Factor VIII was assayed with deficient plasma from Diagnostica Stago (Asnières).

Plasma functional TAFI was measured with the method described by Mosnier et al.¹¹ It is based on the activation of TAFI in plasma with the thrombin-thrombomodulin complex and the measure of activated TAFI with hippuril-arginine substrate. Anti-phospholipid antibodies, including anti-phosphatidylserine and anti-cardiolipin IgG and IgM, were measured by in-house enzyme-linked immunosorbent assay anti-cardiolipin and anti-phosphatidylserine method as described by Gharavi et al.²⁰

Anti-cardiolipin IgG <13.97 GPL, anticardiolipin IgM <25.32 MPL, anti-phosphatidylserine IgG index <2.8, and anti-phosphatidylserine IgM index <3.7 were considered normal values. Lupus anticoagulant was performed by the Exner method.²¹ Fibrinogen was measured by the von Clauss method. Factor V Leiden (FVL) and prothrombin gene G20210A mutations (PT20210A) were analyzed as described previously.²²

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by conventional software. Values are expressed as mean ± SD. Student's *t* test was used to calculate the mean differences between groups. Odds ratios (ORs) were calculated as relative risk for thrombosis in the unmatched fashion adjusted for age and sex, and other covariables were calculated by conditional logistic regression analysis. Confidence intervals (CIs) were derived from the model. Unadjusted ORs were obtained from contingency tables. Receiver-operating characteristic curves were used to determine the cutoff value of functional TAFI. We used the cutoff of 120% of functional TAFI levels as a reference group to calculate ORs. To determine the adjusted OR for different variables, we converted into binary variables the factor VIII plasma levels and the fibrinogen levels. Cutoffs were 170% for factor VIII and 3.1 g/L for fibrinogen. Anti-phospholipid antibodies were considered positive when one was higher than the normal range or when the lupus anticoagulant test was positive.

Results

The basic characteristics of the sample population are given in Table 1. Mean age at the time of the first episode of IS was 56 years (range, 23 to 80 years); mean age of the controls was

TABLE 2. Distribution of Functional TAFI Plasma Levels (%) Related to Age and Sex in Cases and Controls

Age Range, y	Cases		Controls	
	Men	Women	Men	Women
20–55				
n	28	27	48	54
TAFI, %	114.6	110.8	100.2	101
56–80				
n	34	24	19	29
TAFI, %	115.8	112.5	102.9	109

48 years (range, 21 to 75 years). Fifty-two women and 62 men were in the IS group; 83 women and 67 men were in the control group. All of the major cardiovascular conventional risk factors such as smoking, dyslipidemia, hypertension, morbid obesity, and diabetes mellitus were associated with a significant increased risk of IS. Atrial fibrillation was significantly associated with the risk of IS (OR, 6.9; 95% CI, 1.9 to 24.5). In addition, as might be expected, family history of arterial disease and diabetes were the most relevant risk factors in patients with IS. Positive anti-phospholipids antibodies were found in 11.4% of cases compared with 6.3% of controls, but the difference was not statistically significant (OR, 1.9; 95% CI, 0.8 to 4.6). PT20210A and FVL mutations were present in 5.3% versus 3.3% and 0.9% versus 4% of the patients compared with controls, but the differences were not statistically different. Fibrinogen (mean, 3.8 g/L; range, 0.8 to 8.4 g/L) and factor VIIIc (mean, 216%; range, 76% to 516%) were significantly increased in patients compared with controls (3.3 g/L; range, 2.1 to 7.7 g/L) and 154.4% (range, 42% to 328%), but the adjusted OR for fibrinogen was not increased significantly.

Functional TAFI levels were significantly higher in patients with IS (113.7±25%; range, 57% to 209%) than in controls (102.6±19%) ($P<0.05$) (not shown in tables). Variations of mean values of functional TAFI levels with age and sex in both groups are shown in Table 2. Patients and controls were divided into 2 subgroups of age: a 20- to 55-year-old group and a 56- to 80-year-old group. In the control group, there were no differences between younger and older groups in either women or men. In the patient group, there were also no statistically significant differences between groups by age in either women or men. Younger women and men with IS showed higher levels of functional TAFI levels compared with younger women and men in the control group. Additionally, older men and women with IS showed higher functional TAFI levels compared with men and women of the control group. The correlation of functional TAFI levels and conventional cardiovascular risk factors is summarized in Table 3. We did not find any statistical differences in mean values of functional TAFI levels in either patients or controls related to different risk factors such as hypertension, diabetes, obesity, alcohol intake, dyslipidemia, or smoking. Only patients with a family history of arterial disease showed higher levels of functional TAFI levels than patients without a family history (118.1% and 108.1%, respectively; $P<0.05$).

TABLE 3. Correlation of Functional TAFI Levels With Conventional Cardiovascular Risk Factors

	Functional TAFI (%), N/Y	
	Cases (n=114)	Controls (n=150)
Hypertension	115.4/111.3	102.4/103.8
Smoking	111.4/115.9	104.6/99.1
Alcohol intake	113.3/117.6	102.7/98.3
Diabetes mellitus	114.3/111.2	102.6/102.8
Family history of arterial disease	108.1/118.1*	102.7/101.7
Obesity	113.1/121.7	102.5/107.0
Dyslipidemia	112.9/114.6	101.8/107.3

* $P<0.05$.

To determine the risk of IS, we used the cutoff level of 120% for functional TAFI (Table 4). Unadjusted and adjusted ORs were calculated using as the reference group patients with TAFI levels <120%. However, the unadjusted OR for functional TAFI levels was 5.8 (95% CI, 3.1 to 11.5) in IS patients compared with controls. Furthermore, when we analyzed risk adjusted by sex, age, and other putative confounding variables like factor VIIIc, smoking, dyslipidemia, hypertension, alcohol intake, diabetes, fibrinogen, anti-phospholipids antibodies, FVL, and prothrombin G20210A mutation, the adjusted OR remained as high as 5.7 (95% CI, 2.3 to 14.1) for IS patients with plasma functional TAFI levels >120%.

Discussion

In our case-control study, we found that a high level of functional TAFI in plasma engenders a significant risk for IS. Thus, functional TAFI levels in plasma >120% increased the risk of IS ≈6-fold. It is remarkable that the risk did not change even when adjusted for confounding variables, including major conventional cardiovascular risk factors and other factors such as high levels of factor VIII and fibrinogen. We found higher mean levels of functional TAFI levels in cases compared with controls. The variation of functional TAFI levels in controls and cases was not correlated with either sex or age. Mean functional TAFI levels were higher in different age groups in patients, both women or men, compared with different groups of controls. We did not find a significant correlation of functional TAFI levels with conventional cardiovascular risk factors. This lack of correlation may be related to a weak effect of these risk factors with

TABLE 4. Risk of IS Related to Functional TAFI Levels

Functional TAFI, %	IS (n=114)	Controls (n=150)	Unadjusted OR (95% CI)	Adjusted OR* (95% CI)
<120	71	136	1†	1†
>120	43	14	5.8 (3.1–11.5)	5.7 (2.3–14.1)

*Adjusted by age, sex, smoking, dyslipidemia, diabetes, family history of arterial disease, anti-phospholipids, PT20210A, and FVL mutations, fibrinogen, and factor VIII levels.

†Reference group.

modifications of functional TAFI levels. Only a family history of arterial disease was correlated with higher functional TAFI levels in patients than in the controls. Conventional cardiovascular risk factors were more prevalent in patients than in controls and were associated with a higher risk of IS. As in other studies, we did not find a higher risk of arterial thrombotic disease in patients with FVL or in those who were PT20210A carriers.²³ Other established hemostatic risk factors such as high levels of factor VIII and fibrinogen also showed an increase risk of IS. Family history of IS was the most important risk factor associated specifically with the development of IS. To the best of our knowledge, this is the first case-control study that presents evidence that a high risk of IS is associated with high functional TAFI levels.

Although different studies confirm that TAFI is an important link between coagulation and fibrinolysis,^{6–8} the precise role of TAFI in arterial and venous diseases is unclear. Its mechanism of action and its relation with endothelium and its modulators may explain why high levels of TAFI are associated with a higher risk of IS. Our results clearly demonstrate that an increased risk of IS is related to functional plasma TAFI levels. One possible explanation is the influence of platelets, which contribute differently to the pathogenesis of arterial and venous thrombosis, as does the susceptibility of veins and arteries to atherosclerosis. Platelets may adhere to specific regions of the endothelium in response to injury and may be involved in the pathogenesis of inflammatory and thrombotic disorders. Platelets contain TAFI in α -granules, which is secreted during platelet activation. So, TAFI activation and TAFI secretion would depend on the generation of thrombin in a dose-dependent manner.²⁴ High levels of TAFI may play an important role in protecting the plug against the fibrinolytic pathway, and the aggregated platelets would increase TAFI levels and the strength of the clots.^{24,25}

Because TAFI is activated with high efficiency by the thrombomodulin-thrombin complex, the thrombin generated and the thrombomodulin concentration on the endothelium are important regulators of TAFI activation. The thrombomodulin-thrombin complex can activate both protein C and TAFI, depending on its concentration. Thus, low concentrations of thrombomodulin enhance TAFI activation, whereas high concentrations of thrombomodulin increase activation of protein C, which decreases the thrombin generation and consequently decreases TAFI activation.

Small arterial vessels such as those in the brain or coronary arteries have lower concentrations of thrombomodulin compared with veins.^{7,9,26} Therefore, high levels of TAFI in some specific types of vessels with low concentrations of thrombomodulin (like arteries) may increase the downregulation of fibrinolysis and reduce the capacity to remove fibrin clots from the circulation. This would lead to an increased risk of IS.

Understanding the role of TAFI in IS may have clinical implications. Some studies using in vivo experiments in animals found that treatment with TAFI inhibitors (carboxypeptidase inhibitor derived from potato, also known as PCI) added to recombinant tissue plasminogen activator increased the rate of clot lysis in physiological conditions. As a consequence, TAFI may be an important target for enhancing thrombolysis.^{6,7}

In conclusion, we have found an ≈ 6 -fold (5.8) increased risk of IS associated with increased functional TAFI levels in plasma. Therefore, high TAFI levels may represent a significant risk factor for IS. Because it is a complex disease, knowledge of the pathophysiological role of different biological and genetic markers will lead to a better understanding of the mechanism of the thrombotic disease.⁵ Further studies should elucidate the physiological role of TAFI in arterial diseases and lead to possible therapeutic approaches.

Acknowledgment

We are indebted to Professor W.H. Stone for his help in the revision and discussion of the manuscript.

References

1. Folsom AR. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease: an epidemiologic view. *Thromb Haemost.* 2001;86:366–373.
2. Cushman M. Hemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Hematology.* 1999;4:236–242.
3. Kamphuisen PW, Eikenboom CJ, Bertina RM. Elevated factor VIII levels and the risk of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:731–738.
4. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 2001;85:584–595.
5. Simmonds RE, Hermida J, Rezende SM, Lane DA. Haemostatic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001;86:374–385.
6. Nesheim ME. TAFI. *Fibrinolysis Proteolysis.* 1999;13:72–77.
7. Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res.* 2001;101:329–354.
8. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2511–2518.
9. Mosnier LA, Meijers J, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost.* 2001;85:5–11.
10. Bouma BN, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH. Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation. *Thromb Haemost.* 1999;82:1703–1708.
11. Mosnier LO, van der Borne PA, Meijers J, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost.* 1998;80:829–835.
12. Franco RF, Fagundes MG, Meurs JM, Reitsma P, Lourenco D, Morell V, Maffel F, Ferrari IC, Piccinato C, Silva WA Jr, Zago M. Identification of polymorphism in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica.* 2001;86:510–517.
13. van Titsburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk of deep vein thrombosis. *Blood.* 2000;95:2855–2859.
14. Cushman M, Folsom AR, Wang L, Heckbert SR, White RH, Aleksic N, et al. A prospective study of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) concentration and the TAFI-438A polymorphism in relation to venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Thromb Haemost.* 2001;85(suppl 1):974. Abstract.
15. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris: ECAT Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation.* 1996;94:2057–2063.
16. Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, Henry M, Aillaud MF, Alessi MC, et al. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the North and South of Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:867–873.

17. Silveira A, Schatteman K, Goossens F, Moor E, Scharpé S, Strömqvist M, Hendriks D, Hamsten A. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2000;84:364–368.
18. Schroeder V, Chatterjee T, Mehta H, Windecker S, Pham T, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thromb Haemost.* 2002;88:1020–1025.
19. Morange PE, Juhan-Vahue I, Scarabin PY, Alessi MC, Lue G, Arveiler D, et al. Association between TAFI antigen and Ala 147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence: the PRIME study. *Thromb Haemost.* 2003;89:554–560.
20. Gharavi AF, Harris EN, Asherson ZRA, Hughes GRV. Anticardiolipin antibodies: isotypes distribution and phospholipid specificity. *Ann Rheum Dis.* 1987;46:1–6.
21. Exner T, Richard A, Kronenberg H. A sensitive test demonstrating lupus anticoagulant and its behavioural patterns. *BJ Haematol.* 1978;40:143–151.
22. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Tirado I, Borell M, Mateo J, et al. Linkage analysis demonstrates that the prothrombin G20210A mutation jointly influences plasma prothrombin levels and risk of thrombosis. *Blood.* 2000;95:2780–2785.
23. Voetsch B, Damasceno BP, Camargo EC, Massaro A, Bacheschi LA, Scaff M, et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. *Thromb Haemost.* 2000;83:229–233.
24. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JCM, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood.* 2003;101:4844–4846.
25. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEve RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91:3527–3561.
26. Osenberg RD, William CA. Vascular-bed-specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med.* 1999;340:1555–1564.

Letters to the Editor

Thrombosis

Risk of acute coronary artery disease associated with functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor plasma level

To our knowledge, there is little information about functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels and the risk of acute coronary artery disease (CAD). We investigated the risk of acute CAD related to plasma levels of functional TAFI. We found that functional TAFI levels in plasma (above 126%), increased the risk of acute CAD almost 4-fold.

haematologica 2004; 89:880-881

(<http://www.haematologica.org/2004/7/880>)

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) leads to potent inhibition of t-PA-induced fibrinolysis.^{1,2} Functional TAFI, described by Mosnier *et al.*,² is based on the activation of TAFI with thrombin-thrombomodulin and the measure of the TAFI activity generated. Although the precise relevance of TAFI in thromboembolic diseases is unclear, high plasma levels of TAFI may be related to thrombotic disorders.³⁻⁵ Here we report the results of our investigation of the association of plasma levels of functional TAFI with the risk of acute CAD.

A total of 385 consecutive individuals under the age of 80 years were included in our case-control study; 174 cases were admitted to the Cardiology Unit with a diagnosis of acute CAD and 211 individuals (spouses and friends of patients) served as controls. Acute CAD was confirmed on the basis of definitive ischemia or necrosis of the myocardium. The control subjects had no previous history of thromboembolism and were matched for age and gender with patients. Informed consent was obtained from all participants. The interview included questions on personal and family history of cardiovascular diseases and the conventional cardiovascular risk factors. Blood samples were obtained from the antecubital vein at least six months after the acute thrombotic episode. Plasma functional TAFI was measured as described by Mosnier *et al.*² using an assay that measures TAFI activity after *in vitro* activation of pro-enzyme by thrombin-thrombomodulin complex; the result therefore represents the amount of activatable TAFI with hippuryl-arginine substrate, which corresponds to the amount of pro-enzyme. Statistical analyses were performed using conventional software. Values are expressed as mean \pm standard deviation. Student's T-test was used to calculate the mean differences between groups. Odds ratios (OR) were calculated by conditional logistic-regression analysis. We used the 90th percentile to determine the cut-off values. The cut-off of functional TAFI levels used in order to calculate the OR in relation to the reference group was 126%. To determine the adjusted OR for different variables, we converted factor VIII plasma levels and fibrinogen levels into binary variables. Cut-offs for factor VIII and fibrinogen were 175% and 3.5% g/L, respectively. The basic characteristics of the sample population are given in Table 1. All of the major cardiovascular conventional risk factors were associated with a significantly increased risk of acute CAD. Hypertension, a family history of arterial disease and diabetes were the most relevant risk factors in patients with acute CAD.

Functional TAFI levels tended to be higher in patients with acute CAD [100.8% (range: 49-177)] than in controls [96.9% (range: 50-165)], but this difference did not reach

Table 1. Basic characteristics of patients with acute CAD and the controls.

	Acute CAD (n=174) N (%)	Controls (n=211) N (%)	Unadjusted OR (95%CI) (p value)
Sex (F/M)	54/120	91/120	ns
Age (mean, range, yr)	57 (21-78)	56 (23-80)	ns
Smoking	96 (55)	78 (37)	2.1 (1.4-3.1)*
Hypercholesterolemia	92 (53)	44 (21)	4.3 (2.7-6.7)*
Family history of arterial disease	84 (48)	38 (18)	4.3 (2.7-6.7)*
Hypertension	92 (53)	40 (19)	4.8 (3.0-7.6)*
Morbid obesity	19 (11)	7 (3)	3.6 (1.5-8.7)*
Alcohol intake	11 (6)	11 (5)	Ns
Diabetes mellitus	34 (20)	11 (5)	4.4 (2.2-9.0)*
Factor VIII levels	186.9 (74-526)	159.4 (48-360)	p<0.01
Fibrinogen (g/L)	3.7 (1.9-6.8)	3.5 (2.-7.8)	p<0.05
Antiphospholipids antibodies	16 (9)	4 (2)	5.2 (1.7-15.9)*
Functional TAFI <126%	147	203	1 ^o
Functional TAFI >126%	27	8	4.7 (1.3-8.7)*

*p<0.0005. ns: not significant; F: female; M: male; ^oReference group.

statistical significance (p<0.07). The variation of functional TAFI levels in controls and in patients was not correlated with either sex or age. Only women younger than 30 years showed lower levels. No correlation among TAFI levels and conventional cardiovascular risk factors or hemostatic risk factors were found.

To determine the risk of acute CAD, we used the cut-off level of 126% for functional TAFI. Eight controls and 27 patients showed functional TAFI levels higher than 126%, and 203 controls and 147 patients showed functional TAFI levels lower than 126%. Unadjusted and adjusted OR were calculated using the subjects with functional TAFI levels less than 126% as the reference group. The unadjusted OR for functional TAFI levels was 4.0 (95% CI: 1.6-10.0) in acute CAD patients compared with controls. When we analyzed the risk adjusted by sex, age and other covariables such as hypercholesterolemia, family history of arterial disease, diabetes, antiphospholipids, fibrinogen and factor VIII levels, the adjusted OR was 3.5 (95% CI 1.3-8.7) for acute CAD patients with plasma functional TAFI levels greater than 126%.

In conclusion, we found that a high level of functional

TAFI in plasma confers a significant risk of acute CAD. Thus, functional TAFI plasma levels above the 126% cut-off increased the risk of acute CAD almost 4-fold. To our knowledge, this is the first case-control study that unequivocally establishes that high levels of functional TAFI are associated with an increased risk of acute CAD in patients under the age of 80 years. We hypothesize that high functional TAFI levels may represent a significant thrombotic biomarker for the risk of acute CAD. Knowledge of the pathophysiological role of functional TAFI should lead to a better understanding of the mechanism of thrombotic disease.

Amparo Santamaría,* Antonio Martínez-Rubio, Montserrat Borrell, José Mateo, Rosa Ortin, Jordi Fontcuberta
Hemostasis and Thrombosis Unit, Haematology Department,
*Cardiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,
Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Acknowledgments. We are indebted to Professor WH Stone for his help in the revision and discussion of the manuscript.

Keywords: TAFI, arterial, thrombosis, coronary

Correspondence: Dr. Amparo Santamaría Ortiz, Department of Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Antoni M^a Claret, 167, 08025-Barcelona, Spain. Phone: international +34.931.2919193. Fax: international +34.93.2919192. E-mail: msantamaría@hsp.santpau.es

References

1. Bouma BN, Meijers JCM. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost* 2003;1: 1566-74.
2. Mosnier LO, van der Borne PA, Meijers J, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998;80:829-35.
3. Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, Henry M, Aillaud MF, Alessi MC, et al. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the North and South of Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:867-73.
4. Morange PE, Juhan-Vague I, Scarabin PY, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, et al. Association between TAFI antigen and Ala147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. (The PRIME study). *Thromb Haemost* 2003;89:554-60.
5. Brouwers GJ, Leebeek FG, Tanck MW, Wouterjukkema J, Klufft C, de Maat MM. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. The APRAS study. *Thromb Haemost* 2003;90:92-100.

Stem Cell Transplantation

High-dose granulocyte colony-stimulating factor mobilizes a higher proportion of early CD34⁺CD33⁻ hemopoietic progenitors in children receiving treatment for solid tumors

A relationship between dose of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and maturational stage of the progenitors mobilized in healthy adult donors has been suggested.¹ In this study we characterize the progenitors mobilized by 2 different dosages of G-CSF in children receiving autologous grafts after intensive treatment for solid tumors.

haematologica 2004; 89:881-882

(<http://www.haematologica.org/2004/7/881>)

From 1997 to 2001, 55 children received an autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) transplant as consolidation treatment for solid tumors at The Royal Marsden Hospital. Indications for transplant were: neuroblastoma (27 cases), rhabdomyosarcoma (8), Hodgkin's disease (7), Wilm's tumor (4), non-Hodgkin's lymphoma (2), Ewing's sarcoma (4), germ cell tumor (2) and synovial sarcoma (1). Data on the mobilization and harvest procedures were available in 51/55 cases (31 boys, 20 girls, median age 6.0±4.4 years). All children received G-CSF (5 µg/Kg in 35 cases and 10 µg/Kg in 16 cases) for four consecutive days. The first harvest session was

performed on the 5th day. If an insufficient number of CD34⁺ cells was harvested (<2.5×10⁶ CD34⁺ cells/Kg), the patient received a 5th dose of G-CSF on that day and a second harvest session was performed on the 6th day. Overall, a second harvest was performed in 45 cases. In addition, 24 patients received priming with cyclophosphamide (1.5 g/m²) prior to mobilization with G-CSF. The average time from the last course of chemotherapy to the first harvest session was 28.3±23.9 days.

Conditioning regimens included melphalan (33 cases), busulphan plus melphalan (10), thiotepa plus etoposide (2), carboplatin alone (9), and carboplatin plus melphalan (1).

Endpoints for this study were: numbers of CD34⁺, CD34⁺CD33⁺ and CD34⁺CD33⁻ cells harvested, time to neutrophil and platelet engraftment and influence of harvest timing and cyclophosphamide priming on the maturation stage of these progenitors. High doses of G-CSF appear to mobilize a higher proportion of early CD34⁺CD33⁻ progenitors.

The most relevant data on the qualitative contents of harvests are shown in Table 1. There were no significant differences in overall number of CD34⁺ or CD34⁺CD33⁻ cells harvested after mobilization with either 5 or 10 µg/Kg of G-CSF. However, the percentage of CD34⁺CD33⁻ cells within the CD34⁺ population was significantly (*p*<0.05) higher in patients receiving 10 mg/Kg of G-CSF. A similar dose-dependent effect has been reported in healthy adult donors.^{1,2} A possible explanation is that high doses of G-CSF

Table 1. Most relevant results of the mobilization/harvest procedures according to the dosage of G-CSF. All values are expressed as number of cells×10⁶ per Kilogram body weight. In the last column, values are expressed as percentages. 1st: first harvest; 2nd: second harvest; total: first plus second harvests.

	CD34 ⁺			CD34 ⁺ CD33 ⁻			% CD33 ⁻ within overall CD34 ⁺		
	1 st	2 nd	total	1 st	2 nd	total	1 st	2 nd	total
5 mg/Kg	4.9±8.0	4.4±8.3	8.6±14.8	1.3±1.4	1.6±1.7	2.7±2.8	47.6±30.4	57.9±26	50.9±27.2
10 mg/Kg	2.3±2.2	2.0±1.4	4.2±3.5	2.2±2.1	1.7±1.4	3.7±3.5	73.8±23.4	82.8±16	74.3±23.5

Homozygosity of the *T* Allele of the 46 C→T Polymorphism in the *F12* Gene Is a Risk Factor for Ischemic Stroke in the Spanish Population

Amparo Santamaría, MD; José Mateo, MD, PhD; Isabel Tirado, PharmD; Arturo Oliver, MD; Roberto Belvís, MD; Joan Martí-Fàbregas, MD, PhD; Rosa Felices; José Manuel Soria, MD, PhD; Juan Carlos Souto, MD, PhD; Jordi Fontcuberta, MD, PhD

Background and Purpose—Ischemic stroke (IS) is a complex disease that involves genetic and environmental factors. In a family-based study (the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia [GAIT] Project) that included a genome-wide scan, we demonstrated that a common polymorphism (46 C→T) in the exon 1 of the *F12* gene jointly influences variability of plasma Factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. We have investigated the risk of IS related to this polymorphism in a case-control study.

Methods—We studied 436 individuals: 205 diagnosed with IS and 231 age-gender-ethnic control subjects. We measured Factor VIIIc, fibrinogen, and Factor XIIc levels, and we genotyped the 46 C→T polymorphism in the *F12* gene.

Results—There were 91 women and 114 men in the IS group and 109 women and 122 men in the control group. We confirmed our previous observation that individuals with different genotypes for the 46 C→T polymorphism showed significant differences in Factor XIIc levels. Most importantly, the mutated *T* allele in the homozygous state (genotype *T/T*) was associated with an increased risk of IS with an adjusted odds ratio of 4.1 (95% CI, 1.1 to 15.9).

Conclusions—This study suggests that the 46 C→T polymorphism is a genetic risk factor for IS in the Spanish population. In addition, our results confirm that the use of genetic linkage studies along with a case-control association study is an extremely valuable approach for identifying DNA variants that affect complex diseases. (*Stroke*. 2004;35:1795-1799.)

Key Words: Factor XII ■ polymorphism ■ stroke, ischemic

As a result of the success of the Human Genome Project to identify genes that influence the pathogenesis of diseases, there has been a renewed interest in the knowledge of new, putative “stroke genetic risk factors.”¹ Current research on complex diseases, such as ischemic stroke (IS), now focuses on identifying genetic variants that increase the susceptibility to thrombotic disorders.²⁻⁴

Ischemic stroke is a complex disease resulting from the interaction between environmental and genetic factors.⁵⁻⁷ Although results are controversial, some hemostatic factors⁸ including Factor XII have been associated with the risk of arterial thrombotic disease, including IS.⁹⁻¹¹

Factor XII is a plasma protein and a member of the serin-protease family.¹²⁻¹⁴ Once activated, it initiates the contact activation system; it also has fibrinolytic properties.¹⁵ Severe congenital Factor XII deficiencies have been described, but its association with thromboembolic complications is controversial.¹⁰ Some studies have reported that variability of plasma Factor XII levels are associated with the predisposition to arterial thrombosis.^{13,14} A common genetic

polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation Factor XII gene has been associated with low translation efficiency and variability of Factor XII levels in the general population.¹²

Association studies have shown the relationship of Factor XII levels and the 46 C→T polymorphism in the development of arterial disease, but the results are controversial.^{13,14,16-18} To our knowledge, only 1 study has explored the association between IS and this polymorphism.⁸

Association studies to determine the risk of thrombosis related to a polymorphism must be done with great caution.^{19,20} New guidelines have been provided in 2 editorials.^{21,22} They contain recommendations on the desirable features of a genetic association study. If these guidelines are followed, association studies can be powerful tools to provide information about the prevalence of genetic risk factors and their contribution to the development of IS or other thrombotic diseases.

We followed these guidelines in our study. We took into account the results from our GAIT (Genetic Analysis of

Received, October 1, 2004; final revision received April 13, 2004; accepted April 29, 2004.

From the Hemostasia Unit (A.S., J.M., I.T., A.O., R.F., J.M.S., J.C.S., J.F.), Department of Hematology, and the Stroke Unit (R.B., J.M.-F.), Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain.

Correspondence to Dr Amparo Santamaría Ortiz, Department of Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Antoni M[§] Claret, 167, 08025, Barcelona, Spain. E-mail msantamaria@hsp.santpau.es

© 2004 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://www.strokeaha.org>

DOI: 10.1161/01.STR.0000133127.68041.a3

Idiopathic Thrombophilia) Project, a family-based study.^{23–25} The GAIT Project, with the benefit of the results of a genome-wide scan, demonstrated a substantial overlap in the genetic contribution to venous and arterial thrombosis.²³ It is safe to conclude that there are common genes involved in the pathogenesis of both venous and arterial thromboses. Also, within the framework of the GAIT Project, we demonstrated that a polymorphism in exon 1 of the *F12* gene (a C→T transition at nucleotide 46) jointly influences Factor XII levels and the risk of thrombosis.²⁵ To strengthen these results, we constructed an age–gender–ethnic-matched case–control study of an independent sample of Spanish individuals with IS.

Materials and Methods

Study Subjects

Our population-based case–control study consisted of 205 patients diagnosed with IS and 231 age–gender–ethnic-matched control subjects. Patients with IS were admitted to the Stroke Unit of our hospital between 1998 and 2003. The patients were aged 20 to 80 years and each had at least 1 episode of IS. The stroke patients were enrolled in our study at least 1 month after the acute event.

The diagnosis and classification of the different types of IS were based on an extensive diagnostic evaluation, including findings of medical history, general clinical and neurological examination, laboratory investigation, CT or MR imaging of the brain, cerebrovascular imaging (extracranial carotid and vertebral ultrasonography, carotid transcranial Doppler ultrasound, MR angiography, or conventional cerebral angiography), and also transesophageal or transthoracic echocardiography. Patients were classified into different stroke categories based on criteria in the Trial of Org 10172 in Acute Treatment (TOAST) study.²⁶ Cardioembolism, small vessel disease, large vessel atherosclerosis, and cryptogenic stroke were included; strokes of unusual causes were excluded.

Control subjects were friends and spouses of patients who were recruited at the same time as the patients; they were included only if they had no personal history of thromboembolic disease, including venous and arterial thrombosis, cirrhosis, nephrotic syndrome, or active cancer. In addition, they were excluded if they were using oral anticoagulants. The control group was matched for age and sex with the patient group. To avoid genetic stratification, both groups were collected from the same geographical area (all with both family names of Spanish origin).

Patients and controls gave informed consent. The interview included questions on personal and family history of cardiovascular diseases; conventional cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes, and hypercholesterolemia; if they had ever been diagnosed by a physician as such; or were currently taking prescription drugs for these conditions. Also, we recorded other cardiovascular risk factors such as smoking, alcohol intake, and morbid obesity. Average alcohol intake >300 g per week was considered significant and was recorded as such; alcohol intake <300 g per week was recorded as nonsignificant intake. Morbid obesity was recorded if the body mass index (calculated as body weight (kg) divided by height squared (m²) was ≥ 30 kg/m². A subject was considered morbidly obese when body mass index was >30 kg/m² and not morbidly obese when body mass index was <30 kg/m². Smokers were defined as persons who were smoking at least 5 cigarettes per day during the 5 years before the study; a subject was considered a nonsmoker if <5 cigarettes per day were smoked. The family history was positive if at least a first- or second-degree family member had venous or arterial thrombosis including IS or acute coronary artery disease.

Laboratory Methods

Blood samples were obtained from the antecubital vein at least 1 month after the acute episode. Samples for hemostatic tests were

collected in 1/10 volume of 0.129 mol/L sodium citrate. Fibrinogen was measured by Clauss method as described elsewhere. Assays for Factor VIII were performed immediately on fresh plasma samples; the remaining plasma samples were stored at -80°C until used. Factor VIIIc and Factor XIIc were assayed using deficient plasma from Diagnostica Stago.

Genetic Analysis

DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a standard protocol.²⁷ The 46 C→T variant was screened using the primers described previously,¹² with minor modification in the reaction conditions.²⁵

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using SPSS software. The values are expressed as mean \pm SD. Student *t* test was used to calculate the mean differences between groups. Conventional cardiovascular risk factors were considered as dichotomous covariables. We performed the χ^2 test for group comparison of the frequencies. $P < 0.05$ were considered significant. According to receiver operating characteristic (ROC) curves, we considered elevated Factor VIII levels if $>176\%$ and elevated fibrinogen levels if >3.5 g/L. To determine the adjusted odds ratio (OR) of IS, we converted the Factor VIII and the fibrinogen levels in binary variables using the above mentioned values as cutoffs. We analyzed the Factor XII as a dichotomous variable. This problem occurs frequently in the hemostatic factors because of its complex and paradoxical hemostatic effects. That is why we often use dichotomized variables to establish the risk associated with thrombosis. For Factor XIIc, we used levels lower than the 10th percentile ($<74\%$) as a cutoff.

The plasma levels of Factor XIIc were compared among different genotypes of 46 C→T by 1-way ANOVA. ORs were calculated as relative risk for IS adjusted for age, sex, and other covariables by logistic regression. For analysis we considered 2 combinations, one considering the genotypes *C/C* and *C/T* as the reference group and another considering the genotype *C/T* and *T/T* as the reference group.

Results

The basic characteristics of the sample population are given in Table 1. Mean age at the time of the first episode of IS was 56 years (range, 23 to 80). The mean age of the controls was 54 years (range, 21 to 80). Ninety-one women and 114 men made up the IS group; 109 women and 122 men, the control group. All of the major cardiovascular conventional risk factors, such as hypercholesterolemia, hypertension, or diabetes mellitus, were associated with a significant increased risk of IS. Only smoking and morbid obesity were not associated with an increased risk of IS. Patients with positive family histories of arterial thrombosis showed an increase risk of IS (4.5; 95% CI, 2.9 to 6.9). Factor VIIIc (mean 187.9%; range, 62 to 516) and fibrinogen levels (3.7 g/L; range, 1.9 to 8.4) were increased significantly in patients compared with the controls (155.5%; range, 48 to 360; and 3.5 g/L; range, 2.1 to 7.8). The levels of Factor VIIIc $>176\%$ and fibrinogen levels >3.5 g/L were associated with a higher risk of IS (2.2; 95% CI, 1.5 to 3.2; $P < 0.001$; and 1.9; 95% CI, 1.2 to 2.9; $P < 0.01$, respectively). Cryptogenic stroke was diagnosed in 107 patients. Cardioembolism was diagnosed in 26 patients and small vessel disease in 39 patients. Large vessel atherosclerosis was diagnosed in 33 patients. Genotype *T/T* was found in 6 patients with cryptogenic stroke, 1 patient with cardioembolism, 2 patients with small vessel disease, and 3 patients with large vessel atherosclerosis.

The distribution of the 46 C→T polymorphism of the *F12* gene are shown in Table 2. The prevalence of genotype *C/C*

TABLE 1. Basic Characteristics of Patients and Controls

	IS (n=205)	Controls (n=231)	Unadjusted OR (95% CI)
Sex (F/M)	91 F/114 M	109 F/122 M	NS
Age in years, mean (range)	56 (23–80)	54 (21–80)	NS
Smoking, n (%)	92 (45)	93 (40)	1.2 (0.8–1.8)
Hypercholesterolemia, n (%)	71 (35)	44 (19)	2.2 (1.4–3.4)*
Family history of arterial thrombosis, n (%)	106 (51.7)	44 (19)	4.5 (2.9–6.9)*
Hypertension, n (%)	90 (43.9)	40 (17.3)	3.7 (2.4–5.7)*
Morbid obesity, n (%)	9 (4.4)	6 (2.6)	1.7 (0.6–4.9)
Alcohol intake, n (%)	17 (8.3)	11 (4.8)	6.9 (2.3–21.1)*
Diabetes mellitus, n (%)	35 (17)	11 (5)	4.1 (2.1–8.3)*
Factor VIIIc levels, mean % (range)	187.9 (62–516)	155.5 (48–360)	<i>P</i> <0.001
Fibrinogen, mean g/L (range)	3.7 (1.9–8.4)	3.5 (2.1–7.8)	<i>P</i> <0.01

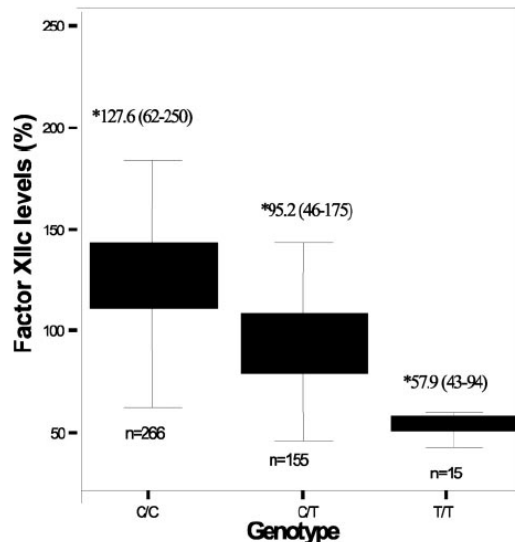
*Difference statistically significant (*P*<0.05).

was ≈62% in patients and 61% in controls. The prevalence of genotype C/T was ≈33% in patients and 38% in controls. The differences of the prevalences were not statistically significant. In contrast, the prevalence of genotype T/T was almost 6% in patients and <2% in controls. Here the difference was statistically significant (*P*<0.001). The frequency of the 46 C/T polymorphism was in the Hardy–Weinberg equilibrium. This frequency is included in the confidence interval of our controls in the Spanish population (2%; 95% CI, 0.7 to 4.6).²⁴ There were no statistically significant differences in mean values of plasma Factor XIIc levels between patients (112.3±35.1) and controls (114.6±25.9) (data not shown). The distribution of plasma Factor XIIc levels according to the genotype is shown in the Figure. The Factor XIIc levels, analyzed as a function of the 46 C→T polymorphism, showed statistically significant differences between the different genotypes (*P*<0.0001). Genotype T/T showed the lowest levels of Factor XIIc (57.9%; range, 43 to 94) compared with the levels of the other genotypes (C/C genotype: 127.6%; range, 62 to 250 and C/T genotype: 95.2; range, 46 to 175).

The risk of IS associated with plasma Factor XIIc plasma levels and with C/C, C/T, and T/T genotypes are shown in Table 3. The crude OR of IS associated with low levels of Factor XIIc (<74%) in patients compared with controls was 2.7 (95% CI, 1.4 to 5.2). When we adjusted for sex, age, and other covariables, such as Factor VIIIc, hypercholesterolemia, hypertension, diabetes, and fibrinogen, the OR was 2.9 (95% CI, 1.3 to 6.2) for IS patients compared with the controls.

We studied the risk of IS associated with the genotype C/C. The crude OR of IS associated with the 46 C→T poly-

morphism for the genotype C/C was 1.0 (95% CI, 0.7 to 1.5). When we analyzed the risk adjusted for sex, age, and other covariables, such as Factor VIIIc, smoking, hypercholesterolemia, hypertension, diabetes, and fibrinogen, the OR was 1.0 (95% CI, 0.7 to 1.5) for IS patients compared with the controls. We also studied the risk of IS associated with the genotype C/T. The crude OR of IS associated with the 46 C→T polymorphism for the genotype C/T was 1.3 (95% CI, 0.9 to 1.9). When we analyzed the risk adjusted for sex, age, and other covariables, the OR was 1.2 (95% CI, 0.8 to 1.9) for IS patients compared with the controls. The crude OR of IS associated with the 46 C→T polymorphism for the T/T genotype was 4.7 (95% CI, 1.3 to 16.9). When we analyzed the risk adjusted for sex, age, and other covariables, such as Factor VIIIc, smoking, hypercholesterolemia, hypertension,



Distribution of the Factor XIIc levels according to the 46 C→T polymorphism of the F12 gene in the Spanish population. *Factor XIIc levels, mean value, and range.

TABLE 2. Distribution of the 46 C→T Polymorphism of the F12 Gene in the Spanish Population

	IS N (%)	Controls N (%)
C/C (n=266)	126 (61.5)	140 (60.6)
C/T (n=155)	67 (32.7)	88 (38.1)
T/T (n=15)	12 (5.9)	3 (1.3)

TABLE 3. Risk of IS Associated With Factor XIIc Plasma Levels and Associated With *T/T*, *C/T*, and *C/C* Genotypes

	IS N=205	Controls N=235	OR* (95% CI)	OR† (95% CI)
Factor XIIc >74%, n (%)	176 (85.8)	222 (94.1)	1‡	1‡
Factor XIIc <74%, n (%)	29 (14.2)	13 (5.9)	2.7 (1.4–5.2)	2.9 (1.3–6.2)
<i>C/T</i> and <i>T/T</i> , n (%)	138 (67.3)	143 (61.9)	1§	1‡
<i>C/T</i> , n (%)	67 (32.7)	88 (38.1)	1.3 (0.9–1.9)	1.2 (0.8–1.9)
<i>C/T</i> and <i>T/T</i> , n (%)	78 (38.5)	91 (39.4)	1§	1§
<i>C/T</i> , n (%)	126 (61.5)	140 (60.6)	1.0 (0.7–1.5)	1.0 (0.7–1.6)
<i>C/C</i> and <i>C/T</i> , n (%)	193 (94.1)	228 (98.7)	1§	1§
<i>T/T</i> , n (%)	12 (5.9)	3 (1.3)	4.7 (1.3–16.9)	4.1 (1.1–15.9)

*Unadjusted OR.

†Adjusted by age, sex, smoking, hypertension, obesity, hypercholesterolemia, diabetes, fibrinogen, and Factor VIIIc levels.

‡Reference group: subjects with Factor XIIc >74%.

§Reference group.

diabetes, and fibrinogen, the OR was 4.1 (95% CI, 1.1 to 15.9) for IS patients compared with the controls. This suggests that genotype *T/T* is an independent risk factor for IS.

Discussion

Our case-control study showed an adjusted OR of 4.1 (95% CI, 1.1 to 15.9) for IS associated with the genotype *T/T* of the 46 C→T polymorphism, and confirms and extends the previous observation that individuals with different genotypes for the 46 C→T polymorphism show statistically significant differences in their plasma Factor XIIc levels.²⁴ Also, in our study, conventional cardiovascular risk factors such as hypertension and diabetes, were associated with the risk of IS. Hemostatic risk factors, such as fibrinogen and Factor VIIIc levels, also increase the risk of IS. These results agree with those of other studies.^{7,8}

Several studies have reported an association between the 46 C→T polymorphism and cardiovascular disease, ie myocardial infarction. However, this association was not confirmed in subsequent studies.^{16,17} Only 1 study in a Japanese population has explored this association with IS, and there was no statistically significant association of this polymorphism with the risk of IS.⁹

Our study is unique because our strategy was designed to avoid the well-known biases of association studies with regard to establishing a polymorphism as a risk factor for the development of thrombotic disease.²⁰ From the GAIT Project (a family-based study), we knew that there was a linkage between the 46 C→T polymorphism in the *F12* gene and the thromboembolic disease, including cardiovascular disease.²⁴ We demonstrated a high heritability (h^2 : 67%) of Factor XII and we reported also that the structural *F12* gene influenced both susceptibility to thrombosis and Factor XII plasma levels.^{24,25} Following these results, we were able to design an age-gender-ethnic-matched case-control study in an independent population that replicated the GAIT Project results.

The small sample, which is constricted by the fact that only survivors of IS are included in this case-control study, is one of the limitations and a major problem in many cardiovascular case-control studies, but only prospective studies shed

some light on this inherent design problem. Despite these provocative results, the role of Factor XII levels in the development of IS is still not well understood. It has been suggested that activated Factor XII has a pivotal role in several pathways concerned with tissue defense and repair, including the initiation of the intrinsic pathways in blood coagulation. It acts as a potent activator of plasminogen¹⁴ and contributes to fibrinolysis.¹⁵ It has been hypothesized that Factor XII is implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. It appears that human endothelial cells possess receptors for Factor XII, and Factor XII is activated on contact with biological surfaces.¹¹ It may be that low levels of Factor XII reflect vascular lesions and a lower fibrinolysis activity. Both mechanisms of action might increase the risk of IS.^{14,15} In our study, we found that low levels of Factor XIIc (<74%) increased the risk of IS. These data are in agreement with the observed risk of thromboembolic complications in some patients with Factor XII deficiency but not in other patients.¹⁰ It is well-known that the development of IS as a complex disease depends on the interaction of multiple environmental and genetic factors. This complexity may explain the liability to develop IS in some patients with low levels (including severe deficiencies) of Factor XII levels. It is clear that further studies are needed to elucidate the role of Factor XII levels in IS.

In conclusion, we found a 4-fold higher risk of IS associated with the homozygosity of the *T* allele of the *F12*, 46 C→T polymorphism in the Spanish population. We hope that this study along with others will help assess the feasibility of developing new strategies to prevent IS and to develop therapeutical approaches.

Acknowledgments

We are indebted to Professor W.H. Stone for his help in discussing and revising the manuscript.

References

1. Alberts MJ. Genetics update: impact of the Human Genome Project and identification of the stroke gene. *Stroke*. 2001;32:1239–1241.
2. Meschia JF. Addressing the heterogeneity of the ischemic stroke phenotype in the Human genetics research. *Stroke*. 2002;33:2770–2774.

3. Austin H, Chimowitz MI, Hill HA, Chaturvedi S, Wechsler LR, Wityk RJ, Walz E, Wilterdink JL, Coull B, Sila CA, Mitsias P, Evatt B, Hooper WC; Genetics and Stroke in the Young Study Group. Cryptogenic stroke in relation to genetic variation in clotting factors and other genetic polymorphisms among young men and women. *Stroke*. 2002;33:2762–2768.
4. Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br J Haematol*. 2001;115:491–506.
5. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischemic stroke. *Brain*. 2002;123:1784–1786.
6. Williams MS, Bray PF. Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Exp Biol Med*. 2001;226:409–419.
7. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, Coper LS, Aleksic N, Nieto FJ, Rasmussen ML, Wu KK. Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation*. 1999;100:736–742.
8. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost*. 2001;85:584–595.
9. Oguchi S, Ito D, Murata M, Yoshida T, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Ikeda Y, Watanabe K. Genotype distribution of the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII in the Japanese population: absence of its association with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Haemost*. 2000;83:178–179.
10. Zeerleder S, Schloesser M, Redondo M, Willemin WA, Engel W, Furlan M, Lammle B. Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency—a study on 73 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost*. 1999;82:1240–1246.
11. Ishii K, Oguchi S, Murat M, Mitsuyoshi Y, Takeshita E, Ito D, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Oosumi K, Matsumoto K, Kitajima M, Yamamoto M, Watanabe G, Ikeda Y, Watanabe K. Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46 C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinol*. 2000;11:277–284.
12. Kanaji T, Okamura T, Osaki K, Kuroiwa M, Shimoda K, Hamasaki N, Niho Y. A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*. 1998;91:2010–2014.
13. Miller GJ, Esnouf MP, Burgess AI, Cooper JA, Mitchell JP. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2103–2106.
14. Zito F, Drummond F, Bujac S, Esnuf P, Morrissey JH, Humphries SE, Miller GJ. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2000;102:2058–2062.
15. Braat EA, Dooijewaard G, Rijken DC. Fibrinolytic properties of activated FXII. *Eur J Biochem*. 1999;263:904–911.
16. Kohler HP, Futers TS, Grant PJ. FXII (46C→T) polymorphism and vivo generation of FXII activity-gene frequencies and relationship patients with coronary artery disease. *Thromb Haemos*. 1999;87:745–747.
17. Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE; WOSCOI Study. Association of the factor XII 46C→T polymorphism with risk coronary heart disease in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis*. 2001;165:153–158.
18. Endler G, Mannhalter, Sunder-Plassmann H, Lalouchek W, Kapiotis Exner M, Jordanova N, Meier S, Freja K, Oswald W, Kurt H. Homozygosity for the 46C→T polymorphism at nucleotide 46 in the 5'-untranslated region of the factor XII gene protects from development acute coronary syndrome. *Br J Haematol*. 2001;115:1007–1009.
19. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphism and complex disease. *Lancet*. 2000;355:308–311.
20. Almasy L, MacCluer JW. Association studies of vascular phenotype: how and why? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1055–1057.
21. Editorial. Freely associating. *Nat Genet*. 1999;22:1–2.
22. Cooper DN, Nussbaum RL, Krawczak M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet*. 2002;110:207–208.
23. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Cordero I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GA study. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1452–1459.
24. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, Martine Marchán E, Mateo J, Borrell M, Stone W, Lathrop M, Fontcuberta Blangero J. A quantitative-trait locus in the human factor XII gene jointly influences plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:567–574.
25. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Gari M, Martínez E, Mateo J, Stone W, Blangero J, Fontcuberta J. Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation*. 2000;101:1546–1551.
26. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon D, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35–41.
27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res*. 1988;16:1215.

Letters to the Editor

- mopathies in the adult population of Finistere, France. *J Clin Pathol* 1982;35:63-8.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346:564-9.
 - Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E, Granata S, Valentini M, Morra E. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002;20:1625-34.
 - Gregersen H, Møllekjær L, Ibsen JS, Dahlerup JF, Thomassen L,

- Sorensen HT. The impact of M-component type and immunoglobulin concentration on the risk of malignant transformation in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2001;86:1172-9.
- Gregersen H, Ibsen J, Møllekjær L, Dahlerup J, Olsen J, Sorensen H. Mortality and causes of death in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2001;112:353-7.
 - Van De Donk N, De Weertd O, Eurelings M, Bloem A, Lokhorst H. Malignant transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance: cumulative incidence and prognostic factors. *Leuk Lymphoma* 2001;42:609-18.

Thrombosis

Homozygosity of the T allele of the 46 C→T polymorphism in the F12 gene is a risk factor for acute coronary artery disease in the Spanish population

Following new guidelines that contain recommendations on the desirable features of a genetic association study, we performed a case-control study to establish the risk of acute coronary artery disease (CAD) related to the polymorphism (46 C→T) in the *F12* gene. We found a 6-fold higher risk of acute CAD associated with the homozygosity of the T allele of the *F12*, 46C→T polymorphism in the Spanish population.

haematologica 2004; 89:878-879
(<http://www.haematologica.org/2004/7/878>)

Acute coronary artery disease (CAD) is complex and results from interactions between environmental and genetic factors.^{1,2} Association studies have shown that there is a relation between factor XII levels and the 46 C→T polymorphism in the development of CAD, but the results are controversial.³⁻⁶

Our association study is unique because it was designed to avoid the usual biases of association studies in regard to establishing a polymorphism as a risk factor. We followed the new guidelines containing recommendations on the desirable features of a genetic association study.^{7,8} From the GAIT Project (a family-based study), we demonstrated a high heritability ($h^2 = 67\%$) of factor XII, and we also reported that the structural *F12* gene influenced both susceptibility to thrombosis and plasma levels of factor XII.⁹⁻¹⁰ Following these results, we conducted an age-gender-ethnic matched, case-control study of an independent sample of Spanish individuals to assess the risk of acute CAD associated with the 46 C→T polymorphism of the *F12* gene and factor XII levels.

We included 174 patients who were diagnosed as having acute CAD, and 211 control subjects. Patients with acute CAD were admitted to the Cardiology Department of our hospital between 1998 and 2003 at their first episode of acute CAD. Acute CAD was confirmed on the basis of definitive ischemia or necrosis of the myocardium. Control subjects were friends and spouses of patients; they were included only if they had no personal history of thromboembolic disease, including venous and arterial thrombosis, cirrhosis, nephrotic syndrome or active cancer. Patients and controls gave informed consent to participation in the study. A limitation of our study is that it included the survivors of the acute event. Blood samples were obtained from the antecubital vein no earlier than 6 months after the acute episode. Fibrinogen was measured by the Clauss method as described elsewhere. Assays for factor VIII were

Table 1. Basic characteristics of patients and controls

	ACAD (n=174) n (%)	Controls (n=211) n (%)	Unadjusted OR (95% CI) and p values
Sex (female/male)	54/120	91/120	NS
Age (years, mean, range)	57 (21-78)	57 (26-80)	NS
Smoking	96 (55)	78 (37)	2.1 (1.4-3.2)*
Hypercholesterolemia	92 (53)	44 (21)	4.3 (2.7-6.7)*
Family history of arterial thrombosis	84 (48)	38 (18)	4.3 (2.7-6.7)*
Hypertension	92 (53)	40 (19)	4.8 (3.0-7.5)*
Obesity	19 (11)	7 (3)	3.5 (1.5-8.7)*
Alcohol intake	11 (6)	11 (5)	1.7 (0.5-2.9)
Diabetes mellitus	34 (20)	11 (5)	4.4 (2.2-9.0)*
Factor VIIIc levels, % (mean, range)	186.9 (74-526)	159.4 (48-360)	$p < 0.0001$
Fibrinogen, g/L, mean, range)	3.7 (1.9-6.9)	3.5 (2.1-7.8)	$P = 0.05$

*Differences are statistically significant ($p < 0.05$).

performed on fresh plasma samples. The remaining plasma samples were stored at -80°C until used. Factor VIIIc and factor XIIc were assayed using deficient plasma from Diagnostica Stago (Asnières, France).^{9,10} The 46 C→T variant was determined using the primers described previously with minor modification in the reaction conditions.¹⁰ For statistical analysis, using ROC curves, we considered factor VIII levels to be elevated if they were higher than 151% an fibrinogen levels elevated if they were higher than 3.5 g/l. For factor XIIc, we used levels lower than the 10th percentil (lower than 68%) as a cut-off. Odds ratios (OR) were calculated as risk for acute CAD adjusted for age and sex and other co-variables by logistic regression. We considered the genotypes C/C and C/T as the reference group. p value < 0.05 were considered statistically significant.

The basic characteristics of the sample population are given in Table 1. All of the major cardiovascular conventional risk factors, such as hypercholesterolemia, hypertension, and diabetes mellitus, were associated with a signifi-

Table 2. Risk of acute CAD (ACAD) associated with factor XIIc plasma levels and with T/T genotype.

	ACAD n=174	Controls n=211	OR* OR ^o	OR ^o
Factor XIIc >68 %, n (%)	158 (91)	207 (98)	1#	1#
Factor XIIc <68 %, n (%)	16 (9)	4 (2)	5.1 (95% CI: 1.7-15.5)	5.9 (95%CI: 1.7-20.5)
C/C and C/T, n (%)	164 (94.3)	208 (98.6)	1 ^o	1 ^o
T/T, n (%)	10 (5.7)	3 (1.4)	4.2 (95% CI:1.2-15.6)	4.8 (95%CI: 1.2-20.5)

*Unadjusted. ^oAdjusted by age, sex, smoking, hypertension, obesity, hypercholesterolemia, diabetes, fibrinogen and factor VIIIc levels. #Reference group: subjects with factor XIIc >68%. ^oReference group: subjects with C/C and C/T genotype.

cantly increased risk of acute CAD. Levels of factor VIIIc higher than 151% were associated with a higher risk of acute CAD.

The prevalence of the C/C genotype was about 60% in both patients and in controls; the prevalence of the C/T genotype was 35% in patients and 38% in controls ($p=ns$). In contrast, the prevalence of genotype T/T was almost 6% in patients and less than 2% in controls ($p<0.001$). Factor XIIc levels, analyzed as a function of the 46 C→T polymorphism, were statistically significantly different among groups with the different genotypes. Subjects with T/T genotype showed lower levels of factor XIIc [52.5% (range: 27-74)] than those with the other genotypes [C/C genotype: 124.1% (range: 58-180) and C/T genotype: 98.1 (range: 52-164)].

The risk of acute CAD associated with plasma factor XIIc levels and with genotype T/T is shown in Table 2. The crude OR of acute CAD associated with low levels of factor XIIc (<68%) in patients compared within controls was 5.1 (CI 95%: 1.7-15.5), when we adjusted for covariables, the OR was 5.9 (95% CI: 1.7-20.5). The crude OR of acute CAD associated with the 46 C→T polymorphism for the T/T genotype was 4.2 (95% CI: 1.2-15.6); when we adjusted for co-variables, the OR was 4.8 (95% CI: 1.2-20.5). The risk was not statistically significant when adjusted by factor XII levels as a covariate.

In conclusion, we found a 6-fold higher risk of acute CAD associated with homozygosity of the T allele of the F12, 46 C→T polymorphism in the Spanish population. We also found that low levels of factor XIIc (<68%) are associated with a higher risk of acute CAD. Knowledge of genetic variants related to the risk of acute CAD should allow us to understand arterial disease better, and ultimately lead us to improve the management of patients with acute CAD.

Amparo Santamaría, Antonio Martínez-Rubio,* José Mateo, Isabel Tirado, José M. Soria, Jordi Fontcuberta

Unitat d'Hemostasia i Trombosis, Hematology Department, *Cardiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Acknowledgments: We are indebted to Professor W.H.Stone for his help in the discussion and revision of this manuscript.

Correspondence: Dr. Amparo Santamaría Ortiz, Department of Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, C/ Sant Antoni M^a Claret, 167, 08025-Barcelona, Spain. Phone: international +34.93.2919193. Fax: international +34.93.2919192. E-mail: msantamaria@hsp.santpau.es

References

1. Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 2001;115:491-506.
2. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2001; 85:584-95.
3. Kohler HP, Futers TS, Grant PJ. FXII (46C→T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity-gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999;81:745-7.
4. Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. WOSCOPS Study. Association of the factor XII 46C→T polymorphism with risk of coronary heart disease in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis* 2002;165:153-8.
5. Endler G, Mannhalter, Sunder-Plassmann H, Lalouschek W, Kapiotis S, et al. Homozygosity for the 46C→T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J Haematol* 2001;115:1007-9.
6. Colhoun H, Zito F, Norman Cha N, Rubens MB, Fuller JH, Humphries SE. Activated factor XII levels and factor XII 46 C→T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects. *Atherosclerosis* 2002;163:363-9.
7. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphism and complex disease. *Lancet* 2000; 355:308-11.
8. Cooper DN, Nussbaum RL, Krawczak M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet* 2002;110:207-8.
9. Souto JC, Almasy L, Borrelli M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, et al. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: The GAIT study. *Am J Hum Genet* 2000;67:1452-9.
10. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A quantitative trait locus in the human factor XII gene jointly influences plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:567-74.

DISCUSIÓN CONJUNTA

THOMBIN-ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI)

Variabilidad del TAFI funcional en población española.

Uno de los aspectos importantes que se debe de estudiar ante la caracterización de una nueva molécula es conocer la variabilidad en las diferentes poblaciones y la posible correlación de los niveles de esta molécula con factores como la edad, el sexo, y si los niveles varían en función de otros fenotipos. En el caso del TAFI, era importante conocer su variabilidad en función del sexo y edad. Además, dada la cantidad de estudios que lo relacionaban con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, la variación de los niveles en función de factores de riesgo convencionales cardiovasculares nos ayudaría establecer si las personas con factores de riesgo cardiovasculares presentaban niveles diferentes de TAFI con respecto a población sin factores de riesgo. Existe sólo un trabajo que haya estudiado la variación de los niveles de TAFI antigénico con los diferentes factores de riesgo como la diabetes, la hipertensión, etc., Y sólo un estudio sobre la variabilidad del TAFI antigénico en función del sexo y la edad. No existe, además, ninguna publicación que correlacione el TAFI antigénico con otros factores hemostáticos como el fibrinógeno, factor VIII, etc. Por ello, este es el primer estudio que establece las variaciones de TAFI funcional en función de estos parámetros. No realizamos las correlaciones en cuanto al TAFI antigénico ya que los últimos datos obtenidos en otros trabajos han establecido que los resultados del TAFI antigénico en cuanto a enfermedad cardiovascular y variabilidad podían ser espurios. La explicación de este hecho viene dada porque el anticuerpo utilizado en el método ELISA sólo expresaba reactividad frente a una de las isoformas del TAFI en función de la influencia de los diferentes polimorfismos del TAFI en la población estudiada. Ello provoca que dichos resultados no fueran extrapolables a otras poblaciones o sujetos, y por tanto, las conclusiones a las que se pudiesen llegar con el TAFI antigénico deben de tomarse con precaución.

En cuanto a nuestros resultados, no observamos diferencias en los niveles de TAFI funcional en función de la edad en los hombres. Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de TAFI funcional entre los hombres y mujeres mayores de 30 años. Sin embargo, las mujeres menores de 30 años presentaron niveles significativamente inferiores de TAFI funcional a las mujeres de mayor edad. La explicación podría estar relacionada con factores hormonales como los anticonceptivos orales, ya que existen estudios que así lo demuestran. Pero en nuestra

población, el tamaño de la muestra impidió analizar esta relación. Es interesante esta observación, ya que explicaría, en parte, el estado protrombótico de las mujeres en función de la edad y del ambiente hormonal, que lleva a un aumento del desarrollo de enfermedad tromboembólica arterial a edades tardías. Estos datos son similares a los obtenidos por Chetaille *et al* (85), en el que se estudiaba las variaciones de TAFI antigénico en hombre y mujeres en función de la edad.

Los hombres no presentaron variación en los niveles de TAFI funcional asociados a los diferentes factores de riesgo cardiovascular, como dislipemia, tabaquismo, diabetes mellitus, ingesta de alcohol, obesidad o hipertensión. Juhan-Vague *et al* (96) en su estudio sobre la asociación de TAFI antigénico y los factores de riesgo cardiovasculares también obtuvieron similares resultados. Las mujeres con dislipemia presentaron un aumento de los niveles de TAFI funcional con respecto a las mujeres sin dislipemia. No presentaron variación en función del resto de los factores de riesgo cardiovasculares. Juhan-Vague *et al* (96) no encontraron diferencias en los niveles de TAFI antigénico y los diferentes factores de riesgo tras ajustar por edad, aunque encontraron una correlación positiva con los niveles de colesterol. En este estudio concluyen que la variabilidad del TAFI antigénico no está influida por el estilo de vida ni factores de riesgo clásicamente relacionados con las enfermedades cardiovasculares, y sugieren, por tanto, que su variación estaría más condicionada a factores genéticos.

Las correlaciones del TAFI funcional con diferentes factores de la hemostasia fueron significativas, pero al ajustar por diferentes covariables como sexo y edad, perdieron significación estadística. No existen datos al respecto en otros estudios ni con el TAFI antigénico ni con el TAFI funcional.

Estos resultados implican que la variabilidad del TAFI funcional también parece estar determinada principalmente por factores genéticos, y que no parece haber correlación fenotípica con el resto de factores de la hemostasia, por lo que su variabilidad no dependería de genes relacionados con la variabilidad de los otros factores, Henry *et al* (71) y Trégouet *et al* (72), han demostrado esta observación, ya que existen varios polimorfismos en el gen estructural del TAFI que explican la mayor parte de la variabilidad del TAFI antigénico. En cuanto al TAFI funcional, además de esa importante base genética, también existen interacciones gen-gen y gen-ambiente, sobre todo en las mujeres que explicaría la variación de los niveles de TAFI en cuanto a la edad y a la presencia de dislipemia.

Trombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) y Enfermedad Tromboembólica Arterial

Varios estudios han relacionado los niveles altos de TAFI antigénico con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares como los síndromes coronarios agudos, pero ninguno había estudiado su relación con la enfermedad cerebrovascular isquémica. Partiendo de la hipótesis de que niveles altos de TAFI estarían asociados a un riesgo superior de desarrollar enfermedad, llevamos a cabo los primeros estudios que asociaban los niveles de TAFI funcional con el riesgo de enfermedad tromboembólica arterial. Por supuesto, en ambos estudios, hemos de tener en cuenta que solo hemos incluido a los supervivientes de la enfermedad, pero este es el problema más común en el diseño de este tipo de estudios.

En la población con síndrome coronario agudo, los niveles de TAFI funcional superiores a 126% se asociaron a un riesgo casi 5 veces mayor de padecer la enfermedad, incluso tras ajustar por las diferentes covariables. El resto de factores de riesgo cardiovasculares que estudiamos y que utilizamos para el modelo de regresión, también se asociaron a un riesgo superior de enfermedad trombótica. Entre ellos cabe destacar la historia familiar de trombosis, la hipertensión y la diabetes. También se estudió la posible variación en función del sexo y edad, y los diferentes factores de riesgo cardiovasculares en población control y con síndrome coronario agudo, y sólo mujeres con edad inferior a 30 años en población control, mostraron niveles inferiores de TAFI funcional. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Juhan-Vague *et al* (96) y por Chetaille *et al* (85) sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular incluyendo sexo y edad con niveles de TAFI antigénico. Diversos estudios han establecido la asociación de niveles altos de TAFI antigénico y el riesgo de enfermedad coronaria, como Morange *et al.* (93) y otros. Brouwers *et al.* (95) asociaron niveles altos de TAFI antigénico con angina inestable refractaria. Sin embargo, Juhan-Vague *et al.* (90) en un estudio sobre la relación del infarto de miocardio en norte y sur de Europa con los niveles de TAFI antigénico observó que los niveles altos de TAFI antigénico eran un factor protector. Los diferentes resultados obtenidos en los diversos estudios pueden ser explicados por el hecho de que los niveles de TAFI antigénico varían en función del reactivo utilizado. En el año 2003, Gils *et al.* (109), observaron que las diferentes isoformas según el genotipo, presentaban una reactividad diferente a los paneles de antígenos monoclonales. En particular, el genotipo 325 mostraba diferente reactividad a los antígenos en función de las diferentes isoformas. Por ello,

en función de la prevalencia de estos polimorfismos en las poblaciones estudiadas, los niveles de TAFI variarían, y los resultados obtenidos con dichos reactivos de ELISA hasta la fecha como posible factor de riesgo, debían de tomarse con precaución. No existen datos sobre la misma problemática y los niveles de TAFI funcional, aunque parece que la técnica utilizada y los reactivos son independientes de los polimorfismos en la población.

Niveles de TAFI funcional superiores al 120% se asociaron a un incremento 6 veces mayor de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica, tras ajustar por las diferentes covariables. Los factores de riesgo cardiovasculares como la historia familiar de trombosis, dislipemia, diabetes o tabaquismo también se asociaron a un riesgo superior de trombosis. No existen estudios sobre la asociación de TAFI funcional y la enfermedad cerebrovascular. Aunque existen estudios realizados por Monasterio *et al* (110) y Montaner *et al* (111) en el que establecen niveles superiores de TAFI antigénico en pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica aguda y su respuesta al tratamiento fibrinolítico y evolución, en fase aguda.

Tras estudiar el TAFI funcional en ambas poblaciones, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, y que existe una explicación biológica plausible sobre su implicación en el proceso etiopatogénico de la enfermedad tromboembólica arterial, se podría establecer el TAFI funcional como un nuevo biomarcador de riesgo de enfermedad trombótica arterial.

El TAFI funcional es por tanto un nuevo fenotipo intermediario implicado en la enfermedad trombótica.

Polimorfismo 46 C/T del gen del *F12* y enfermedad tromboembólica arterial

Sin duda, un aspecto importante y novedoso de nuestro estudio en el campo de la genética y de la medicina, es el seguimiento y la aplicación de las normas establecidas por expertos internacionales, a la hora de realizar estudios de asociación con polimorfismos genéticos. Otro de los aspectos a destacar, es sin duda, entender la enfermedad tromboembólica tanto venosa como arterial, como un fenotipo complejo y multifactorial con una base genética común (heredabilidad del 61%). Y por tanto, como una manifestación de la susceptibilidad genética de cada individuo a presentar trombosis. En función de diferentes interacciones gen-gen e interacciones gen-ambiente, el individuo desarrollará o bien trombosis arterial o bien venosa o tal vez ambos fenotipos (2).

A la hora de elegir un polimorfismo a estudiar en nuestra población, seguimos todas las pautas establecidas. En primer lugar, para evitar el riesgo de estratificación de poblaciones, sólo incluimos individuos de origen español. Y a partir de esta premisa, y teniendo en cuenta los resultados del estudio GAIT con respecto al polimorfismo 46 C/T del gen *F12* (41), decidimos estudiar la prevalencia de este genotipo en la población española y su asociación con la enfermedad arterial tanto la enfermedad cerebrovascular isquémico como el síndrome coronario agudo. Los resultados del estudio GAIT, nos demostraron que la heredabilidad del factor XII era del 67%. Además se localizaron 2 QTL relacionados con la variabilidad de los niveles del factor XII. Uno de ellos además se relacionaba con el riesgo de desarrollar trombosis, este QTL era el polimorfismo 46 C/T que se encuentra en exón 1 del gen *F12* (una transición C → T en la posición del nucleótido 46). Además otros estudios habían demostrado *in vitro* que era un polimorfismo funcional. Estábamos pues, delante un polimorfismo potencialmente elegible para realizar estudios de asociación en patología trombótica arterial. En el estudio de los individuos con enfermedad cerebrovascular isquémica, se incluyeron todos los subtipos excepto los de causa inusual. Los factores de riesgo cardiovasculares convencionales como hipertensión, hipercolesterolemia y diabetes mellitus se asociaron con aumento del riesgo de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica. La historia familiar de enfermedad tromboembólica al igual que el consumo de alcohol, fueron los factores de riesgo más importantes asociados al riesgo de desarrollarla. Entre los factores hemostáticos, analizamos el factor VIII y el fibrinógeno, ya que son actualmente los más aceptados como tales en la mayoría de estudios realizados. Tanto el factor VIII, por encima de 176% como el

fibrinógeno por encima de 3.5 g/l se asociaron a un riesgo superior de enfermedad.

En el síndrome coronario agudo, incluimos individuos que habían presentado infarto agudo de miocardio y angina inestable como parte del síndrome coronario agudo. Los factores de riesgo cardiovasculares convencionales, como el tabaquismo, la diabetes mellitus, la hipertensión y la hipercolesterolemia se asociaron de manera significativa con el riesgo de desarrollar síndrome coronario agudo. La historia familiar de enfermedad trombótica también fue un factor de riesgo importante. El factor VIII (superior a 156%) y el fibrinógeno (superior a 3.5 g/l) se asociaron a un incremento significativo de desarrollar síndrome coronario agudo.

La prevalencia del genotipo 46 *C/T* del gen del *F12* en la población española control fue de un 60% del genotipo *C/C*, 38% del genotipo *C/T* y un 2% presentaban el genotipo *T/T*. En la población con patología trombótica arterial, tanto con síndrome coronario agudo como enfermedad cerebrovascular arterial, el genotipo *C/C* presentó una prevalencia aproximada al 60%, el genotipo *C/T* se observó en aproximadamente el 33-35%, y el genotipo *T/T* en el 6% de los individuos. En función de los datos observamos que en patología arterial, excepto para la homocigosis del alelo *T*, los otros 2 genotipos presentaban similar distribución a la población control. Por ello, analizamos el riesgo de enfermedad tromboembólica arterial en función del genotipo *T/T*, y tras ajustar por todos los factores de riesgo incluidos, observamos un incremento significativo, entre 4 y 5 veces superior, del riesgo de desarrollar síndrome coronario agudo y de enfermedad cerebrovascular isquémica.

Los niveles de factor XII plasmático, tal como esperábamos, mostraron diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo. El genotipo *C/C* mostró valores superiores a los otros genotipos, tanto en población control como en pacientes. El genotipo *T/T* se asoció a niveles inferiores de factor XII en ambas poblaciones. La media y rango de niveles de factor XII fue de: 127% (rango: 62-250), para el genotipo *C/C*, de 95.2% (rango:46-175) para el genotipo *C/T*, y 57.7 (rango:43-94) para el genotipo *T/T*.

Analizamos el riesgo de desarrollar enfermedad tromboembólica arterial en función de los niveles de factor XII. En el síndrome coronario agudo, niveles inferiores a 68% de factor XII, tras ajustar por las diferentes covariables, se asociaron a un riesgo de 6 veces superior a presentar enfermedad. De manera similar, niveles inferiores a <74% de factor XII se asociaron a un riesgo 3 veces superior a desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica.

Nuestros resultados son novedosos por 2 motivos: por la estrategia utilizada siguiendo las

recomendaciones en los estudios de asociación con polimorfismos, y por la escasez de estudios de sobre la asociación de este polimorfismo a enfermedad tromboembólica arterial. En enfermedad cerebrovascular isquémica, solamente existe un estudio realizado por Oguchi *et al*, en población japonesa que no encontró asociación del polimorfismo con el riesgo de presentar enfermedad cerebrovascular isquémica.

En cuanto a la enfermedad coronaria aguda, existen algunos estudios pero los resultados son diferentes. Miller *et al.* (101) observó que niveles altos de Factor XIIa se asociaban a riesgo de enfermedad coronaria aguda en hombres. Zito *et al* (102) refiere un aumento del riesgo asociado a niveles altos de factor XII aunque no encuentra asociación del polimorfismo con el riesgo de enfermedad. Sin embargo, en otro estudio posterior, Zito *et al* (104) encontró un aumento del riesgo de enfermedad coronaria asociada al genotipo *T/T* en hombres con hipercolesterolemia. Kohler *et al.*(103) y Colhoum *et al.* (106), no observaron ninguna asociación entre el genotipo y el riesgo de enfermedad coronaria aguda. Mientras que Endler *et al.*(105) establece que el polimorfismo es un factor protector para el desarrollo de la enfermedad coronaria aguda. Esta divergencia en los resultados puede ser el resultado de no haber seguido las recomendaciones a la hora de realizar estudios de asociación con polimorfismos. Lo que nos lleva a enfatizar la importancia de dichas recomendaciones en estudios de asociación para evitar tanto falsos positivos como falsos negativos.

Otro punto importante, es comprender la diferencia entre los niveles de factor XII, es decir el fenotipo intermediario, y el genotipo, cuando hablamos de riesgo asociado a desarrollar enfermedad. Es decir, los niveles de factor XII, están influidos por varios factores, entre ellos otro QTL en el cromosoma 10, que está relacionado con los niveles de factor XII, aunque este no está asociado con el riesgo de trombosis.(41) De ahí la complejidad de la enfermedad tromboembólica, por un lado, se debe conocer los fenotipos intermediarios y por otro lado, los diferentes genes e interacciones gen-gen, para llegar a comprender la etiopatogenia de esta enfermedad compleja y multifactorial. A partir de esta premisa, podemos establecer en primer lugar que niveles bajos de factor XII están asociados a enfermedad tromboembólica arterial. En segundo lugar, que el polimorfismo 46 *C/T* del gen *F12* está asociado a los niveles de factor XII, y en tercer lugar que el genotipo *T/T* asociado a niveles bajos de factor XII se asocia a su vez con el riesgo de desarrollar enfermedad tromboembólica arterial.

CONCLUSIONES

1. Variaciones del TAFI funcional en población española y correlaciones con factores de riesgo cardiovascular y factores hemostáticos

Los niveles de TAFI funcional son inferiores en mujeres españolas menores de 30 años, mientras que en los hombres no se han encontrado variaciones en función de la edad.

No observamos variaciones del TAFI funcional en función de los diferentes factores de riesgo cardiovasculares.

Tampoco los niveles de TAFI funcional mostraron correlación significativa con diferentes factores de la hemostasia.

2. Asociación entre los niveles de TAFI funcional con el riesgo de presentar enfermedad coronaria aguda y enfermedad cerebrovascular isquémica.

Niveles de TAFI funcional por encima de 126% se asociaron a un riesgo 4 veces superior de desarrollar enfermedad coronaria aguda.

Niveles de TAFI funcional superiores a 120% se asociaron a un riesgo 6 veces superior de presentar enfermedad cerebrovascular aguda.

3. Prevalencia del polimorfismo 46 C/T del gen F12 en población española y su asociación con los niveles de Factor XII.

La prevalencia del genotipo C/C en población control del síndrome coronario agudo y la enfermedad cerebrovascular isquémica fue de 60% y 61% y se asoció a niveles de Factor XII entre 124% y 127%, respectivamente.

La prevalencia del genotipo C/T en población control fue del 38% y se asoció a niveles de factor XII entre 95% y 98%.

La prevalencia del genotipo T/T en población control osciló entre un 2% y 3% y se asoció a niveles entre 58% y 52.5%.

4. Asociación entre el polimorfismo 46 C/T del gen F12 con el riesgo de presentar enfermedad coronaria aguda y enfermedad cerebrovascular isquémica.

La homocigosis para el alelo T del polimorfismo 46 C/T del gen F12 se asocia a un riesgo

4 veces superior de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica.

Los niveles de Factor XII inferiores a 74% se asociaron a un riesgo 3 veces superior de desarrollar enfermedad cerebrovascular isquémica.

La homocigosis para el alelo *T* del polimorfismo 46 *C/T* del gen *F12* se asocia a un riesgo 6 veces superior de desarrollar enfermedad coronaria aguda.

Los niveles de Factor XII inferiores a 68% se asociaron a un riesgo casi 5 veces superior de desarrollar enfermedad coronaria aguda.

CONSIDERACIONES FINALES

La enfermedad tromboembólica, tanto la venosa como la arterial, debe de considerarse como una enfermedad compleja con diferentes modos de presentación. Por ello, es importante conocer los diferentes fenotipos intermediarios como el TAFI y también las variantes genéticas que pueden estar determinando una mayor susceptibilidad a desarrollar trombosis.

Sin duda, el TAFI, es una de los factores intermediarios que nos ha permitido investigar y demostrar las complejas interacciones e interrelación entre los factores de la coagulación y la fibrinólisis, así como diversos factores relacionados con el endotelio y las plaquetas. Ello nos abre un inmenso campo de investigación, ya que el concepto de hemostasia como una cascada de factores ha quedado obsoleto y de ahora en adelante la hemostasia y la trombosis debe ser considerado un modelo de interacción compleja que incluye diferentes células, factores hemostáticos, factores inflamatorios y factores ambientales. El aumento del TAFI esta relacionado con un aumento del riesgo de desarrollar enfermedad arterial, aunque el mecanismo aún está por dilucidar. El estudio de los polimorfismos implicados en su variabilidad también nos dará ciertas claves de su mecanismo de acción e interacción con diferentes componentes de la hemostasia.

En cuanto a la controversia de la utilidad de los estudios de asociación y los marcadores genéticos, parece que por fin existe un consenso sobre su papel en el estudio de las enfermedades tromboembólicas, su utilidad y por tanto, de la importancia de su realización, siempre que se cumplan los diferentes puntos ya mencionados en las diferentes editoriales. En nuestros estudios de asociación hemos seguido los diferentes pasos para llegar a demostrar que el polimorfismo 46 C/T del gen *F12* puede considerarse como un nuevo factor de riesgo genético para desarrollar enfermedad tromboembólica arterial y debe de tenerse en cuenta a la hora de incluirlo en los estudios de trombofilia. Otro punto diferente será establecer la necesidad de estudios familiares y la interacción de dicho polimorfismo con factores de riesgo ambientales tales como los anticonceptivos.

Estamos por tanto en una nueva era en la investigación de la enfermedad tromboembólica, donde los estudios de ligamiento, los estudios de interacción gen-ambiente y los estudios de asociación pueden aportar información nueva y complementaria, que finalmente nos lleve a la comprensión de los factores que llevan a un individuo a pasar de ser susceptible a desarrollar una enfermedad a finalmente desarrollarla. Y, en definitiva a establecer perfiles individuales de

riesgo de enfermedad tromboembólica con el fin de planificar estrategias de medicina preventiva primaria y secundaria.

Bibliografía

1. Guttmacher AE, Collins FS. Cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2003;349: 60-7
2. Souto JC, Almasy L, Borrelli M, *et al.* Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: The GAIT study. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1452-9.
3. Souto JC, Almasy L, Borrell M, *et al.* Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation* 2000; 101: 1546-1551.
4. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, *et al.* Endotelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.
5. Schwartzs SM, Mejesky MW. Structure and function of the vessel wall. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW.(eds) Hemostasis and thrombosis .Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994: 705-17.
6. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of hemostasis. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW.(eds). Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia 1994: 3-18.
7. Pujol-Moix N. Anatomía de las plaquetas. Interacciones estructura-función. En: Pujol-Moix N (eds). Trombocitopenias. Mosby/Doyma Libros. Madrid 1995: 3-10.
8. White JG. Anatomy and structural organization of the platelet. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. (eds) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994: 397-413.
9. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. (eds) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994: 489-507.
10. Cullaré C, Castellarnau C. Estudios bioquímicos y funcionales de las plaquetas. En: Pujol-Moix N (eds). Trombocitopenias. Mosby/Doyma Libros. Madrid, 1995: 139-56.
11. Díaz-Ricart M, Escolar G, Ordinas A. Composición química y funciones de las plaquetas. En: Pujol-Moix N (eds). Trombocitopenias. Mosby/Doyma Libros. Madrid, 1995: 11-44.
12. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. (eds) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994:

508-23.

13. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. (eds) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994: 524-46.
14. May AE, Neumann FJ, Preissner KT. The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82: 962-70.
15. Hawiger J. Adhesive interactions of blood cells and the vascular wall . En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. (eds) Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. J.B.Lippincott Company. Philadelphia, 1994: 762-96.
16. van Dam-Mieras MC, Muller AD. Blood Coagulation as a part of the haemostatic system MCE. En: Blood Coagulation. Zwaal RFA and Hemker HC eds. Amsterdam, New York, Oxford. Elsevier 1986.
17. Mann KC. Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation. *Thromb Haemost* 1999; 82: 165-74.
18. Rappaport S, Rao VM. The tissue factor pathway: How it has become a Prima Ballerina .*Thromb Haemost* 1995; 74: 7-17.
19. Petersen LC, Valentin S, Hedner U. Regulation of the extrinsic pathway system in healthy and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 1995: 79: 1-47.
20. Davie EW, Fujikawa K, Kissiel W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-70.
21. Colman RW, Schmainer AM. Contact system. A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819-43.
22. Tuddenham EGD, Cooper DN. Fibrinogen. En: The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. Oxford University Press 1994.
23. Henschen AH. Human Fibrinogen-Structural variants and functional sites. *Thromb Haemost* 1993; 70: 42-7.
24. Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost* 1997; 77: 408-23.
25. van Boven HH, Lane D. Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin*

- Hematol 1997; 34: 188-204.
26. Dahlbäck B. The protein C anticoagulant system. Inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77:1-43.
 27. Wallen P, Wiman B. Characterization of human plasminogen. Separation and partial characterization of different molecular forms of human plasminogen. *Biochem Biophys Acta* 1972; 257: 122-34.
 28. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis *Thromb Haemost.* 1980; 43: 123-32.
 29. Nesheim M, Wei W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L. Thrombin, Thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78: 386-91.
 30. Ross R. Pathogenesis of atherosclerosis. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 30 ed. Philadelphia: Lippincott Co 1994; 861-9.
 31. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. En: Colman WC, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 30 ed. Philadelphia: Lippincott Co 1994; 508-24.
 32. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2004;17:35-44.
 33. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med* 1992; 326: 800-6.
 34. Albers G, Easton D, Sarco R, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest* 1998; 114:683S-695S.
 35. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke . Definitions multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in acute treatment. *Stroke* 1993; 24: 35-41.
 36. Folsom AR. Hemostatic risk factors for atherothrombotic disease:an epidemiologic view.*Thromb Haemost* 2001;86:366-73.
 37. Cushman M. Hemostatic risk factors for cardiovascular disease. *Hematology* 1999; 236-42.

38. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2001;85:584-95. Simmonds RE, Hermida J, Rezende SM, Lane DA. Haemostatic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:374-85.
39. Simmonds RE, Hermida J, Rezende Sm *et al.* Haemostatic risk factors in arterial thrombosis. *Thromb Haemast* 2001; 86:374-85.
40. Williams MS, Bray PF. Genetics of arterial prothrombotic risk states. *Experimental Biology and Medicine* 2001; 226: 409-19. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A.
41. Almasy L, MacCluer JW. Association studies of vascular phenotypes: how and why?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22: 1055-7.
42. Association studies of genetic polymorphism and complex disease. *Lancet* 2000; 355: 308-11.
43. Soria JM, Almasy L, Souto JC, *et al.* A quantitative trait locus in the human factor XII gene jointly influences plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 567-74.
44. Editorial. Freely associating. *Nature genetics* 1999; 22:1-2.
45. Cooper DN, Nussbaum RL, Krawczak M. Proposed guidelines for papers describing DNA polymorphism-disease associations. *Hum Genet* 2002; 110: 207-8
46. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, *et al.* A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 1090-4.
47. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349: 385-8.
48. González-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, *et al.* Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib associated with arterial thrombotic disease. *Blood* 1998; 92: 2771-6.
49. Franco RF, Reitsma PH. Gene polymorphism of the haemostatic system and the risk of arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 2001; 115:491-506.
50. Casas J, Hingorani A, Bautista L *et al.* Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke. *Arch Neurol* 2004;61;1652-62.

51. Alberts MJ. Genetics update: Impact of the Human Genome Project and identification of the stroke gene. *Stroke* 2001; 32: 1239-1241.
52. Meschia Jf. Addressing the heterogeneity of the ischemic stroke phenotype in the Human genetics research. *Stroke* 2002; 33: 2770-2774.
53. Harland A, Chimowitz MI, Hill HA *et al.* Cryptogenic stroke in relation to the genetic variation in clotting factors and other genetic polymorphism among young men and women. *Stroke* 2002; 33:2762-2769.
54. Hassan A, Markus HS. Genetics and ischemic stroke. *Brain* 2002; 123: 1784-1786.
55. Folsom AR, Rosamond WD, Shahar E, *et al.* Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. *Circulation* 1999; 100: 736-742.
56. Mannila MN, Eriksson P, Lundman P *et al.* Contribution of haplotypes across the fibrinogen gene cluster to variation in risk of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2005;93:570-7.
57. Soria JM, Almasy L, Souto JC *et al.* A genome search for genetic determinants that influence plasma fibrinogen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Mar 10(in press).
58. Iacovello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, *et al.* Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction *N Engl J Med* 1998; 338: 79-85.
59. Soria J, Almasy L, Souto JC, *et al.* Complete dissection of a human quantitative trait locus: the *F7* gene and the factor VII levels. (In press)
60. Tirado I, Mateo J, Soria JM, *et al.* The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2005;93:468-74.
61. van Hylckama Vlieg A, Van der Linden IK, *et al.* High Levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000;95:3678-82..
62. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, *et al.* High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000; 342: 696- 701.
63. Santamaría A, Oliver A, Borrell M, *et al.* Higher risk of ischemic stroke associated with factor XI levels in dyslipidemic patients. *Haematologica* 2005 (in press).
64. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, *et al.* Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost*

- 1998; 79: 8-13.
65. Norlund L, Holm J, Zoller B, Ohlin AK. A common thrombomodulin amino acid dimorphism is associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1997; 77: 248-51.
 66. Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA. Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 396-400.
 67. Santacroce R, cappucci F, Di Serna P, *et al.* Protein Z gene polymorphism are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost* 2004; 7:1197-9.
 68. Fedi S, Sofi F, Brogi D *et al.* Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2003;90:1173-8.
 69. McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ, *et al.* Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke* 2003;34:2415-9.
 70. Morange PE, Juhan-Vague I. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of coronary heart disease: the PRIME Study. *J Thromb Haemost* 2004; 2:2050-1.
 71. Trégouet DA, Aubert H, Henry M, *et al.* Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphism. *Hum Genet* 2001; 109: 191-7.
 72. Henry M, Aubert H, Morange PE, *et al.* Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood* 2001; 97: 2053-8.
 73. Arkel YS, Spratt D, KU DH, Becker K, *et al.* Increased thrombin generation as per endogenous thrombin potential (ETP), coagulation activation markers (TpP, TAT, and PF 1,2), and TAFI levels in subjects treated with estrogens hormone replacement (HRT). *Thromb Haemost* 2001;(Suppl 1): p3018.
 74. van Titburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activable fibrinolysis inhibitor and the risk of deep vein thrombosis. *Blood* 2000;95:2855-2859.
 75. Franco RF, Fagundes MG, Meuers JM, *et al.* Identification of polymorphism in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica* 2001;86:510-517.
 76. Cushman M, Folsom AR, Wang L, *et al.* A prospective study of *thrombin activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) concentration and the TAFI-438A polymorphism in

- relation to venous thromboembolism: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology (LITE). *Thromb Haemost* 2001; (Suppl 1 : 974). (Abstract).
77. Greaves M. Antiphospholipid antibodies and thrombosis. *Lancet* 1999; 353: 1348-53.
 78. Nesheim ME. TAFI. *Fibrinolysis & Proteolysis* 1999;13:72-77.
 79. Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers JC. *Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res* 2001;101:329-54.
 80. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2511-8.
 81. Mosnier LA, Meijers J, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 2001;85:5-11.
 82. Bouma BN, Mosnier LO, Meijers JC, Griffin JH. Factor XI dependent and independent activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in plasma associated with clot formation. *Thromb Haemost* 1999;82: 1703-8.
 83. Mosnier LO, van der Borne PA, Meijers J, Bouma BN. Plasma TAFI levels influence the clot lysis time in healthy individuals in the presence of an intact intrinsic pathway of coagulation. *Thromb Haemost* 1998;80:829-35.
 84. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JCM, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood* 2003;February 20.[epub ahead of print].
 85. Chetaille P, Alessi MC, Kouassi AD, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000;83:902-5.
 86. Mosnier LO, Elisen MG, Bouma BN, Meijers JC. Protein C inhibitor regulates the thrombin-thrombomodulin complex in the Up- and down regulation of TAFI activation. *Thomb Haemost* 2001;1057-64.
 87. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. Regulation of fibrinolysis I plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin. *Thromb Haemost* 2001; 85:5-11.
 88. Mosnier LO, Meijers JC, Bouma BN. The role of protein S in the activation of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and the regulation of fibrinolysis.

- Thromb Haemost 2001; 8: 1040-6.
89. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, *et al.* Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris: ECAT Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and disabilities. *Circulation* 1996;94:2057-63.
 90. Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, *et al.* plasma Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the North and South of Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(5):867-73.
 91. Silveira A, Schatteman K, Goossens F, *et al.* Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2000;84:364-8.
 92. Schroeder V, Chatterjee T, Mehta H, *et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thromb Haemost* 2002; 88(6):1020-5.
 93. Morange PE, Juhan-Vague I, Scarabin PY, *et al.* Association between TAFI antigen and Ala I 47Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. (The PRIME study). *Thromb Haemost* 2003;89(3):554-60.
 94. Zorio E, Castello R, Falco C, *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C. *Br J Haematol* 2003; 122: 958-65.
 95. Brouwers GJ, Leebeek FG, Tanck MW, *et al.* Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. The APRAIS study. *Thromb Haemost* 2003; 90:92-100.
 96. Juhan-Vague I, Renucci JF, Grimaux M, *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2156-2161.
 97. Ishii K, Oguchi S, Murat M, *et al.* Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46 C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinol* 2000; 11: 277-84.
 98. Kanaji T, Okamura T, Osaki K, *et al.* A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level.

- Blood 1998; 91:2010-4.
99. Braat EA, Dooijewaard G, Rijken DC. Fibrinolytic properties of activated FXII. *Eur J Biochem* 1999; 263:904-11.
 100. Zeerleder S, Schloesser M, Redondo M, *et al.* Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency-a study on 73 subjects from 14 swish families. *Thromb Haemost* 1999; 82:1240-6.
 101. Miller GJ, Esnouf MP, Burgess AI, *et al.* Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2103-6.
 102. Zito F, Drummond F, Bujac S, *et al.* Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2000; 102:2058-62.
 103. Zohler HP, Futers TS, Grant PJ. FXII (46C/T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity-gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemos* 1999; 81:745-7.
 104. Zito F, Lowe GD, Rumley A, McMahoo AD, Humphries SE WOSCOPS Study. Association of the factor XII 46C/T polymorphism with risk of coronary heart disease in the WOSCOPS study. *Atherosclerosis* 2002; 165: 153-8.
 105. Endler G, Mannhalter, Sunder-Plassmann H, *et al.* Homozygosity for the 46C/T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J Haematol* 2001; 115: 1007-9.
 106. Colhoun H, Zito F, Norman Cha N, *et al.* Activated factor XII levels and factor XII 46 C>T genotype in relation to coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes and healthy subjects. *Atherosclerosis* 2002; 163: 363-9.
 107. Oguchi S, Ito D, Murata M, Yoshida T, *et al.* Genotype distribution of the 46 C/T polymorphism of coagulation factor XII in the Japanese population: Absence of its association with ischemic cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 2000; 83: 178-179.
 108. Zeerleder S, Schloesser M, Redondo M, *et al.* Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency-a study on 73

- subjects from 14 swish families. *Thromb Haemost* 1999; 82:1240-1246.
109. Gils A, Alessi MC, Brouwers E *et al.* Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Jun 1;23(6):1122-7.
 110. Monasterio J, Bermudez P, Quiroga D *et al.* Plasma thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI) among healthy subjects and patients with vascular diseases: a validation study. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):382-6.
 111. Montaner J, Ribo M, Monasterio J *et al.* Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke.* 2003 Apr;34(4):1038-40.