

AD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA



ESTUDIO DEL TAFI Y SUS PRINCIPALES
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA
ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.



TESIS DOCTORAL

JOSE JUAN VERDÚ BELMAR

2007

AD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y PSIQUIATRÍA



ESTUDIO DEL TAFI Y SUS PRINCIPALES
POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA
ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA.



Tesis que presenta José Juan Verdú Belmar para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía.

Director de la tesis

Dr.D.Pascual Marco Vera



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



A mis gemelas. A su madre.

*“Las verdades que revela la ciencia superan siempre a
los sueños que destruye”*

Joseph Ernest Renan (1823-1892)





PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

AGRADECIMIENTOS



D.Pascual Marco, la oportunidad y la posibilidad que
dar este soñado trabajo, esperando poder seguir
contando con su ayuda en el difícil pero apasionante mundo de la investigación.

-A mi mujer. Sencillamente, este estudio ha sido posible gracias a su ánimo, ayuda,
consejo y comprensión hacia mí en todo momento.

-A mis padres, hermanos, y a toda mi familia, por su sincero apoyo no solo en este
trabajo, sino en la vida diaria.

-A la Dra.Susana Benlloch. Ella sabe muy bien lo costoso que ha sido una parte muy
importante del trabajo. Su ayuda ha sido primordial.

-A todo el servicio de Hematología (en especial a la Dra.M^aCarmen García y al
Dr.Alberto Romero) por haberme aguantado durante estos años. Su colaboración ha
sido necesaria para el desarrollo de la tesis. Mención especial merece la sección de
Hemostasia y Trombosis por su demostrada profesionalidad.

-Al Dr.D.José Sánchez por abrirme paso entre la maraña de números que originé. Al
final mereció muy mucho el resultado final. Gracias Pepe.

-A D.José Llorca, por sus sabios consejos (experto en conocimientos y técnicas de
hemostasia y trombosis) no solo en relación al manejo, conservación, determinación e
interpretación de pruebas, sino en otros muchos aspectos relacionados con el trabajo.

-Al Servicio de Medicina Interna, por su determinante y eficiente colaboración en la
detección y manejo de la Enfermedad Tromboembólica Venosa.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



	11
IA. ENFERMEDAD TROMBOEMBOLICA VENOSA (ETV)	11
Definición	11
Epidemiología	11
Etiopatogenia	12
Trombosis venosa profunda de miembros inferiores (TVP MMII)	12
Tromboembolismo pulmonar (TEP)	13
Trombosis venosas de localización infrecuente	15
-Trombosis de miembros superiores	15
-Trombosis mesentérica. Trombosis portal. Trombosis venosa cerebral.....	15
Síndrome postrombótico	15
-Manifestaciones clínicas. Diagnóstico.....	16
IB. ESTADOS DE TROMBOFILIA: FACTORES GENÉTICOS Y	
FACTORES ADQUIRIDOS	16
Definición	16
Factores de riesgo genéticos	17
-Déficit de Antitrombina-III. Déficit de la proteína C. Déficit de la proteína S	19
-Resistencia a la proteína C activada / Factor V Leiden (FVL)	20
-Protrombina 20210A (PT20210A)	21
-Hiperhomocisteinemia. Mutación de la enzima metilen-tetrahydro-folato- reductasa (MTHFR)	21
Factores de riesgo adquiridos	22
-Edad. Sexo. Etnias	22
-Sedentarismo / Encamamiento. Obesidad. Tabaquismo. Catéteres centrales. Tumores malignos. Cirugía, Traumatismos.....	23
-Embarazo y puerperio. Contraceptivos orales	24
-Síndrome antifosfolípido. Otros factores adquiridos	24
Concepto de interacción en la ETV	24
-Interacción gen-gen. Interacción gen-ambiente	25
Trombofilia y recurrencia de la ETV	25
IC. EL TAFI Y SU PAPEL EN LA HEMOSTASIA	27
El sistema fibrinolítico	27
Componentes del sistema fibrinolítico	27
-Plasminógeno	28
-t-PA. Prourocinasa. PAI. Plasmina. α 2-Antiplasmina. U-PAR	29
-Factor XIII. Lipoproteína(a)	30
-Dímero-D.....	31
Descubrimiento y nomenclatura del TAFI	31
Síntesis y características del TAFI en humanos	32
Activación/inhibición del TAFI por la trombina-trombomodulina	34
Activación/inactivación del TAFI por la plasmina	35
Genotipo y polimorfismos del TAFI	36
-Organización genómica del TAFI.....	36
-El TAFI y sus polimorfismos.....	37
TAFI y fibrinólisis	39
Papel del TAFI en el modelo de coagulación revisado	40

El TAFI en la enfermedad trombotica arterial	43
El TAFI y otras patologías	46
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
IIA. HIPÓTESIS	48
IIIB. OBJETIVOS	48
III.PACIENTES Y MÉTODOS	49
IIIA. DISEÑO Y ÁMBITO	49
IIIB. SUJETOS	49
-Criterios de inclusión	49
-Criterios de exclusión	50
-Número de sujetos	50
IIIC. VARIABLES	50
-Variantes de identificación. Variables clínicas. Localización de la trombosis.....	50
-Métodos diagnósticos de la ETV	50
-Tratamientos anticoagulantes. Parámetros de Hemostasi a	51
-Factores de riesgo congénitos de ETV. Polimorfismos del TAFI	51
IIID. RECOGIDA DE VARIABLES	51
-Variantes de identificación y demográficas, Factores de riesgo adquiridos	51
-Localización de la trombosis y métodos diagnósticos de ETV.....	51
-Parámetros de hemostasi a	52
-Estudio biológico de las mutaciones genéticas	55
-Análisis genético de los polimorfismos del TAFI	56
IIIE. CRONOLOGÍA DEL ESTUDIO	58
IIIF. ESTADÍSTICOS APLICADOS	58
IV.RESULTADOS	60
1ªEtapa: Estudio descriptivo de las variables investigadas en los pacientes.....	60
-1.1 Edad y sexo	60
-1.2 Factores de riesgo adquiridos de ETV.....	61
-1.3 Localización de la trombosis venosa	61
-1.4 Método diagnóstico de ETV.....	62
-1.5 Medicación actual con anticoagulantes	62
-1.6 Niveles antigénicos de TAFI	62
-1.7 Marcadores de riesgo genéticos de ETV	63
-1.8 Polimorfismos genéticos del TAFI.....	64

entre los niveles elevados de TAFI pacientes	66
3ª Etapa: Analizar si existen diferencias entre los niveles de TAFI y los diferentes polimorfismos genéticos en pacientes y en controles. Estudiar la asociación de los polimorfismos genéticos con el riesgo de padecer ETV.....	68
4ª Etapa: Análisis de la asociación entre los niveles de TAFI y la presencia de FVL y/o PT20210A.....	72
-4.1 TAFI y FVL.....	72
-4.2 TAFI y PT20210A	73
5ª Etapa: Correlación entre factores de riesgo adquiridos para ETV y los niveles de TAFI en pacientes y controles	74
-5.1 TAFI y sexo	74
-5.2 TAFI y edad	76
-5.3 TAFI y tabaco	77
-5.4 TAFI y obesidad	79
-5.5 TAFI y anovulatorios	80
-5.6 TAFI y diabetes mellitus tipo 2.....	81
-5.7 TAFI e hipercolesterolemia.....	83
6ª Etapa: Correlación del TAFI con los niveles de dímero o-d, tanto en pacientes como en controles.....	84
-6.1 TAFI y dímero-d	84
V. DISCUSIÓN	86
VA. NIVELES PLASMÁTICOS DE TAFI EN SUJETOS SANOS Y EN PACIENTES CON ETV	86
VB. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ALA147THR Y THR325ILE	89
VC. NIVELES PLASMÁTICOS DE TAFI Y FACTORES DE RIESGO ADQUIRIDOS	94
VD. NIVELES PLASMÁTICOS DE TAFI Y FACTORES DE RIESGO GENÉTICO: FVL Y PT20210A	96
VE. CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES PLASAMÁTICOS DE TAFI Y EL DÍMERO-D	97
VI. CONCLUSIONES	99
VII. BIBLIOGRAFÍA	100
VIII. APÉNDICES	120
VIIIA. ABREVIATURAS	120
VIIIB. ÍNDICES DE TABLAS Y FIGURAS	122
IX. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DEL AUTOR	126

IA. ENFERMEDAD TROMBOEMBOLICA VENOSA

DEFINICIÓN

La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es un proceso grave y potencialmente mortal, caracterizado por la aparición de un trombo formado inicialmente por plaquetas y fibrina en el interior del sistema venoso profundo (mas frecuentemente en el sistema venoso profundo de las extremidades inferiores), que puede crecer y fragmentarse. En este último caso, uno de los fragmentos puede desprenderse, progresar en la dirección del flujo sanguíneo y llegar al pulmón provocando una embolia pulmonar (EP). Por todo ello, actualmente, se considera que la trombosis venosa profunda (TVP) y la EP son dos manifestaciones de la misma enfermedad, a la que llamamos ETV¹.

EPIDEMIOLOGÍA

En la literatura existen varios estudios epidemiológicos que evalúan la incidencia de la enfermedad tromboembólica. En el *Tecumseh Community Health Study*, la incidencia de TVP era de 14,8 por 100.000 habitantes y año entre los varones de 40-50 años; y del 49,9 por 100.000 habitantes/año entre los varones de 70-80 años². Las mismas cifras en mujeres eran de 10 y 31/100.000 habitantes y año, respectivamente.

En un trabajo realizado por **Heit y colaboradores (cols.)**, la incidencia era de 117 casos/100.000 habitantes/año³. En otra serie, se aprecia un marcado aumento de las hospitalizaciones por TEP durante el otoño y el invierno, así como una mayor mortalidad en primavera⁴. **Anderson y cols.** hallaron una incidencia media anual de 48 casos de un primer episodio de TVP y 36 casos de TVP recidivante, más 23 casos de embolismo pulmonar por cada 100.000 habitantes⁵. Si extrapolamos estos datos a la población general, tendríamos una incidencia de 170.000 casos iniciales y 90.000 episodios recidivantes de enfermedad tromboembólica cada año en los Estados Unidos⁶. En un estudio reciente, se ha visto que la incidencia de la TVP en pacientes asiáticos (mas concretamente de origen chino) es de 17 por cada 100.000 habitantes, y la incidencia de TEP en esta población es de 3,9 por 100.000 habitantes/año⁷.

La mortalidad de la ETV es del 2,5% en los pacientes que son diagnosticados y tratados de forma rápida y adecuada⁵. La cifra de muertes por enfermedad tromboembólica venosa en EE.UU. se estima que está en torno a las 50.000 al año, y constituye la quinta causa de muerte hospitalaria en Europa^{8,9}. Se deduce pues de lo expuesto, la necesidad de establecer un diagnóstico y un tratamiento lo más precozmente posible, con el objetivo de reducir las cifras de casos mortales de enfermedad tromboembólica venosa.

a génesis de la trombosis intervenían el enlentecimiento del flujo sanguíneo, la activación plasmática de la coagulación y la lesión de la pared del vaso. Esta última se pensaba que influía mucho más en la génesis de la trombosis arterial que en la venosa, sin embargo, hoy sabemos que la lesión del vaso y el consiguiente daño endotelial-inflamatorio, provocan la liberación de sustancias implicadas de manera importante en la activación de la coagulación y la formación del trombo venoso¹⁰.

La ETV es el resultado del efecto combinado de los genes y los factores de riesgo adquiridos. Esta interacción es la que dará lugar a enfermedad tromboembólica o no. Dado que muchos de los factores genéticos que se conocen en la actualidad son relativamente comunes, así como los factores ambientales o adquiridos, es necesario estudiar una posible interacción entre ambos y de esta forma conocer un posible efecto sinérgico entre ellos¹¹.

TROMBOSIS VENOSA PROFUNDA DE MIEMBROS INFERIORES

Los trayectos venosos de los miembros inferiores (MMII) son el origen del 90% de los trombos que embolizan en la circulación pulmonar¹². La mayoría de casos de trombosis venosa distal (venas situadas por debajo de la vena poplítea) cursan de forma asintomática, pero en contra de una opinión bastante generalizada, se asocian a un riesgo no despreciable de embolia pulmonar. Aunque aproximadamente el 50% de las trombosis venosas profundas, en el momento que originan la embolia pulmonar, son asintomáticas, la especificidad de la clínica de éstas aumenta significativamente en un contexto clínico de embolia pulmonar.

En Europa, la incidencia de trombosis venosa profunda confirmada en la ciudad de Malmö en 1992 fue de 1,6 por 1.000 habitantes/año¹³. Esta proporción, es similar a la incidencia de 1,8 por 1.000 habitantes/año encontrada en un estudio longitudinal de varones blancos nacidos en 1913. La incidencia de trombosis venosa durante el embarazo, es aproximadamente de 1 caso por cada 2.000 embarazos¹⁴, siendo más frecuente en el tercer trimestre y en el posparto. El tromboembolismo venoso es la principal causa de morbi-mortalidad materna durante el embarazo y el puerperio. La muerte por un episodio de tromboembolismo pulmonar, ocurre en 0,03 casos por cada 10.000 partos por vía vaginal y en 0,5 casos por 10.000 partos por cesárea^{6,15}.

En España, no existen datos epidemiológicos fiables, aunque se puede extrapolar, que posiblemente, haya alrededor de 65.000 casos de TVP y 25.000 de EP al año, lo que daría una incidencia total de ETV de 90.000 casos/año. En nuestro país el 2,5% de las bajas laborales totales se deben a procesos trombóticos venosos¹⁶.

Clínicamente, la trombosis de miembros inferiores suele caracterizarse (aunque no siempre) por dolor, tumefacción, aumento de la temperatura, cambio en la coloración, cianosis, ingurgitación venosa y si afecta a otros territorios más proximales puede observarse

, ascitis, quilotórax... Pero además, no hay que olvidarse de los factores de riesgo (esto es, las distintas situaciones clínicas que favorecen o hacen posible el desarrollo de una trombosis) y los diagnósticos alternativos (esto es, la posibilidad de que los síntomas del paciente puedan ser debidos a patologías diferentes a la principalmente sospechada). La adecuada combinación de la sintomatología del paciente, la exploración física, la presencia o no de factores de riesgo y la presencia o no de un diagnóstico alternativo que nos explique los síntomas del paciente, la podemos utilizar para realizar una buena aproximación diagnóstica.

La ecografía (eco-doppler) sigue siendo el procedimiento mas utilizado a la hora de confirmar la sospecha diagnóstica de TVP de MMII. Es una técnica no agresiva, fácil de realizar, rápida, sensible y específica, sobre todo en las venas proximales de los MMII (especificidad >90%). La incapacidad para comprimir completamente la luz venosa, es diagnóstica de TVP. Con la ecocardiografía podemos valorar la presencia o no de trombos intracardíacos y de grandes vasos. La flebografía es la técnica mas sensible y específica pero no siempre es practicable en enfermos críticos (técnica invasiva) y en muchas ocasiones no esta disponible en los hospitales. Debería realizarse si la anteriores exploraciones son negativas y persiste una fuerte sospecha de TVP. Otras pruebas menos utilizadas son la pletismografía de impedancia, la resonancia magnética nuclear o la tomografía axial computerizada (TAC).

Los pacientes diagnosticados de TVP de MMII deberían tratarse con una pauta inicial de heparina (en sus diferentes presentaciones), y posteriormente un mínimo de 3 meses con anticoagulantes orales. Con esa pauta se consigue reducir a cerca de un 5% el riesgo de recidivas tromboembólicas durante los primeros meses. La mortalidad debida a la TVP de MMII va relacionada directamente con la posibilidad de desencadenarse un episodio de tromboembolismo pulmonar.

TROMBOEMBOLISMO PULMONAR (TEP)

El TEP consiste en la migración hacia un territorio vascular pulmonar, de un trombo formado en el sistema venoso (habitualmente, las venas profundas de las extremidades inferiores), con oclusión de las arterias pulmonares.

Se estima que la incidencia real es de más de 600.000 pacientes por año en los EE.UU.¹⁷, ocurriendo el 75 al 90% de los fallecimientos, en las primeras horas de producirse el TEP; esto limita las posibilidades diagnósticas y por supuesto terapéuticas. En Francia se han estimado cifras de 100.000 casos anuales, en el Reino Unido 65.000 casos anuales y 60.000 casos anuales en Italia¹⁷.

La tasa de mortalidad por TEP sigue siendo muy alta, como lo demuestra en el Estudio

y *Embolism Registry*, en el que la mortalidad a los 3 años fue el 75% de las muertes durante la fase inicial de tratamiento hospitalario¹⁸. Además, el estudio de **Prandoni**¹⁹ muestra que la recurrencia a largo plazo es muy elevada, prolongándose durante varios años. En EEUU se estima que 100.000 pacientes mueren de TEP cada año, y en la mayoría de los casos, los émbolos proceden de TVP asintomáticas de los miembros inferiores. De los TEP diagnosticados en autopsias, entre un 70 y un 80% no fueron sospechados clínicamente, por lo que desde hace años, sabemos que el TEP es una muy frecuente causa de muerte intrahospitalaria prevenible. En España, extrapolando datos de varios estudios, corresponderían aproximadamente, unas 60.000 TVP cada año, 40.000 EP cada año y 6.000 muertes anuales, que algunos autores cifran hasta en 23.000²⁰. Por tanto, debido a que tanto la TVP como la EP a menudo cursan de manera silente o con síntomas inespecíficos, es realmente difícil conocer la incidencia, la prevalencia y la mortalidad reales de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas del TEP son totalmente inespecíficas, pero valoradas adecuadamente en su contexto, facilitan el diagnóstico. Por lo general su intensidad depende del grado de oclusión del lecho vascular pulmonar y del estado cardiorrespiratorio previo del paciente. Sin embargo, es posible observar enfermos con embolia masiva (más del 50% de oclusión vascular) y escasa o nula sintomatología, mientras que otros con embolias submasivas presentan gran repercusión clínica. En la exploración física, la taquipnea y la taquicardia son los signos más constantes. En la serie de **Stein**, la disnea, la taquipnea o el dolor torácico estaban presentes en el 97% de los pacientes²¹.

Las exploraciones complementarias incluyen la búsqueda del foco trombótico (generalmente a nivel de las extremidades inferiores mediante ecografía-doppler), estudios de presunción (laboratorio, radiografía de tórax y ECG) y de confirmación (gammagrafía de ventilación-perfusión, TAC helicoidal, arteriografía y resonancia magnética). La TAC helicoidal ha demostrado su óptima sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del EP, así como en el diagnóstico diferencial con entidades que clínicamente simulan un EP²². La arteriografía pulmonar continúa siendo el patrón oro+ para el diagnóstico del EP, aunque su escasa disponibilidad, el contar con un personal perfectamente entrenado, así como la agresividad de la prueba, sus graves complicaciones y el alto coste económico que genera, han hecho que actualmente se utilice en nuestros hospitales en muy contadas ocasiones.

Diversos estudios necrópsicos, demuestran que a menudo la embolia produce la muerte sin haber sido sospechada²³⁻²⁷, mientras que en algunos trabajos clínicos se demuestra que en ocasiones se llega al diagnóstico de tromboembolia pulmonar unos días después de ingresado el paciente y los síntomas se atribuyen a otras enfermedades más comunes, como la insuficiencia cardíaca y la neumonía.

La muerte por EP oscila entre el 23,1 y el 30% a los 8 años del episodio inicial, y aunque la

primer año (16,7%), las tasa de mortalidad anual en los
pacientes ancianos la mortalidad es claramente superior
que en pacientes más jóvenes²⁸.

TROMBOSIS VENOSAS DE LOCALIZACIÓN INFRECIENTE

Trombosis de miembros superiores

La trombosis venosa profunda de miembros superiores es una entidad clínica poco estudiada, aunque responsable del 4% de todos los casos de TVP. Se ha descrito una prevalencia del 0.15% entre todos los pacientes hospitalizados²⁹. La causa más frecuente de las trombosis de miembros superiores es la utilización de los catéteres centrales³⁰. Sin embargo, algunos pacientes presentan la trombosis sin ninguna relación con esfuerzos ni alteraciones locales. La prevalencia de un estado de hipercoagulabilidad en las trombosis de miembros superiores, oscila entre el 8 y el 43%, siendo lo más frecuente la presencia de anticuerpos antifosfolípido^{31, 32}.

Trombosis mesentérica

Es la tercera localización más frecuente de trombosis venosa después de los miembros inferiores y la embolia pulmonar. Su aparición se ha asociado a la presencia de cuadros adquiridos como síndromes mieloproliferativos o anticuerpos antifosfolípidos, pero cada vez es mayor el número de casos relacionados con trombofilia genética^{33,34}.

Trombosis portal

La etiología de la trombosis portal es variada: carcinoma hepatocelular, cirrosis hepática, traumatismos, estados de hipercoagulabilidad tanto adquiridos como genéticos, y también se ha visto asociada con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida³⁴⁻³⁷. Entre el 0,6 y el 26% de los pacientes con cirrosis la presentan, dependiendo del criterio de selección de los pacientes y de las pruebas diagnósticas que se realicen³³.

Trombosis venosa cerebral

Se desconoce con exactitud la incidencia de la trombosis venosa cerebral (TVC). La mayoría de las series de autopsias le atribuyen una frecuencia muy baja, aunque probablemente sea mayor de lo que tradicionalmente se ha apuntado^{38,39}. La TVC es un cuadro poco frecuente, de alta mortalidad y que a menudo deja secuelas neurológicas. La trombofilia referida con más frecuencia ha sido el FVL, aunque en los estudios más recientes que investigan también la mutación de la protrombina y de la C677T, ambas parecen ser más prevalentes^{40,41}.

SÍNDROME POSTROMBOTICO

Entendemos como síndrome postrombótico (también llamado síndrome postflebítico), al conjunto de alteraciones que pueden aparecer en la extremidad de un paciente, meses o

La prevalencia de IVC en la población adulta se ha calculado entre el 10 y el 40%⁴³. En España, recientemente se ha publicado un estudio de incidencia de síndrome postrombótico tras seguir clínicamente a 135 pacientes durante 1 año. La incidencia de SPT, valorada mediante flebografía tras los 12 meses fué del 56.3%, independientemente de la edad, sexo, recuento plaquetar o anticoagulación empleada⁴⁴.

Manifestaciones clínicas

La incompetencia valvular es la causa más importante del síndrome postrombótico. El edema es el síntoma más frecuente y de aparición más precoz. Las *varices superficiales* son la expresión clínica de la circulación venosa colateral. El *dolor* se acusa más en los ambientes calurosos, con la sedestación prolongada y en bipedestación⁴⁵. Las *alteraciones cutáneas* se manifiestan crónicamente como atrofia, induración, prurito e hiperpigmentación, que aunque afecten a toda la pierna suelen ser más selectivas en la región supramaleolar⁴⁶. La *úlceras postrombóticas* puede considerarse el estadio evolutivo final de los trastornos tróficos cutáneos.

Diagnostico

El diagnóstico de síndrome postrombótico, es a veces obvio en situaciones clínicas si los síntomas comienzan gradualmente⁴⁷. Los pacientes con un antecedente de TVP que desarrollan signos y síntomas compatibles con IVC, no precisan de pruebas objetivas que confirmen el diagnóstico de síndrome postrombótico. El resto de pacientes pueden beneficiarse de pruebas como la ecografía-doppler de MMII para valorar trombosis no conocidas⁴⁸.

IB. ESTADOS DE TROMBOFILIA: FACTORES ADQUIRIDOS Y GENÉTICOS

DEFINICIÓN

Con este término, se definen las diversas alteraciones heredo-familiares o adquiridas cuya presencia predispone estadísticamente a fenómenos trombóticos venosos o arteriales. Se suele aplicar el término de trombofilia, solo a un subgrupo de pacientes con trombosis que presentan una gran expresividad clínica⁴⁹. El desarrollo de un episodio de trombosis venosa es el resultado de la combinación de diversas circunstancias externas, junto con la predisposición genética y adquirida de cada persona (**Figura 1**).

La **trombofilia primaria o hereditaria** define aquellas situaciones en las que, como consecuencia de una alteración genética específica del sistema hemostático, se condicionan estados protrombóticos o de susceptibilidad hereditaria para el padecimiento de trombosis⁵⁰⁻⁵³. Se diferencian estos procesos, de las situaciones conocidas como estados de hipercoagulabilidad secundaria, grupo heterogéneo de trastornos clínicos donde el riesgo de padecimiento de procesos trombóticos es adquirido.

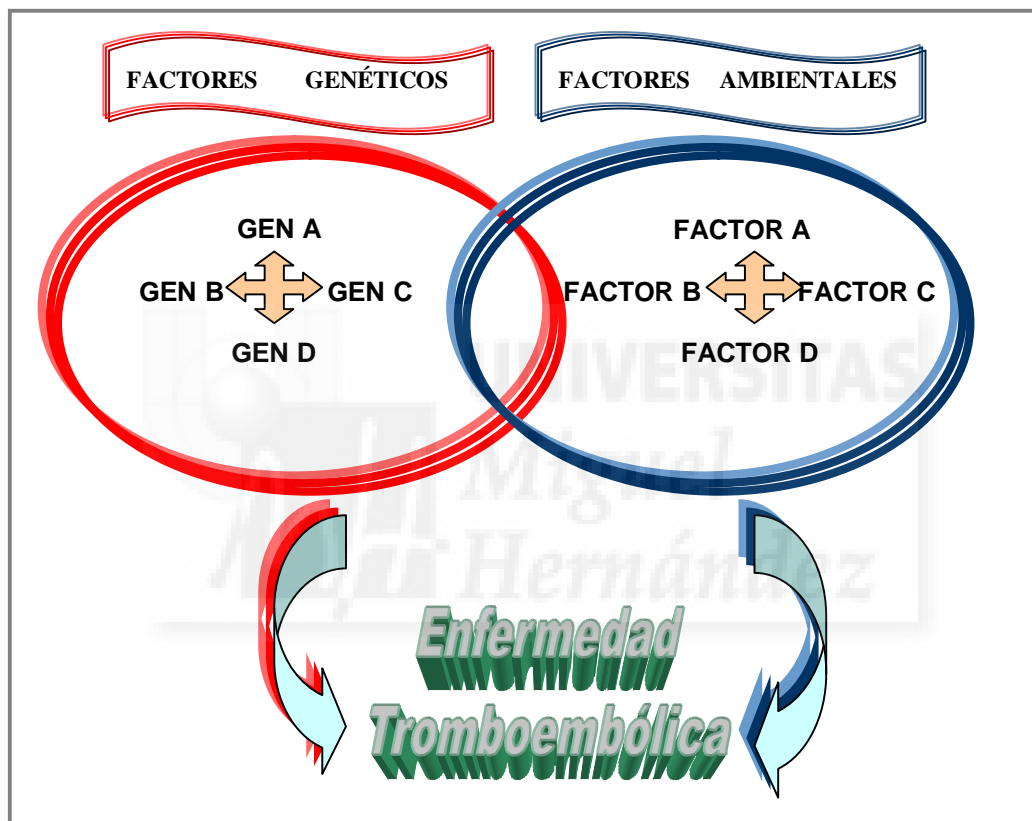


Figura 1

Características clínicas

Las principales características clínicas son: trombosis venosa o arterial, frecuente aparición a edades tempranas (< 45 años), episodios de repetición (>50%), historia familiar de trombosis, localizaciones inusuales de la trombosis e intensidad desproporcionada al factor desencadenante. Otros fenómenos que pueden aparecer en este tipo de trombofilias, serían, la presencia de necrosis cutánea asociada a anticoagulantes orales, púrpura fulminans (neonatos), pérdidas fetales recurrentes, etc.

En pacientes que hayan tenido un episodio de trombosis venosa antes de los 18 años, la prevalencia de alteraciones trombofílicas es alrededor de un 54% (deficiencia de factores

factor V Leiden del 31,8% y protrombina 20210A 4,2%); en estas alteraciones en un tercio de casos. El déficit de antitrombina (AT), proteína C (PC) y proteína S (PS), factor V Leiden y protrombina 20210A, están presentes en un 40% de pacientes que han presentado un primer episodio de trombosis venosa profunda en miembros inferiores, antes de los 45 años. Estos factores hereditarios, están presentes en un tercio de los casos de pacientes con un episodio de TVP después de los 45 años y/o sujetos que presentan TVP secundarios a embarazo, traumatismo, cirugía, anticonceptivos orales, inmovilización con yeso o encamamiento prolongado^{54,55}.

Los pacientes diagnosticados de ETV en los que se debería descartar una trombofilia congénita, suelen presentar alguna de las siguientes características:

1) historia familiar de trombosis, 2) trombosis venosa recurrente en el curso de tratamiento anticoagulante estable, 3) trombosis venosa a una edad joven, en pacientes <45 años, 4) trombosis idiopática sin factores desencadenantes identificados, 5) trombosis en territorios venosos no habituales: cerebral, mesentérica, portal, venas hepáticas, 6) trombosis o púrpura fulminante neonatal y 7) necrosis cutánea al iniciar tratamiento con anticoagulantes orales.

El realizar un screening a estos pacientes es sólo una recomendación, a la vez bastante controvertida⁵⁶. Por otra parte, la decisión de anticoagular a corto plazo es la misma para todos los pacientes y no está claro si el screening tiene algún beneficio a largo plazo. El estudio debe ser realizado también a los familiares en primer grado, con una doble finalidad, confirmar la naturaleza hereditaria e identificar sujetos enfermos asintomáticos que pueden beneficiarse del uso de profilaxis en situaciones de riesgo.

Diagnóstico

No existe para los estados trombofílicos heredados ninguna prueba standard y global de hemostasia que permita su identificación, siendo necesaria la realización de diversos tests analíticos. Los tests de laboratorio escogidos para realizar un diagnóstico de trombofilia congénita deben ser específicos, limitados en número y lo más importante, sus resultados deben ser clínicamente relevantes.

Podemos realizar los tests para detectar trombofilia congénita en 2 etapas (**Figura 2**). El primer paso del diagnóstico de laboratorio consistiría en excluir o confirmar las causas más frecuentes de estados trombofílicos congénitos. Para las deficiencias de AT y PC, deben emplearse métodos funcionales. En el caso de la PS, se medirá la PS libre por métodos inmunológicos. Si una primera etapa confirma la existencia de un déficit de AT, PC o PS, en una segunda fase se emplearán técnicas inmunológicas para medir la concentración antigénica de la proteína deficitaria y poder catalogar el subtipo concreto de deficiencia. Por último, se realizará el análisis molecular⁵⁷.

factor V Leiden y de la Protrombina 20210A se realiza por análisis de ADN.

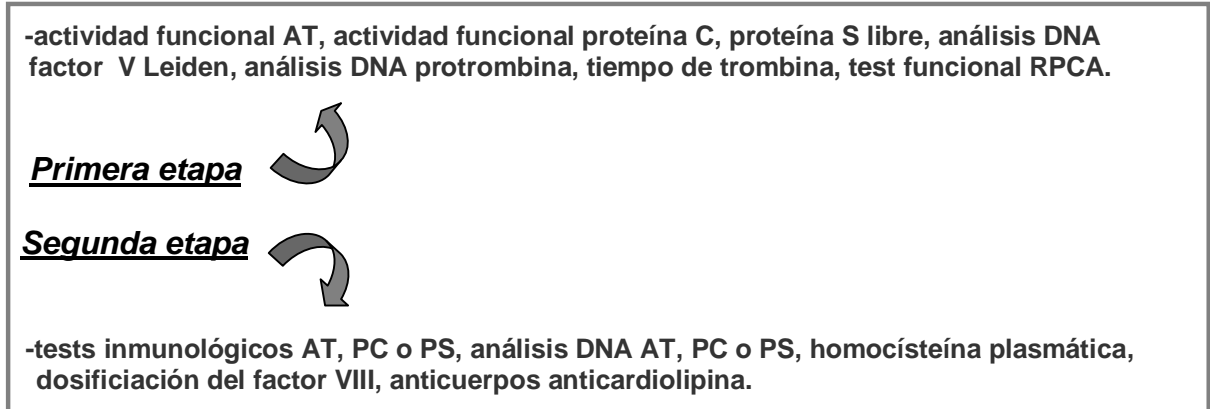


Figura 2

Déficit de Antitrombina

La antitrombina es una de las proteínas reguladoras más importantes de la coagulación. Se une irreversiblemente y neutraliza a gran parte de las enzimas procoagulantes como factores II, IX y X. Su deficiencia como causa de trombofilia fue descrita por primera vez en 1965. Esta alteración genética se transmite de manera autosómica dominante. La mayoría de los afectados son heterocigotos, con niveles de AT que oscila entre 40-70%, y son muy raros los casos de homocigotos. La prevalencia del déficit de AT en la población general es de 0,02-0,2%, mientras que en los pacientes con trombosis venosa no seleccionados es de alrededor de 1% y entre el 1-7% en los pacientes seleccionados. El riesgo de trombosis asociado a déficit de AT es 50 veces superior al riesgo en las personas sin este déficit ⁵⁸.

Déficit de la proteína C

La proteína C es una glucoproteína vitamina K dependiente, con un peso molecular de 68Kda. Su síntesis es hepática, y circula en plasma en forma de zimógeno de la proteína C activada (PCA). La proteína C es capaz de inactivar a los factores Va y VIIIa.

La deficiencia de proteína C es un defecto de transmisión autosómica dominante. La prevalencia del déficit de proteína C en la población general es del 0,2-0,4% y en pacientes con trombosis venosa no seleccionados es de aproximadamente del 3%, mientras que en pacientes seleccionados oscila entre el 3-9%. El déficit de proteína C se asocia con una elevación del riesgo de trombosis de entre dos y seis veces ^{59,60}.

Déficit de proteína S

La proteína S es una proteína monocatenaria dependiente de la vitamina K, cuya función es

degradación de los factores Va y VIIIa. Su síntesis tiene
características similares a las de los eritrocitos, megacariocitos, células de Leydig y osteoblastos⁶¹.

Existen pocos estudios de prevalencia del déficit de proteína S en la población general, pudiendo oscilar entre un 0,02-0,03%; mientras que la prevalencia en pacientes con enfermedad tromboembólica no seleccionados es del 2% y en pacientes seleccionados oscila entre 3-13%⁶². En un importante estudio caso-control no se pudo confirmar que fuera un factor de riesgo de trombosis venosa, pero existen estudios familiares que apoyan la tesis de que lo sea. Aunque el riesgo no ha podido ser cuantificado, la evidencia de su implicación en la trombosis venosa es menor que en el caso de la proteína C^{63,64}.

Resistencia a la PCA / Factor V Leiden

En 1993, **Jöhn Dahlbäck** desarrolló una nueva prueba de coagulación para medir la respuesta anticoagulante a la proteína C activada (PCA). Al adicionar una mezcla de PCA y CaCl₂, después de incubar la muestra con el reactivo TTPa, el tiempo de coagulación se prolongó significativamente. Posteriormente, realizó esta prueba en un paciente joven con múltiples episodios de trombosis, donde no observó la misma prolongación del tiempo de coagulación. A partir de este momento, se definió a la resistencia a la proteína C activada (RPCA) como un defecto anticoagulante (protrombótico) asociado con trombofilia, que se caracteriza por una pobre respuesta al efecto anticoagulante de la PCA^{65,66}.

En los años posteriores, se encontró que el defecto no recaía en la proteína C, sino en el sitio de clivaje del factor V (cofactor lábil no enzimático del sistema de la coagulación sanguínea). Aproximadamente en el 90-95% de los casos, se debe a una mutación en la posición 506 de la arginina por glutamina que confiere a este factor V una resistencia a la inactivación por la PCA, aumentando así la trombina y creándose un estado de hipercoagulabilidad. La mutación es lo que se denomina actualmente como *factor V Leiden (FVL)*, por la ciudad en la que se describió por primera vez. A diferencia de las deficiencias de AT, PC y PS, que usualmente manifiestan trombosis precozmente en la vida, el riesgo de enfermedad tromboembólica en la mutación del factor V Leiden aumenta con la edad; de hecho es una causa importante incluso en la tercera edad⁶⁷⁻⁶⁹.

El FVL es la trombofilia más prevalente, constituyendo en la actualidad la causa más frecuente de trombofilia hereditaria. Tiene una frecuencia de entre el 1-7% en los individuos de raza blanca, siendo aproximadamente la prevalencia de un 5% en la población caucasiana europea y en la norteamericana (europeos, judíos, árabes e hindúes), estando prácticamente ausente en individuos de raza negra, en asiáticos, en indígenas americanos y esquimales.

En las sociedades occidentales muestra cierta variabilidad^{70,71,72}. La más alta prevalencia se describió en Suecia (15%) y en Alemania (10%), Países como Holanda, Reino Unido y Estados Unidos presentaron unas cifras de alrededor de 3-5%, mientras que en España e Italia fue del 2%. En países sudamericanos se ha descrito una prevalencia similar a la hallada

l. El tipo de herencia de esta alteración es autosómico recesivo. Los individuos homocigotos cuyo riesgo de padecer TV es de unas 91 veces superior al de la población normal^{67,73}.

La relación entre el FVL y la ETV se reconoció por primera vez en familias afectadas por trombosis recurrentes⁷⁴. De 14 familias con trombofilia, nueve (64%) presentaron resistencia a la proteína C activada. La herencia era autosómica dominante y los individuos afectados sufrieron trombosis en edades más tempranas. Estos resultados, se confirman en estudios realizados en pacientes jóvenes con trombosis sin causa aparente, poniendo de manifiesto prevalencias de entre el 18% y 45%⁷⁵. Los homocigotos para la mutación del FVL, aún presentan un riesgo más alto. Así en el *Leiden Thrombophilia Study*⁷⁶ se indica que es 80 veces superior. Otros factores de riesgo estudiados en pacientes portadores de esta mutación son el embarazo, los abortos de repetición y la toma de anticonceptivos orales^{77,78-82}.

Protrombina 20210A (PT20210A)

En 1996 se describió una variante genética del gen de la protrombina, asociada con un aumento del riesgo de trombosis. Esta mutación está localizada en la región 3' no codificante (3'UTR) de este gen, y consiste en la sustitución del nucleótido Guanina por el nucleótido Adenina en la posición 20210⁸³. Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que esta mutación se asocia con niveles plasmáticos aumentados de protrombina, sugiriendo que el aumento de riesgo asociado con el alelo 20210A puede estar relacionado con el aumento de la concentración plasmática de esta proteína⁸⁴.

La prevalencia en la población general oscila entre el 1 y el 5% y en las series de ETV entre el 5 y el 19%. Esta mutación ha sido encontrada en el 6,2% de pacientes con un primer episodio de trombosis venosa profunda y en el 18% de los pacientes con trombofilia familiar no explicada^{83,85}. Los estudios caso-control, permitieron establecer un riesgo relativo de trombosis para la presencia de este alelo de 2,8⁸⁶. Su distribución geográfica es similar a la del FVL y es infrecuente en Africa y el Sureste asiático⁸⁷. En Europa, es mayor en los países del Sur siendo la prevalencia casi el doble en esta zona respecto a los países nórdicos^{88,89}. En estudios de casos-contróles, el riesgo relativo de tromboembolia venosa en los portadores de la mutación varía entre 2 y 12, y se han descrito asociaciones también a trombosis arterial, abortos de repetición y toma de anticonceptivos orales⁹⁰⁻⁹².

Hiperhomocisteinemia y mutación de la enzima metilen-tetrahidro-folato-reductasa (MTHFR)

La homocisteína es un aminoácido, producto intermedio del metabolismo de la metionina y la cistina⁹³. Entre un 5-7% de la población presenta niveles moderadamente elevados de homocisteína plasmática. Defectos genéticos y deficiencias en el aporte de vitaminas y

enzimáticas responsables de hiperhomocisteinemia⁹⁴. Un 23% de los pacientes normales de homocisteína por debajo de 12mmol/l⁹⁵. La hiperhomocisteinemia se ha detectado en el 23% de los pacientes jóvenes con ETV y puede causar recurrencias de ésta⁹⁶.

Las *alteraciones genéticas* que producen hiperhomocistinemia, son los defectos de las enzimas involucradas en el metabolismo de la metionina, fundamentalmente la cistationina B-sintetasa (CBS) y de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)⁹⁷.

Podemos concluir que la hiperhomocistinemia se podría incluir dentro de las alteraciones que condicionan un estado de hipercoagulabilidad que predispone a la trombosis. Estudios caso-control han demostrado que niveles de elevados de homocisteína se asocian con un mayor riesgo de trombosis venosa⁹⁸⁻¹⁰⁰. Sin embargo, existe mucha controversia actualmente respecto a si la hiperhomocisteinemia y/o la mutación MTHFR son verdaderamente factores de riesgo para la ETV o no^{101,102}.

FACTORES DE RIESGO ADQUIRIDOS

Los **factores de riesgo adquiridos**, aparecen en ciertas enfermedades y situaciones, en las que el aumento del riesgo trombotico se debe a la activación de moléculas proinflamatorias, incluyendo moléculas de adhesión y quimiotaxis leucocitaria¹⁰³⁻¹⁰⁷. Estos factores pueden ser modificados o corregidos en muchas ocasiones; de ahí la importancia de reconocerlos lo mas precozmente posible en el paciente.

Edad

Varios estudios sostienen la asociación entre el incremento de la edad y el aumento de la incidencia de ETV. Así como en la población infantil la incidencia es sumamente baja, en torno a 1 caso por 100.000 habitantes y año, en la población anciana mayor de edad alcanza casi el 1% anual¹⁰⁸. **Oger y cols.** identificaron que la incidencia de ETV aumenta marcadamente con la edad, especialmente en gente por encima de los 75 años, en la que la incidencia anual de ETV es el doble que en el grupo de gente con edades entre 60-74 años^{109,110}.

Sexo

Se ha visto que los varones padecen ETV con una incidencia mayor que las mujeres, incluso en la tasa de recurrencia de la misma¹¹¹. Parece ser, que el posible incremento en los hombres lo explican los casos de TVP secundarios a su mayor morbilidad y no por el sexo en sí¹¹². Por el contrario, un estudio francés identificó un ligero aumento de la incidencia de ETV entre mujeres (OR:1,3).

Etnias

Hay datos que sugieren que los episodios de ETV tienen una incidencia mayor entre ciertos grupos étnicos o raciales. Por ejemplo, los africanos que viven en EEUU, parecen tener una

sistentes que los blancos, y ambos, mayores que las que

Sedentarismo/Encamamiento

La inmovilidad, el reposo prolongado y el encamamiento, son otras situaciones médicas frecuentes que predisponen a padecer un episodio agudo de trombosis, y justifican la elevada incidencia de ETV que acontece en pacientes con algún tipo de parálisis o con vendajes escayolados, e incluso en sujetos sanos que realizan viajes aéreos prolongados¹¹⁴.

Obesidad

Son muchos los estudios que mencionan a la obesidad como un claro factor de riesgo para desarrollar enfermedad tromboembólica venosa^{112,115}. En un estudio de cohortes, la obesidad medida como IMC no fué un factor predictivo, pero sí la obesidad abdominal (> de 95 cm.), con un aumento del riesgo de 2,6 (1,1-6)¹¹⁶.

Tabaquismo

En otro estudio de cohortes, se encontró un mayor riesgo de TVP primaria en el grupo de fumadores de 35 o más cigarrillos respecto al de no fumadores, que resultó estadísticamente significativo (RR de 3,3 (1,7-6,5))¹¹⁷.

Catéteres centrales venosos

Es ampliamente reconocido el poder trombogénico de los cuerpos extraños intravasculares. La incidencia de TVP asociada a catéter venoso central se ha estimado en 0,33-0,92 por cada 1.000 cateteres/día, cuando se realiza una flebografía para evaluar síntomas sugestivos de TVP¹¹⁸⁻¹²¹.

Tumores malignos

La asociación entre ETV y cáncer tiene bases fisiopatológicas sólidas desde el momento en que se han aislado sustancias procoagulantes desde el tejido neoplásico, y en especial cuando se trata de tumores secretores o tumores sólidos; por ejemplo, cáncer de mama, pulmón, páncreas, próstata, cerebro, estómago, intestino, recto...^{122,123}

Cirugía

La lesión del endotelio producida en cualquier acto quirúrgico, junto con la éstasis venosa por el reposo consecuente con la intervención, predisponen a la aparición de una enfermedad tromboembólica venosa en los primeros días del postoperatorio, aunque en determinadas intervenciones el riesgo persiste hasta algún tiempo después. La cirugía mayor es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de tromboembolismo venoso, especialmente la cirugía ortopédica de cadera y rodilla¹²⁴⁻¹²⁶.

Traumatismos

El riesgo de ETV se ve aumentado en cualquier tipo de paciente que ha sufrido un traumatismo mayor. Los traumatismos de la columna vertebral, especialmente cuando se asocian con parálisis de los miembros inferiores, se asocian con ETV, variando la incidencia

ocurre en aproximadamente el 5% de los pacientes que columna vertebral¹²⁷⁻¹³⁰.

Embarazo y puerperio

El embarazo y el puerperio son considerados como períodos de alto riesgo protrombótico. El riesgo de presentar un episodio de tromboembolia venosa durante el embarazo es de 6 a 10 veces mayor en mujeres embarazadas que en las que no lo están¹³¹⁻¹³³.

Contraceptivos orales y Terapia hormonal sustitutiva (THS)

La posibilidad del aumento del riesgo posttrombótico en las mujeres que utilizan contraceptivos orales es bien conocido. En los años sesenta, la explosión del uso de anticonceptivos orales dió origen a numerosas publicaciones que sugerían un aumento alarmante de la incidencia de ETV en mujeres jóvenes sanas que utilizaban estrógenos orales como anticonceptivos¹³⁴. Los estrógenos que se utilizan hoy en día se asocian con un riesgo significativamente menor en comparación a los que se utilizaban hace 20 años¹³⁵⁻¹³⁷. El sobrepeso, la duración del tratamiento, el tabaquismo y la trombofilia son los factores biológicos-clínicos mejor estudiados que se asocian a TVP en mujeres que toman ACO^{138,139-141}.

Diversos estudios de cohortes han encontrado una asociación entre el uso de THS y enfermedad tromboembólica, con un riesgo entre 2 y 3 veces mayor en las mujeres que reciben THS^{139,142,143}.

Síndrome antifosfolípido

El síndrome antifosfolípido es una de las causas más frecuentes de trombofilia adquirida. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos o anticoagulante lúpico, tanto en el síndrome primario como el secundario, se asocia a diferentes cuadros clínicos como trombocitopenia, abortos de repetición y tromboembolia venosa y arterial recurrente, siendo los vasos venosos los más frecuentemente afectados. La TVP de las extremidades inferiores es la forma clínica más habitual. El riesgo de recurrencia aumenta progresivamente con el título de anticuerpos. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos no solo incrementa el riesgo de trombosis; la presencia de anticuerpos anticardiolipina a los seis meses de un episodio tromboembólico venoso predice un elevado riesgo de recurrencia y de muerte¹⁴⁴⁻¹⁴⁷.

Otros factores de riesgo adquirido

No se conoce con exactitud la relación que pueda existir entre factores como: hipertensión arterial, diabetes mellitus, patología renal, elevación del factor VIII de la coagulación, infarto agudo de miocardio, insuficiencia cardiaca, pacientes quemados, infecciones agudas, factor VIII, grupo sanguíneo ABO o enfermedad inflamatoria intestinal y la ETV. Probablemente la presencia de alguno de estos factores actúe como factor coadyuvante, especialmente si se asocian entre sí o con algún otro estado de hipercoagulabilidad¹⁴⁸⁻¹⁵².

TROMBOFÍLICOS EN LA ETV

En algunos casos, cuando varios factores de riesgo se presenta, cuando el riesgo observado derivado de esos factores, excede la suma de los riesgos individuales derivados del efecto de cada uno de esos factores. En la ETV, hoy en día se considera necesaria la coexistencia de varios factores de riesgo para que se desencadene un episodio agudo¹⁵¹.

Interacción gen-gen

El primer dato que hizo pensar en la hipótesis de la interacción gen+gen en la ETV, fue la demostración de que las personas con déficit de PC e historia familiar de ETV tienen un riesgo de trombosis mucho más elevado que las personas con déficit de PC sin ningún caso de ETV en la familia. Como esta discrepancia en la expresión clínica no era achacable a las distintas mutaciones de la molécula de la PC, se sugirió que debería existir algún factor genético adicional en las familias sintomáticas capaz de explicar esta diferencia¹⁵². Hoy se sabe que ese factor genético adicional es el FVL y que el 75% de los individuos que heredan ambos factores desarrollarán trombosis¹⁵³.

Interacción gen-ambiente

El desarrollo de un episodio de ETV, también se ve con frecuencia precipitado por la interacción entre un factor genético y otro ambiental. De este tipo de interacción, la mejor caracterizada es la interacción entre anticonceptivos orales y el factor V Leiden y/o la protrombina 20210A. Cuando coinciden el consumo de anticonceptivos orales y el factor V Leiden, el riesgo de padecer un episodio de ETV es muy superior al riesgo individual para cada uno de estos factores de riesgo (unas 4 veces superior)¹⁵⁴.

Similares resultados se han observado para las mujeres portadoras de la mutación 20210A de la protrombina y que toman anticonceptivos orales, y para las embarazadas que además son portadoras de algún factor genético trombofílico¹⁵⁵⁻¹⁵⁷.

Por último, la importancia de los estudios de asociación de familias con trombofilia y los estudios de ligamiento que permiten demostrar la co-segregación dentro de una familia de una enfermedad y las variantes genéticas responsables, permite una mayor comprensión de la heredabilidad de la misma. El proyecto GAIT (Genetic Análisis of Idiopathic Thrombophilia) es un estudio que incluye el primer análisis global del genoma orientado a conocer las bases genéticas de la trombofilia. Una vez localizados e identificados los determinantes genéticos, es cuando serán necesarios los estudios de asociación, ya que permiten analizar el efecto que estos genes representan para el riesgo de padecer ETV en nuestra población¹⁵⁸.

TROMBOFILIA Y RECURRENCIA DE LA ETV

La mayoría de los pacientes que han presentado alguna manifestación de la enfermedad tromboembólica venosa en algún momento de su vida, presentan un riesgo elevado (unas 50 veces mayor) de sufrir un nuevo episodio trombótico durante los próximos años^{159,160}. El

s con ETV, consiste en anticoagulación durante 3 a 6 meses. Si el episodio trombótico fue secundario a algún factor de riesgo transitorio o espontáneo. Sin embargo, una vez finalizado el tratamiento anticoagulante, la probabilidad de recurrencia a los 5 años es aproximadamente del 30% para los hombres y 8% para las mujeres ¹⁶¹. En una cohorte poblacional de 1720 personas con TVP seguidas durante 10 años, se apreció una recurrencia media acumulada al año del 5%¹⁶².

La recurrencia de la ETV, es mas frecuente en pacientes varones, con edad avanzada, pacientes que están sometidos a inmovilizaciones prolongadas y en pacientes que padecen neoplasias activas. En un trabajo reciente, han sido analizados 98 pacientes con enfermedad tromboembólica venosa menores de 50 años. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos, alteraciones congénitas de la coagulación (FVL, P20210A, déficit proteínas C y S), el ser varón y la presencia de obesidad en el paciente, resultaron ser factores de riesgo para la recurrencia de la enfermedad tromboembólica venosa¹⁶³.

La continuación del tratamiento disminuye la incidencia de recurrencias durante el mismo, pero a costa de un incremento en la incidencia de hemorragias. Además se ha observado que el beneficio obtenido con la prolongación de la anticoagulación no se mantiene tras la suspensión del mismo. Si alguna de las alteraciones incluidas en el estudio de hipercoagulabilidad supusiera un aumento del riesgo de recurrencia trombótica, cabría plantearse la prolongación del tratamiento en los portadores de las mismas. De hecho, la *American College of Chest Physicians (ACCP)*, en su última conferencia consenso, recomienda mantener la anticoagulación por tiempo prolongado en pacientes con síndrome antifosfolípido o con deficiencia de antitrombina¹⁶⁴. En relación a esta afirmación, recientemente se ha publicado un estudio, donde los pacientes con trombosis venosa profunda que tenían positividad para los anticuerpos anticardiolipina presentaban un aumento del riesgo (RR: 6.0; CI: 95% 1.2-29.5) de recurrencia de la enfermedad tromboembólica venosa¹⁶⁵. Otros aspectos estudiados y que parecen relacionarse con el aumento de la recurrencia de la enfermedad tromboembólica venosa en los pacientes, han sido la presencia de trombosis residual persistente (evaluada a los 6, 12, 24 y 36 meses después del episodio trombótico inicial), la determinación del dímero-D mediante la técnica STA-Liatest y la no resolución del trombo en la flebografía tras el tratamiento inicial con HBPM ¹⁶⁶.

Recientemente, un estudio prospectivo mostraba que la presencia o ausencia de una trombofilia hereditaria (factor V Leiden, mutación G20210A de la protrombina, deficiencia de AT, PC ó PS), no se asociaban con variaciones en la tasa de recurrencias, tanto si el episodio trombótico fue secundario o espontáneo¹⁶⁷. Sin embargo, aunque la presencia o ausencia de una alteración aislada no parece influir en el riesgo de recurrencia trombótica, se ha descrito que la concurrencia de varias alteraciones sí se asociaría con un aumento de la incidencia de recurrencias. En este sentido, los portadores heterocigotos del factor V Leiden y de la

na, presentaban en un estudio en 412 pacientes, una
mente superior que los portadores únicamente del factor
V Leiden (RR: 2,6). Por el contrario, el riesgo de recurrencia en los portadores heterocigotos
del factor V Leiden o de la mutación de la protrombina en solitario incluidos en este trabajo,
fue similar al de los pacientes sin ninguna de las dos mutaciones (RR: 1,1 y 1,3
respectivamente)¹⁶⁸.

Otro estudio en pacientes portadores del FVL con y sin recurrencia trombótica, concluía que
la incidencia de ETV recurrente dependía de la presencia concomitante de otras alteraciones
trombofílicas, además de si el primer episodio trombótico había sido espontáneo o
secundario¹⁶⁹.

IC. EL TAFI Y SU PAPEL EN LA HEMOSTASIA

EL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

El **sistema de la fibrinólisis** es un proceso enzimático compuesto por una serie de
activadores e inhibidores, que regulan la conversión de una proenzima circulante
(plasminógeno) en el enzima activo (plasmina) (**Figura 3**). La plasmina, al actuar sobre la
fibrina, la transforma en productos de degradación solubles (PDF). Son los fragmentos X, Y,
D y E. Si actúa sobre la fibrina estabilizada por la acción del fXIII, da lugar a la formación de
un fragmento adicional: el dímero-D; formado por dos fragmentos D unidos
covalentemente^{170,171}.

La activación del plasminógeno a plasmina, se puede favorecer de varias maneras. En
primer lugar, tras unirse al activador tisular del plasminógeno (t-PA) o al activador del
plasminógeno tipo uroquinasa (U-PA). Por otro lado, recientemente se ha puesto en
evidencia el papel que desempeña el factor XII así como el quinínogeno de alto peso
molecular (HMWK) y la calicreína, en la activación de la fibrinólisis. La activación del factor
XII, conduciría a la generación de Kalicreína, que actuaría como un potente activador de la
fibrinólisis. Además, la trombina podría jugar un papel en la activación de la
fibrinólisis al inhibir la actividad del PAI-1 (mediante el sistema de la PCA)¹⁷². El sistema
inhibidor de la fibrinólisis estaría constituido por el inhibidor del activador del plasminógeno
tipos 1 y 2 y por el sistema de las antiplasminas¹⁷³. El sistema fibrinolítico va a jugar también,
un papel importante en diversas situaciones en las que se produce proteólisis tisular, tales
como inflamación, invasión tumoral, neovascularización o trombosis¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

Todas las enzimas que constituyen el sistema fibrinolítico (**Tabla 1**) están compuestas por
dos cadenas unidas por uno o varios puentes disulfuro. En la región aminoterminal de dichas
enzimas se halla la zona que les confiere especificidad por los distintos sustratos (estructuras
%Kringles+).

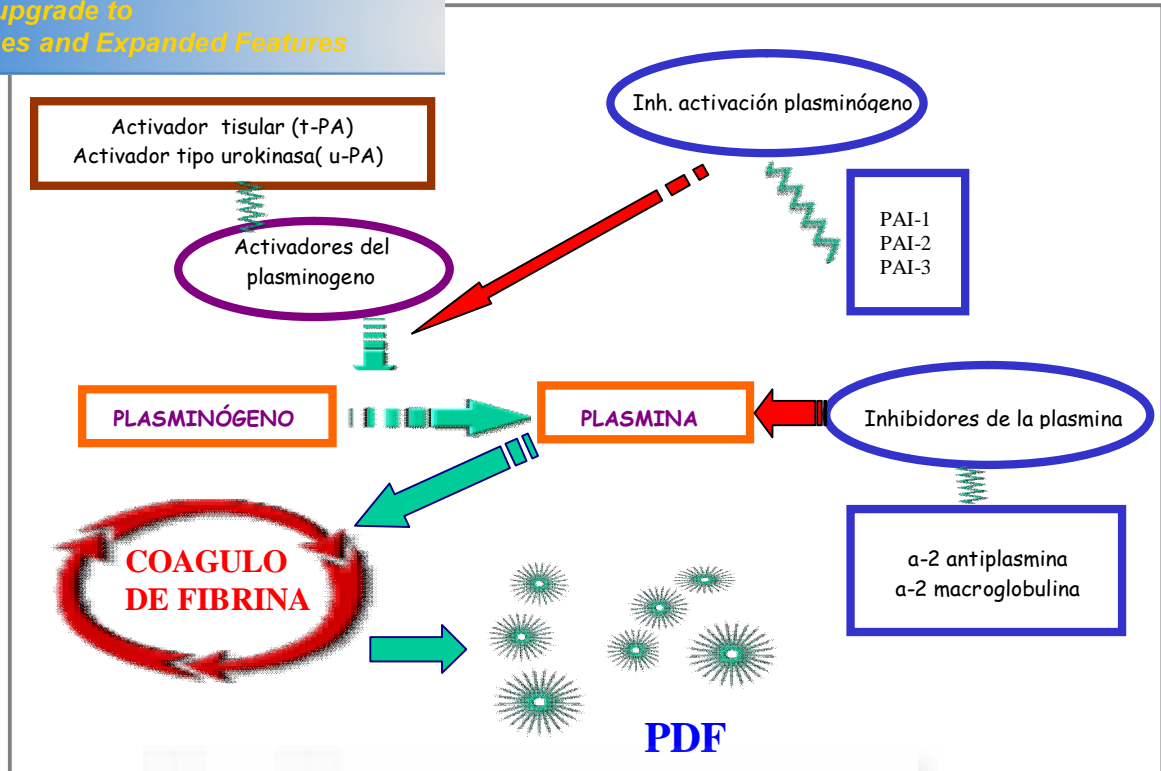


Figura 3

El **Plasminógeno (PL)** es una serin-proteasa sintetizada en el hígado, formada por 791aa. Se organiza en 7 dominios estructurales que comprenden un péptido de preactivación, cinco dominios con secuencias homólogas y un dominio proteasa. Los dominios con secuencias homólogas contienen lisina en los puntos específicos que median la unión del plasminógeno a la fibrina y la interacción de la plasmina con la α-2-antiplasmina^{177,178}. El plasminógeno se convierte en plasmina al romperse la unión Arg561-Val562.

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO			
Componentes	Peso Molecular (Kd)	Número de cadenas	Concentración Plasmática (M)
Plasminógeno	92	1	2 uM
t-PA	68	1	70 pM
u-PA	54	1	150 pM
Precalicroína	88	1	450 nM
Factor XII	80	1	375 nM
2-antiplasmina	70	1	1 uM
2-macroglobulina	725	4	3 uM
PAI-1	52	1	1 nM
PAI-2	46	2	<100 pM

Tabla 1

plasminógeno (t-PA) es una proteína sérica de 68kD, está organizada en varios dominios como el dominio **Finger**, que comprende los aa 4-50, el dominio EFG, con los aa 50-87, y dos dominios **kringle**, con los aa 87-176 y 176-262, que se localizan en el extremo aminoterminal de la molécula. Estos diferentes dominios median diferentes funciones de la enzima. Así, la unión del t-PA a la fibrina está mediada fundamentalmente por el dominio **Finger** y el segundo de los dominios **kringle**. Por otra parte, el t-PA es degradado por la plasmina, por hidrólisis del puente Arg275-Ile276, a una estructura de dos cadenas inactiva¹⁷⁹.

El **U-PA o prourocinasa** es una glucoproteína de 54kD que contiene 411aa. En este caso la tríada catalítica se localiza igualmente en el extremo carboxiterminal, mientras que en el aminoterminal se localizan el dominio **EFG** y un dominio **kringle**¹⁸⁰.

Los dos principales inhibidores del activador del plasminógeno (**PAI**) son el **PAI-1 y el PAI-2**. El PAI-1 es una glucoproteína de cadena única de 52kD compuesta por 379aa. La molécula de PAI-1 se estabiliza a través de su unión con la proteína S o vitronectina. El gen del PAI-1 se localiza en el cromosoma 7, bandas q21.3-q22 y está compuesto por 9 exones. El PAI-2 es una serpina de 393aa, de la que existen dos formas diferentes con propiedades cinéticas similares; una forma glicosilada de 44kDa y una forma glicosilada de 60kDa. La función de PAI-2 intracelular es desconocida, ya que su enzima de unión, la t-PA, es extracelular. Se cree que podría comportarse como un pool del cual el PAI-2 podría secretarse en caso de lesión celular¹⁸¹.

La **Plasmina**, asociada a la superficie celular, degrada eficientemente la fibrina y su papel en la fibrinólisis está muy bien establecido¹⁸². No obstante, dicha proteasa presenta un amplio espectro de sustratos y se sabe que es capaz de degradar gran variedad de moléculas de la membrana basal de sustratos tales como fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicanos y colágeno. La plasmina se produce a partir del plasminógeno y actúa sobre la fibrina produciendo fragmentos, que a su vez se fraccionan en otros más pequeños (**Figura 4**).

La molécula de **α 2-Antiplasmina** fue descrita originalmente como una glucoproteína de 452aa. La α 2-antiplasmina forma, junto a la plasmina, un complejo 1:1 inactivo. Esta inhibición se lleva a cabo mediante dos reacciones consecutivas: la 1ª da lugar a un complejo inactivo reversible que es seguida por una segunda reacción, de la que resulta un complejo inactivo irreversible.

El **receptor del activador del plasminógeno tipo urocina (U-PAR)** es una glicoproteína de 50-60kDa compuesta por 313aa que se une a la t-PA a través de los dominios EFG de éste. La unión de t-PA al U-PAR parece ser crucial para la activación de la urocinasa. Esta unión provoca un aumento en la generación de plasmina debido a la activación del PL¹⁸³.

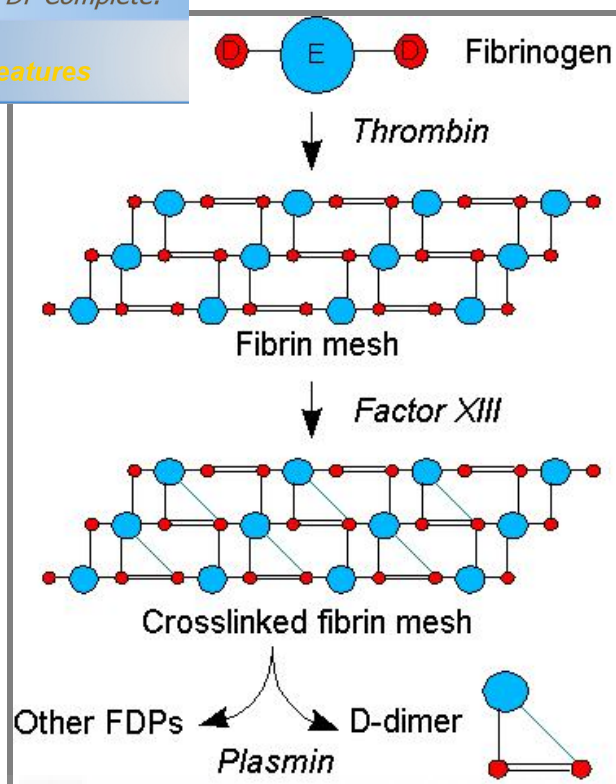


Figura 4

Otra molécula que participa muy directamente en el sistema fibrinolítico, es el **factor XIII (FXIII)**. El FXIII, es una γ -glutamil ϵ -aminolisil transamidasa que cataliza las uniones covalentes de las proteínas plasmáticas durante la coagulación sanguínea¹⁸⁴. El FXIII es sintetizado en el hígado y se encuentra en el plasma como un tetrámero compuesto de 2 subunidades α con actividad catalítica y 2 subunidades β no catalíticas ($\alpha_2\beta_2$). En la plaqueta se encuentra en forma de dímero, compuesto de 2 subunidades α ^{185,186}. El FXIII, ya sea plasmático o plaquetar, es activado por trombina. Una vez activado (FXIIIa), es capaz de catalizar la formación de uniones entre los residuos de fibrina, para transformarla en un polímero insoluble e incorporar la α_2 antiplasmina en la fibrina para reducir la actividad fibrinolítica sobre ella^{187,189}.

La identificación de la **Lipoproteína(a) (Lpa)** en el plasma como partícula de la familia de las LDL data de 1963. Está formada por una partícula de LDL unida a una apolipoproteína específica llamada apo(a). La estructura conformacional de la apo(a) muestra gran similitud con la del PL. El descubrimiento de depósitos de Lpa asociados a fibrina en placas ateroscleróticas, indicaría que la Lpa actuaría como un inhibidor competitivo del PL impidiendo la formación de fibrina e inhibiendo la fibrinólisis. Estudios recientes indican que la Lpa es capaz de estimular el PAI-1 cuyo impacto en la fisiopatología de la ETV resultaría relevante¹⁹⁰.

actuación de la plasmina sobre la fibrina estabilizada por formación de dos fragmentos D unidos covalentemente (**Figura 4**). De la mayoría de estos estudios se desprende que el DD no se puede considerar como una prueba diagnóstica de primera línea que por si sola pueda excluir la ETV. Sin embargo, además de su utilidad en el diagnóstico de la ETV al ser una prueba con un alto valor predictivo negativo, los valores del DD se han asociado también con el pronóstico, ya que valores elevados del mismo permiten correlacionarse con el riesgo de recurrencia de la enfermedad¹⁹¹⁻¹⁹⁵.

Actualmente disponemos de diversos métodos para medir los niveles de DD en sangre. Los más sensibles se basan en la técnica de ELISA, aunque también existen métodos que se pueden realizar a la cabecera del enfermo a partir de un capilar de sangre total^{196,197}. El DD también tiene su utilidad en el diagnóstico de la ETV combinado con pruebas de imagen. Así, diferentes estudios confirman que en pacientes con sospecha de TVP y con eco-doppler negativo, un dímero-D negativo evitaría la realización de eco-doppler seriados, y por otra parte, en los pacientes con sospecha de TEP y con una gammagrafía de ventilación-perfusión negativa, un DD negativo haría innecesarias más pruebas de imagen^{198,199}.

DESCUBRIMIENTO Y NOMENCLATURA DEL TAFI

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas y péptidos. Se pueden clasificar en base a diferentes criterios: especificidad de sustrato, mecanismo catalítico, relaciones estructurales y evolutivas, localización intracelular, función en el organismo, etc.

Se han definido 6 grupos de proteasas: serina-proteasas, treonina-proteasas, cisteina-proteasas, aspártico-proteasas, metaloproteasas y proteasas de mecanismo catalítico desconocido. Dentro de las metaloproteasas existe un subgrupo heterogéneo que engloba diferentes familias, una de las cuales son las **carboxipeptidasas**, a la que pertenece el **TAFI**^{200,201}.

Las **carboxipeptidasas** son enzimas que hidrolizan el aminoácido c-terminal de una proteína o péptido. La presencia de una actividad carboxipeptidasa lábil en el suero, que interfería con las medidas de la actividad de la carboxipeptidasa N, fue descrita por primera vez en 1988²⁰². Esta enzima difería de la CPN en términos de estabilidad, pH óptimo y especificidad de sustrato, por lo que fue llamado **Carboxipeptidasa U (CPU, Unstable-CarboxiPeptidase)**²⁰³. **Campbell y Okada**, también describieron un incremento en la actividad arginin-carboxipeptidasa, inducida durante la coagulación²⁰⁴; el enzima responsable fue llamado CPR (R por *arginina*).

Eaton y colaboradores (cols.), clonaron el cDNA del enzima a partir del hígado humano y se dedujo la secuencia aminoacídica. **Eaton** denominó al enzima CPB plasmática (por

tripsina (tripsina pancreática)²⁰⁵. **Wang y cols.** confirmaron entonces que la tripsina también puede ser activada por la tripsina pancreática y que generaban proteínas idénticas²⁰⁶. **Bajzar y cols.** purificaron el mismo enzima y demostraron que podía ser activado por trombina y que, bajo dicha activación, inhibía la fibrinólisis²⁰⁷. Este grupo introdujo el término de **TAFI (Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor)**.

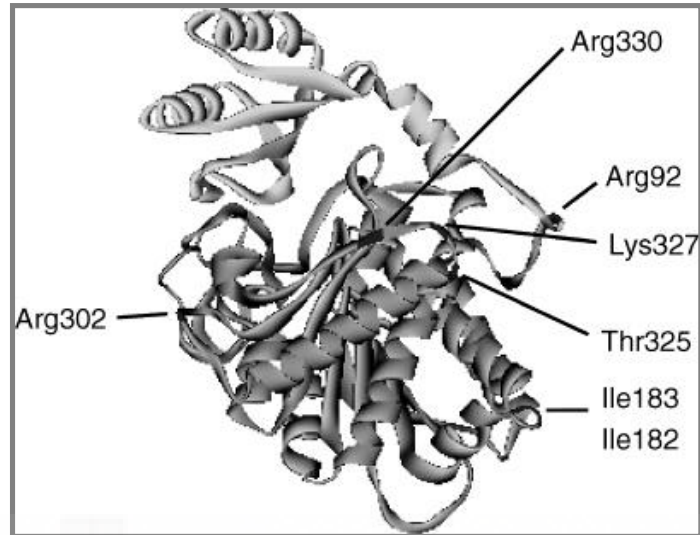


Figura 5

SÍNTESIS, CARACTERÍSTICAS Y NIVELES PLASMÁTICOS DEL TAFI EN HUMANOS.

El TAFI en humanos se sintetiza en el hígado como una pre-proenzima de 423aa. Esta proteína, una vez activada, genera un enzima inestable con actividad frente a residuos básicos. El TAFI activado (TAFIa) es intrínsecamente inestable a 37°C, con una vida media de 8-9 minutos²⁰⁸. Esta inestabilidad es fuertemente dependiente de la temperatura, de manera que a temperaturas más bajas, aumenta la estabilidad del enzima. La inactivación del TAFIa es debida a una desestabilización conformacional, como consecuencia de la cual, se produce una degradación proteolítica del enzima²⁰⁹. Recientemente se ha identificado la presencia de TAFI en plaquetas y se ha demostrado que la enzima puede ser secretada gracias a la estimulación de las mismas²¹⁰.

Para su formación, una vez escindido un péptido señal de 22 aminoácidos, se genera una molécula de 55 kDa que circula libremente en sangre; el 20 % del peso molecular corresponde a carbohidratos incorporados en puntos de N-glicosilación, situados en el péptido de activación y que incrementan su vida media. La mayor parte del TAFI circula ligada al Lys-plasminógeno, por el que presenta alta afinidad (Kd = 35 nmol/l). Para su actuación, el pH óptimo del TAFI es de 7,7 y se inhibe por EDTA, PCI, DTT, B-mercaptoetanol, GEMSA y LCI²¹¹⁻²¹³.

El TAFI se ha analizado en numerosas especies (cerdo, ratón, conejo, perro...), donde existen grandes diferencias en la actividad de esta enzima. El TAFI presenta aproximadamente un 40% de identidad estructural con las procarbopeptidasas pancreáticas,

ruir una estructura tridimensional basada en conocidas carbopeptidasas (proCPAs y proCPBs). A partir de estos modelos, se han llegado a conformar estructuras tridimensionales del TAFI humano (**Figura 5**)²¹³. En analogía con otras proteínas de las familias de las carbopeptidasas que contienen zinc, el TAFI estaría formado por 2 dominios estructurales: el péptido de activación (que es escindido durante su activación) y el dominio catalítico (**Figura 6**).

Algunos estudios han determinado el nivel del TAFI en individuos sanos, hallándose en la población normal un amplio rango de sus niveles. La concentración media de TAFI en sujetos sanos oscila entre 75-275 nM²¹⁴⁻²¹⁶. Otros estudios muestran unos valores medios de TAFI en plasma entre 4 y 15 g/ml^{214,217}.

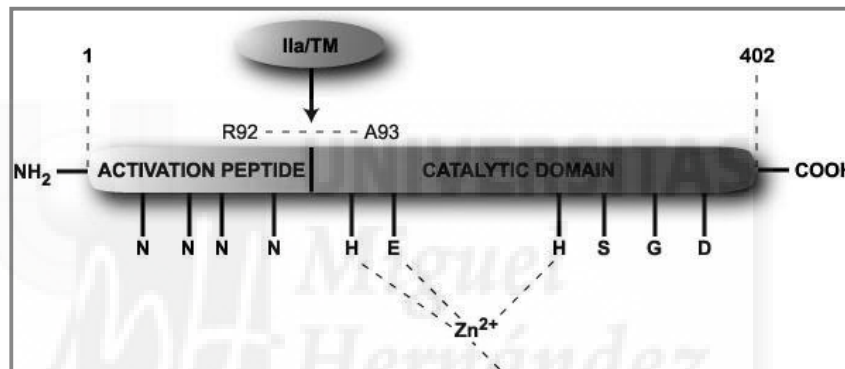


Figura 6

Chetaille y cols. estudiaron los valores del TAFI en 249 sujetos sanos, donde se objetivó un amplio rango del nivel de TAFI, desde un 41% hasta un 259%. El sexo y el embarazo no influenciaban en los niveles de TAFI ag. Se encontró una correlación positiva entre el TAFI y la edad en mujeres, pero no en hombres. El TAFI en varones africanos fue significativamente más bajo que el de la población masculina caucasiana. En general se concluyó que los valores de TAFI fueron muy estables entre los individuos, no existiendo variaciones significativas en la hora del día o el periodo del mes estudiado²¹⁸.

En otro estudio, no se halló ninguna diferencia en la concentración antigénica de TAFI entre hombres y mujeres. Los análisis del efecto asociados a la edad, mostraron que mientras no hay un incremento significativo de TAFI relacionado con la edad en los hombres, este sí se encuentra en mujeres²¹⁶.

Monasterio y cols. realizaron un estudio de validación de los niveles antigénicos del TAFI, medidos mediante una técnica ELISA específica en 81 sujetos sanos de Barcelona²¹⁹. La

de 50.3 años. Los valores de TAFI medios fueron de 74% y otro mínimo de 54.71%. Una vez evaluados por grupos de edades, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, no hubo diferencias significativas entre los sexos de los sujetos sanos.

ACTIVACIÓN/INHIBICIÓN DEL TAFI POR LA UNIÓN TROMBINA-TROMBOMODULINA

La activación del TAFI se produce simultáneamente a la formación de fibrina en el torrente sanguíneo. La trombomodulina parece jugar un papel dual; por un lado, ralentiza la generación de trombina mediante el aumento de la activación de la PCA por la propia trombina y con el consiguiente aumento de la fibrinólisis; mientras que por otro lado, hace que estas concentraciones bajas de trombina sean más efectivas en la activación de TAFI con una ralentización de la fibrinólisis como resultado. La activación de TAFI se estimula a concentraciones bajas de trombomodulina (5nM), mientras que la activación de TAFI disminuye a mayores concentraciones de TM (10nM)²²⁰. Aunque la activación de TAFI y de la proteína C pueden suceder simultáneamente, la concentración de TM es el factor determinante en el efecto final (**Figura 11**).

La importancia de la TM en la activación del TAFI queda de manifiesto por el hecho de que sin su cofactor, la trombina es alrededor de 1250 veces menos eficaz en la activación de la procarbopeptidasa. El efecto de la TM, se manifiesta como una drástica reducción de la Kcat. El complejo trombina-TM adopta una conformación espacial que acelera la proteólisis del péptido de activación del TAFI y la consiguiente transformación de éste en TAFIa (activado)²²¹.

La activación de TAFI por la trombina es un proceso ineficiente (Km 0,5-0,21 μM ; Kcat 0,0021s⁻¹), y en consecuencia, se requieren grandes cantidades de trombina. El receptor de las células endoteliales, la trombomodulina, estimula la activación de TAFI por trombina unas 1250 veces, lo que se debe casi exclusivamente a un incremento en eficiencia catalítica (Kcat en presencia de TM es 0,4-1,2 s⁻¹) (**Figura 7**).

La actividad enzimática de TAFIa es inestable y se ha descrito su inactivación mediante proteólisis y por un proceso espontáneo dependiente de T^a. Después de la incubación con tripsina, plasmina o trombina se halló que su actividad incrementaba para luego decaer, puesto que después de la proteólisis inicial de activación, el enzima seguía sufriendo cortes proteolíticos que lo inactivaban (en la Arg-92 y Arg-330). La identificación de los lugares de proteólisis en el TAFI que se generaban en su activación e inactivación por el complejo TR-TM, indicaron que la forma activa de TAFI de 36 Kda era hidrolizada en 2 polipéptidos de 25 y 11Kda.

Por mutagénesis dirigida se ha confirmado que Arg-302 es el principal lugar de hidrólisis por TR-TM, sugiriendo que la inactivación de TAFI viene causada por su inestabilidad

o descrito. TAFIa es altamente sensible a la T^a; su vida media es de 30°C y 45min. a 30°, hasta varias horas a 22°C. A 0°, la enzima es estable²⁰⁸.

TAFIa puede ser estabilizado, no solamente mediante el descenso de la T^a; agentes como el E-ACA, heparina y GEMSA también previenen el descenso térmico del TAFIa. Recientemente, una variación natural del TAFI fue detectada en la posición 325 (Thr325 o Ile325)²²². El residuo de isoleucina en la posición 325 alarga la vida media del TAFIa desde 8 a 15 minutos a 37°C. La variante Ile325 también exhibe un potencial incremento antifibrinolítico comparado con la variante Thr325.

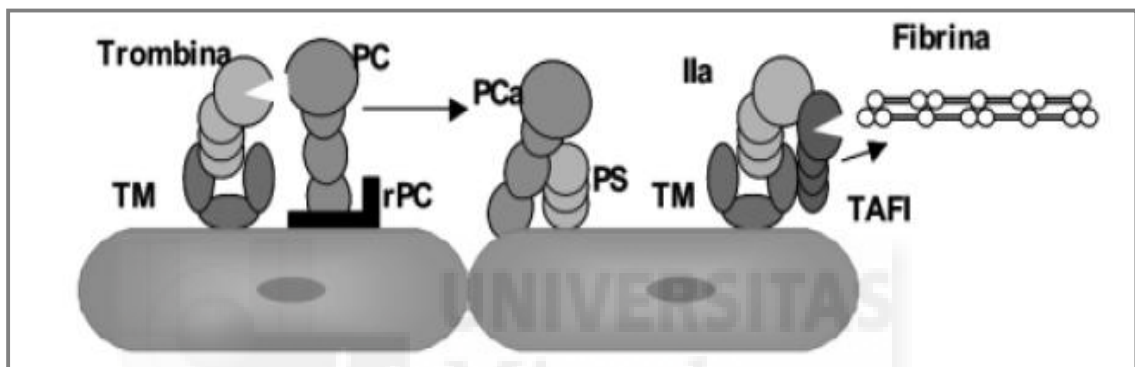


Figura 7

ACTIVACIÓN / INACTIVACIÓN DEL TAFI POR LA PLASMINA

La importancia fisiológica de la plasmina como regulador del TAFIa, no está aclarada actualmente. De manera similar a la trombina, la plasmina se adhiere al TAFI a través de la Arg-92, generando TAFIa. Comparado con la trombina, la Km para la activación del TAFIa por la plasmina es mucho más baja (55mmol L⁻¹).

La plasmina se adhiere también al TAFI, a través de la Arg 302, Lys327 y Arg330, dando lugar a fragmentos de 44,3 Kda que producen un mecanismo mediante el cual la plasmina previene la formación de TAFIa. Por otro lado, el TAFIa ha mostrado una atenuación de la fibrinólisis mediante la inhibición de la plasmina directamente²²³.

GENOTIPO Y POLIMORFISMOS DEL TAFI

directa de la variación en la secuencia del ADN que se origina y reparación del ADN. Si el cambio originado se mantiene evolutivamente, y alcanza una prevalencia en la población superior al 1%, pasa de ser considerado como una mutación a ser un polimorfismo. Mas del 90% de los polimorfismos son sustituciones de un nucleótido por otro, por lo que se denominan SNP (single nucleotide polymorphism)²²⁴.

La mayoría de los polimorfismos se localizan en regiones poco trascendentes de los genes y no afectan a la función del gen o de la proteína que codifica. Estos cambios se denominan silenciosos o neutrales. Por otro lado, los polimorfismos funcionales, están localizados en regiones reguladoras o codificantes, afectan los procesos de transcripción, estabilidad del ARN, traducción, procesos postraduccionales, estabilidad, estructura o función de la proteína.

El sistema hemostático se caracteriza por el delicado equilibrio entre la respuesta procoagulante y el control anticoagulante. Por ello, pequeños cambios polimorfos funcionales que afecten a estas proteínas, pueden tener un efecto más o menos significativo, en el funcionamiento global del sistema. De esta forma, no sorprende que estos polimorfismos jueguen un papel en el riesgo de sufrir los trastornos asociados a desequilibrios del sistema hemostático: trombosis o hemorragia.

No obstante, la mayoría de estos cambios va a tener un efecto muy moderado, casi inapreciable, sobre el riesgo trombótico por tratarse de una enfermedad compleja en la que intervienen multitud de factores. Por ello, solo la caracterización de complejos perfiles genéticos permitirá identificar haplotipos específicos, genotipos complejos que se asocien con un elevado riesgo trombótico.

Organización genómica del TAFI

Recientemente ha sido identificado y caracterizado el cDNA del TAFI en ratas²²⁵⁻²²⁷. La secuencia aminoacídica del TAFI en el ratón muestra un 85% de identidad con la del TAFI en humanos.

El gen del TAFI humano, recientemente caracterizado, abarca aproximadamente 48Kb de DNA genómico²²⁸. Este gen lo conforman 11 exones. La posición de los límites intrón/exón esta conservada entre el gen del TAFI y las carbopeptidasas A1, A2 y B pancreáticas en ratas, indicando que estas carbopeptidasas se presentan como un gen común ancestral. El gen del TAFI humano está situado en el cromosoma 13q14.11²²⁹ (**Figura 8**). El promotor del TAFI humano fue caracterizado y encontrado por carecer de una secuencia común TATA.

También, múltiples sitios de inicio de señal fueron descritos. Esto contrasta con otros genes de otras carbopeptidasas (como las carbopeptidasas pancreáticas) que presentan una secuencia-promotor TATA y tienen un único sitio de inicio transcripcional. Se ha visto entonces, que la evolución del gen del TAFI, está relacionada con la expresión del mismo en el hígado y que su región promotora adquiere características comúnmente asociadas con los

vitamina K-dependientes, cuya expresión está mediada



Figura 8



El TAFI y sus polimorfismos

Los SNP más relevantes descritos hasta ahora en el gen del TAFI son 16: -2599G/C, -23451G/2G, -1925T/G, -1690G/A, -1102T/G, -1053T/C, -530C/T, -438A/G, -298G/A, -152A/G, +505A/G, +678C/T, +1040C/T, +1364G/A, +1542G/A y +1583A/T. Diez de estos polimorfismos están situados en la región 5q y tres en la región 3q del DNA. De los tres polimorfismos presentes en la **región codificante**, dos resultan de la sustitución de un aminoácido (505A/G SNP: 147Thr/Ala y 1040C/T SNP: Thr325Ile) y uno, es una mutación silente.

Dos isoformas del gen del TAFI fueron descritas, variando una de otra, al sustituir alanina por treonina en la posición 147. Las dos isoformas fueron halladas en la población normal, sugiriendo que pudieran ser polimorfismos genéticos. Además, fueron expresadas en el sistema del baculovirus. El alelo *wild type* de este polimorfismo (Ala147Thr) se encontraba en la isoforma o genotipo 147Ala/Ala.

En un reciente estudio, 7 nuevos polimorfismos fueron descritos en la región promotora del gen TAFI: -152 A/G, -438 A/G, -530 C/T, -1053 C/T, -1102 T/G, -690G/A y -1925 T/C²¹¹. Cinco de los siete polimorfismos fueron localizados en regiones muy cercanas a sitios de transcripción de muchos factores de la coagulación. También los polimorfismos fueron relacionados con los niveles de TAFI ag, encontrándose que los niveles de TAFI en plasma eran mayores en los genotipos 438GG/ -1053CC/ -1102GG y -1690AA homocigotos.

Schneider y cols. describieron en el 2002 el polimorfismo genético Thr325Ile, que actualmente es uno de los polimorfismos del TAFI más estudiados²²². El alelo *wild type* de este polimorfismo corresponde a la isoforma 325Thr/Thr. En este estudio, demuestran que la variación Ile/Thr en la posición 325 presenta diferencias sustanciales en la estabilidad térmica y en las propiedades antifibrinolíticas del TAFI. La posición Ile-325 aumenta la vida media del TAFI de 8 a 15 minutos a 37°C, a pesar del residuo que existe en la posición 147. Así mismo, Ile-325 exhibe un efecto antifibrinolítico que es un 60% más potente que la variante Thr-325.

dividuos homocigotos para la variante Ile-325 del TAFI, más alargada de dicha molécula así como mayor potencia en su forma activada, que los individuos homocigotos para la variante Thr-325.

Posteriormente, en un importante estudio multicéntrico realizado en varios hospitales europeos, y que evalúa la relación entre la presencia del polimorfismo Thr325Ile y el riesgo de presentar infarto de miocardio, se observó, que los niveles elevados de TAFI antigénico que aparentemente estaban relacionados con la presencia de portadores de alelo Thr325, parecían artefactados²³⁰. A propósito de la publicación de este trabajo, se ha sugerido que ciertas técnicas para determinar el TAFI antigénico puedan presentar dependencia del SNP Thr325Ile, expresando valores artefactados del TAFI antigénico plasmático. Actualmente, existen varias técnicas de enzoinmunoensayo que obvian estos problemas, ya que se han conseguido desarrollar paneles de anticuerpos monoclonales específicos (genotipo-independientes) que consiguen que los resultados de los procedimientos no resulten artefactados. **Gils y cols.** describieron varias técnicas de determinación del TAFI y observaron también, que según las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile que presentara el paciente, los resultados de estas técnicas diferían. Estos resultados artefactados se podrían evitar utilizando técnicas polimorfismo-independientes²³¹. Otros autores han demostrado también la dependencia de los niveles medios de TAFI según las diferentes isoformas de los principales polimorfismos de la proteína, debido a la utilización de paneles de anticuerpos específicos, que influenciarían en los resultados de las técnicas utilizadas²³².

Recientemente, **Frere y cols.** en un ensayo con 209 sujetos (86 casos con antecedentes de cardiopatía isquémica y 123 controles sanos), manifestaron la polimorfismo-independencia de dos técnicas (%STA-Stachrom TAFI+ y %Asserachrom TAFI-1B1/P4C2+) al estudiar su relación con las diversas isoformas genóticas, así como la influencia de las mismas sobre los niveles plasmáticos del TAFI antigénico. En este estudio también se ha puesto en evidencia la diferencia existente o no entre los niveles plasmáticos del TAFI y algunos polimorfismos: C-2599G, -2345 2G/1G, A-1690G, G-1102T, G-438A, Ala147Thr, Thr325Ile, C+1542G y T+1583A. En los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de TAFI, siendo los genotipos 147Thr/Thr y 325Thr/Thr los que presentaron niveles más elevados de TAFI plasmático. La distribución de estos genotipos según el número de portadores (de mayor a menor) en el polimorfismo Ala147Thr fue: Ala/Ala, Ala/Thr y Thr/Thr, respectivamente; en el Thr325Ile fue: Thr/Thr, Thr/Ile e Ile/Ile, respectivamente²³³.

En otro estudio, se demostró claramente que los niveles circulantes de TAFI se encontraban elevados en los polimorfismos: +1542G asociado con Ala147Thr, T+1583A o

ado en 121 individuos de origen caucasiano de entre 40-
entro de salud, con ocasión de una revisión médica
general^{234,235}. También se han investigado las mutaciones FXIII A Leu 34 y TAFI-438G/A en
214 pacientes que habían presentado un primer episodio de embolismo pulmonar. La
frecuencia de FXIII A Leu 34 en los pacientes fue de 4,5% y en los controles de 8,8%
respectivamente, no pudiendo demostrarse la implicación de este polimorfismo con el
desarrollo de embolismo pulmonar. En cuanto al genotipo -438A/A del TAFI, la frecuencia fue
de 1,5% en los pacientes con embolismo pulmonar y 8,1% en los controles, demostrándose
que el alelo -438A/A se asocia con un riesgo reducido de embolismo pulmonar.

En 2001, **Mornage y cols.** publican un trabajo con 313 pacientes portadores de FVL
(divididos en 2 grupos: 145 pacientes sin episodios de trombosis venosa y 168 pacientes con
algún episodio de tromboembolismo venoso), donde determinan los polimorfismos del TAFI:
Ala147Thr y C+1245G y el riesgo de los mismos de padecer enfermedad tromboembólica. El
estudio concluye que los genotipos Ala147Thr y C+1245G no muestran nuevos datos sobre el
riesgo de trombosis venosa en pacientes portadores de FVL, ya que la frecuencia de estos
SNP, fue similar en individuos con o sin tromboembolismo venoso²³⁶. Este mismo grupo de
trabajo, estudió los niveles de TAFI en relación con sus diferentes genotipos en pacientes con
enfermedad coronaria en varios países. El análisis de haplotipos reveló que los portadores
del genotipo Thr/Thr147 asociaban un mayor riesgo de enfermedad coronaria en Francia,
mientras que no ocurría lo mismo en el Norte de Irlanda²³⁷.

Muy recientemente, se ha publicado un trabajo que pone de manifiesto la complejidad de la
asociación de ciertos polimorfismos genéticos y el riesgo de presentar enfermedad
tromboembólica venosa. En concreto, **C.H.Martín y colaboradores**²³⁸ han demostrado que el
alelo 505G (Ala147Thr) está relacionado con un incremento del riesgo de padecer ETV. Lo
llamativo de este estudio, es que dicho alelo presentaba niveles de TAFI antigénicos más
bajos que el resto de alelos de ese polimorfismo, lo que demuestra que el estudio de los
polimorfismos del TAFI y su relación con la enfermedad tromboembólica debe seguir siendo
investigado para esclarecer este tipo de paradojas. Además, los niveles de TAFI fueron más
elevados en el genotipo 147Thr/Thr del polimorfismo Ala147Thr. Estos hallazgos ya fueron
comunicados por otros autores como **Brouwers y cols.**²³⁰. Curiosamente este genotipo
estaba asociado a un bajo riesgo de padecer ETV en los pacientes.

TAFI Y FIBRINOLISIS

Se ha demostrado que TAFIa inhibe la fibrinólisis mediante la lisis de estos residuos de
Lisina/Arginina C-terminales de la fibrina, y en consecuencia, limitando la formación de
plasmina²³⁹ (**Figura 9**).

a a cargo del complejo trombina-trombomodulina durante la fibrinólisis de las lisinas C-terminales de la fibrina parcialmente digerida, con un descenso concomitante de la unión del plasminógeno y el retardo en la ruptura del coágulo. El TAFIa inhibe por tanto, la activación del Glu-plasminógeno y su conversión a Lys-plasminógeno.

Por otro lado, el TAFIa anula la estimulación de la formación de plasmina por los PDF (DD-E) y también previene la conversión de DD-E a fragmento E y DD, que a su vez dificulta la polimerización de fibrina. El efecto del TAFIa en la fibrinólisis, puede ser además potenciado por la activación del TAFI mediante la plasmina, y la inactivación de esta plasmina por el TAFIa.

PAPEL DEL TAFI EN EL MODELO DE COAGULACIÓN REVISADO

Recientemente se ha postulado un modelo para la coagulación sanguínea, donde no se hace distinción entre la vía intrínseca y la extrínseca. Según este modelo, la coagulación se iniciaría por la exposición al factor tisular ²⁴⁰.

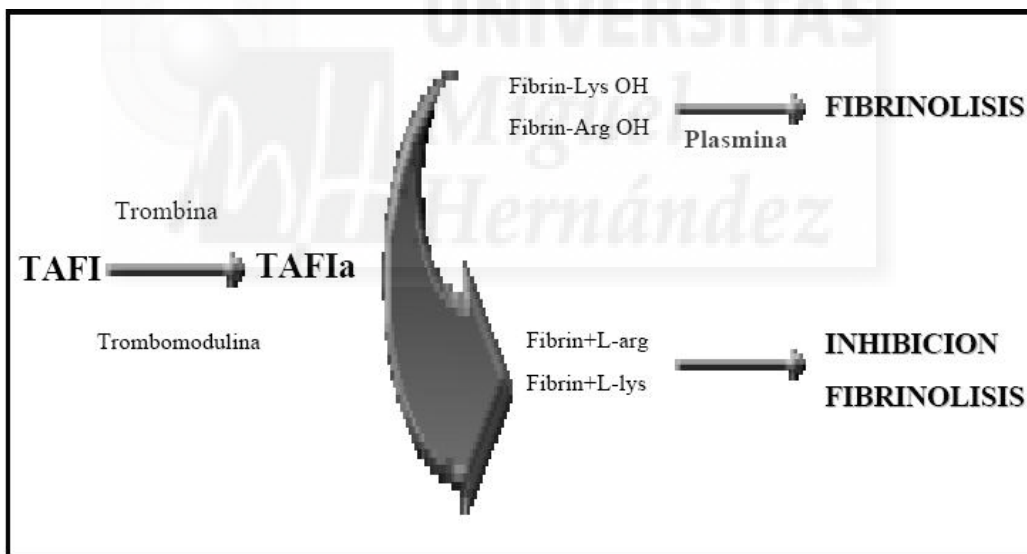


Figura 9

El factor tisular (TF) se une al factor VIIa y este complejo activa a los factores IX y X. Una vez que se han generado pequeñas cantidades de factor Xa, la vía extrínseca se inhibe rápidamente por el TFPI²⁴¹. Mientras, se generan cantidades suficientes de trombina para inducir la formación de fibrina. La formación de trombina continúa dentro del coágulo de fibrina, y de hecho, la mayor parte de la trombina se genera después de la formación del coágulo ²⁴².

del coágulo se produce principalmente a través de la vía del factor XI por la trombina unida a la fibrina en el exterior del coágulo.

Pese a la formación de pequeñas cantidades del factor XI, se produce una segunda explosión de formación de trombina gracias a la vía intrínseca, por la continua activación del factor XI por trombina y el poder de amplificación del complejo tenasa y protrombinasa. Estas concentraciones elevadas de trombina se necesitan para la activación de TAFI y la inactivación del U-PA, lo que resulta en un descenso de la fibrinólisis. Este modelo también explica el efecto profibrinolítico de la proteína C activa, dado que esta, mediante la inactivación de los factores Va y VIIIa, disminuye la generación de trombina y por consiguiente inhibe la activación de TAFI^{243,244}.

En este modelo, la trombina se destaca por sus funciones procoagulantes y anticoagulantes (**Figura 10**). Se han propuesto diversas explicaciones a partir de la observación de que el mecanismo de acción de la trombina, es dependiente de su concentración. In vivo, la activación continua del sistema de coagulación a nivel basal, genera bajos niveles de trombina, resultando en la inhibición de la coagulación por la activación de la proteína C. Se puede concluir que, a concentraciones elevadas la trombina no solo es procoagulante (al ser responsable de la formación de fibrina) sino también antifibrinolítica (al ser capaz de activar al TAFI), lo que aumentaría su potencial trombótico.

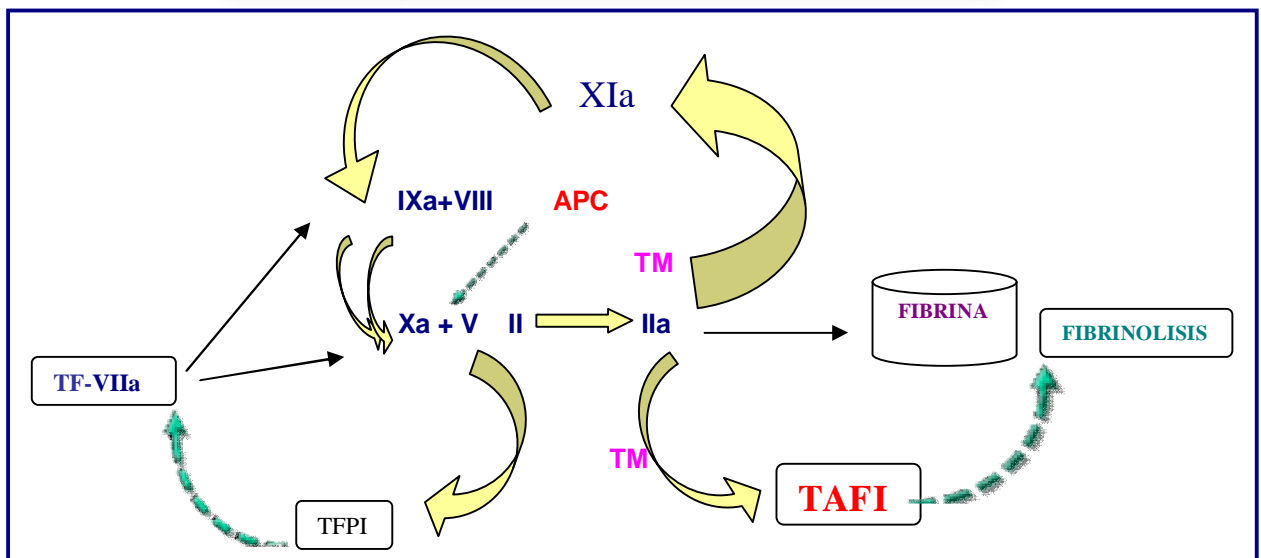


Figura 10

Como arma terapéutica en patologías tanto trombóticas como hemorrágicas, el uso de t-PA en combinación con estreptoquinasa en pacientes con infarto de miocardio, una elevación de los niveles de TAFIa fué detectada en plasma tras el comienzo del tratamiento sugiriendo la activación del TAFI por la plasmina.

Además, la generación de TAFIa en perros tras trombosis coronaria y terapia trombolítica posterior con t-PA, ha sido demostrada *in vivo*²⁴⁵.

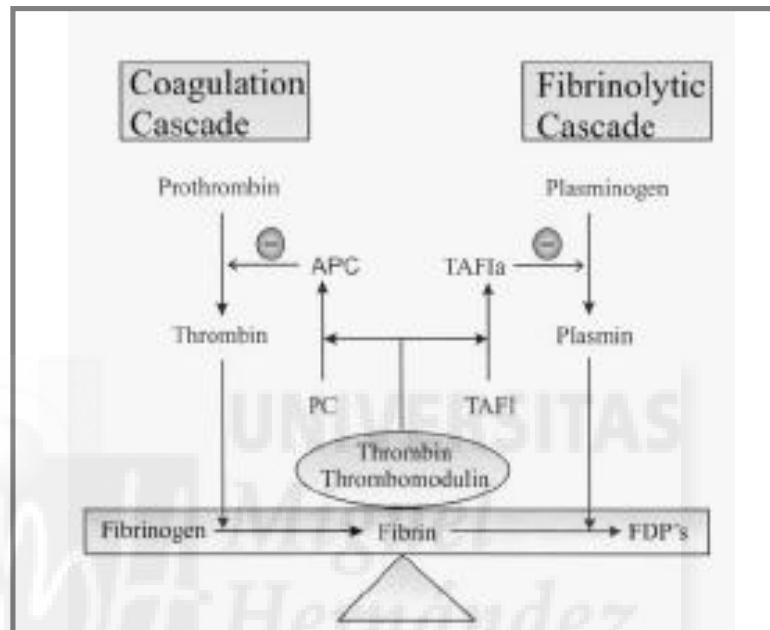


Figura 11

Se ha descrito un potente inhibidor del TAFI que proviene de la patata (PCI), aunque no se ha descrito todavía ningún inhibidor natural del TAFI en el humano. Por otro lado, en modelos de trombolisis arterial y de trombosis en la vena yugular en ratones, la inhibición del TAFI por inhibidores específicos, mejoraría la lisis del trombo por t-PA²⁴⁶.

Por todo ello, podemos concluir que aunque el rol patofisiológico del TAFI permanece todavía sin esclarecerse, es evidente que TAFI constituye un importante nexo de unión entre la coagulación y la fibrinólisis (**Figura 11**). Un mayor estudio de este mecanismo, puede conducirnos a mejorar la eficiencia de la terapia trombolítica en el tratamiento de los desórdenes trombóticos, mientras que otros agentes que incrementen la eficiencia de TAFI, pueden ser útiles en el tratamiento de los desórdenes hemorrágicos de las hemofilias A y B.

EL TAFI EN LA ETV

Estudios recientes han demostrado que el TAFI es un posible factor de riesgo para la enfermedad tromboembólica venosa. Aun así, hay todavía muy pocas evidencias que relacionen el TAFI con la ETV, ya que es un aspecto de reciente interés por parte de los científicos especializados en la fisiopatología de la trombosis.

El primer trabajo que evaluó al TAFI como posible factor de riesgo en la trombosis venosa profunda, fue realizado en Leiden y relacionó los niveles de TAFI en 474 pacientes y 474 controles sanos, ajustados por sexo y edad. En las mujeres controles, fué objetivado un incremento de los niveles de TAFI con la edad. En los hombres no se pudo demostrar este hallazgo. El uso de anticonceptivos también incrementó significativamente la concentración de TAFI. En los pacientes cuyos niveles de TAFI excedían el percentil 90 de los controles (>122u/dl), se incrementaba el riesgo de presentar trombosis venosa 2 veces más, que en los pacientes con niveles de TAFI por debajo de percentil 90 (OR: 1.7; 95% IC, 1.1-2.5). En pacientes portadores de la mutación factor V Leiden, los niveles elevados de TAFI no se asociaban con mayor riesgo trombótico, siendo sin embargo significativo, el riesgo de trombosis en pacientes que presentaban niveles de factor VIII elevado²¹⁶.

En otro estudio de casos y controles, se investigó la relación entre los niveles de TAFI y algunos marcadores de la coagulación y fibrinólisis, en pacientes con tromboembolismo pulmonar. Los niveles de TAFI no diferían entre los pacientes que presentaban tromboembolismo pulmonar (TEP) y los pacientes sin dicha patología. En ambos grupos de pacientes, los niveles de TAFI no se correlacionaban con el d-dímero, fibrinógeno o la proteína C, respectivamente. La edad y el sexo no influenciaron tampoco en los niveles antigénicos de TAFI. Tampoco existían diferencias significativas entre los pacientes con TEP y TVP, y los que presentaban TEP sin TVP. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con TEP masivos y los pacientes con TEP menos oclusivos (con niveles mas altos de TAFI en los primeros). También se observó una correlación entre los pacientes con TEP con altas tasas de oclusión (95-100%) y los niveles elevados de dímero-D²²¹.

Por otro lado, en un estudio multicéntrico de cohortes prospectivo, se evaluó a 600 pacientes con un primer episodio de tromboembolismo venoso, intentando establecer la influencia de los niveles de TAFI en el riesgo de recurrencia de dicha patología. Se observó que existía una asociación entre la presencia de niveles elevados de TAFI (percentil \geq 75) en pacientes con enfermedad tromboembólica, y la recurrencia de la misma (RR:1.7; CI:95%, 1.1-2.7). Así mismo, los pacientes con niveles elevados de TAFI presentaban niveles elevados de factores XI, VIII y IX. Estos hallazgos también se relacionaban con un alto riesgo

romboembólica ((Factor IX, RR :2.9; CI:95%, 1.3-6.9), 3) y (Factor XI, RR:2.0; CI :95%, 1.0-3.9))^{247, 248}.

En otro estudio caso-control, pese a no demostrarse significativamente la relación entre los niveles de TAFI y la presencia de resistencia a PCA/FVL en 17 pacientes (P=0.18), se concluyó que indirectamente parecía existir una predisposición al incremento de los niveles de TAFI en estos pacientes. Esto podría disminuir el estado de fibrinólisis, conllevando un factor de riesgo adicional para la trombosis en estos sujetos²⁴⁹. En relación con los factores de riesgo para la trombofilia hereditaria, destaca recientemente un ensayo de casos y controles de **Colucci y cols.**, en el cual se estudia la relación existente entre 32 portadores heterocigotos a la mutación 20210A de la protrombina y la inhibición de la fibrinólisis mediada por el TAFI en estos individuos. Estos autores demostraron que los sujetos con esta mutación genética presentaban incrementada la inhibición de la fibrinólisis plasmática TAFI-dependiente, lo que podría explicar uno de los mecanismos que justifique el riesgo incrementado de padecer trombosis venosa en estos pacientes²⁵⁰.

Un estudio de cohortes familiar intentó relacionar también los niveles de factor VIII, XI, el TAFIa y la lipoproteína a, como factores de riesgo de desarrollar tromboembolismo venoso, en pacientes portadores de la mutación FVL. Los niveles de las 4 proteínas mencionadas fueron medidos en 153 pacientes portadores de FVL. De estos, el 60% tenía uno o más factores de riesgo trombofílicos concomitantes. Los niveles elevados de factor VIII:C y TAFIa, en contraposición al factor XI:C y la lipoproteína a, suponían un factor de riesgo intermedio para el desarrollo de tromboembolismo venoso y sustancialmente, contribuían al riesgo de trombosis en pacientes portadores del FVL (RR:5 (0.6-43.6) y RR:10.9 (2.9-59) respectivamente)²²⁸. Otros estudios demuestran resultados opuestos, que ponen en evidencia la falta de unanimidad de la literatura científica en cuanto a este aspecto²⁵¹.

EL TAFI Y LA ENFERMEDAD TROMBÓTICA ARTERIAL

Son numerosos los trabajos que intentan estudiar el papel del TAFI en la enfermedad trombótica arterial. A continuación, presentaremos los estudios más relevantes que han puesto de manifiesto la importancia de esta proteína en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares.

Un estudio español seleccionó a 81 sujetos sanos de Barcelona, comparando sus niveles de TAFI antigénico con 66 pacientes afectados de enfermedad isquémica cerebrovascular. Se demostró que el TAFI se comportaba como marcador de riesgo de presentar enfermedad isquémica cerebral de cualquier etiología. Tan solo la dislipemia fué el factor de riesgo cardiovascular que se asoció a una mayor probabilidad de presentar niveles elevados de TAFI en los pacientes²¹⁹. En esta misma línea, **Santamaría y cols.** en un estudio caso-control con 264 individuos (114 con accidentes isquémico cerebrales y 150 sujetos sanos controles)

tor VIII, los anticuerpos antifosfolípidos, fibrinógeno, el factor VIII, el factor VII, el factor VIIA y el factor VIIA de la protrombina. Los resultados demostraron un aumento significativo de los niveles de TAFI funcional en pacientes con accidente isquémico cerebral, comparado con los sujetos controles. La odds ratio para los pacientes fue de 5.7 (95% 2.3-14.1). Los anticuerpos antifosfolípidos y las mutaciones para la PT20210A y FVL se encontraron más elevadas en los pacientes que en los sujetos sanos, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. El fibrinógeno y el factor VIII:C también fueron más elevados en los pacientes que en los controles, pero la odds ratio ajustada para el fibrinógeno no fue significativa²⁵².

Por otra parte, en un trabajo realizado recientemente sobre 253 pacientes con infarto cerebral, no se demuestra la correlación entre los polimorfismos genéticos situados en los aminoácidos 147 y 325 y un mayor riesgo de presentar esta enfermedad²⁵³.

La enfermedad coronaria aguda, y dentro de ella, el infarto de miocardio han sido relacionadas también con la proteína TAFI, con diferentes resultados; **Esther Zorio y cols.** estudiaron el TAFI_{act} y el TAFI_{ant}, así como el polimorfismo Thr325Ile del TAFI en 127 pacientes de menos de 51 años con infarto agudo de miocardio, comparando los resultados con 99 sujetos sanos. Los niveles de TAFI_{act} fueron más bajos en los pacientes, sin embargo el nivel de TAFI_{ant} fue significativamente mayor²⁵⁴. En otro estudio español, **Santamaría y cols.** han investigado el riesgo de presentar enfermedad coronaria aguda, en relación con los niveles de TAFI funcional. Los resultados demostraron un incremento del desarrollo de enfermedad coronaria aguda en pacientes con niveles de TAFI_{ant} elevados ($\geq 126\%$), cuatro veces mayor²⁵⁵.

Brouwers y cols. evaluaron la asociación entre los niveles de TAFI_{act} y la presencia de angina inestable. En un estudio prospectivo de 209 pacientes con angina inestable, se determinó los niveles de TAFI_{act} y sus polimorfismos. De los 209 pacientes, 76 fueron refractarios al tratamiento antianginoso y 133 no lo fueron. El estudio concluyó que en los pacientes que presentaban angina inestable no refractaria, los niveles de TAFI_{act} estaban significativamente más elevados que en los que presentaban angina refractaria. Los 3 polimorfismos de TAFI estudiados (Ala 147Thr, Thr325Ile y -438A/G) tenían un efecto independiente sobre los niveles de TAFI_{act}, pero no incidían en la refractariedad o no de la angina²⁵⁶.

Recientemente, se ha estudiado en varios países (*PRIME study*) la asociación entre los niveles de TAFI antigénico y el polimorfismo Ala147Thr en pacientes con enfermedad coronaria aguda. En Francia, los niveles medios de TAFI en varones que desarrollaron enfermedad coronaria, fueron más elevados que en los controles sanos. También en este país, el genotipo Thr/Thr147 fue hallado con más frecuencia en los pacientes que en los controles, significando un riesgo relativo de 2.7 (1.2-5.8) para desarrollar *angor pectoris*.

el norte de Irlanda. Otros polimorfismos estudiados (C- + 1583A) no mostraron asociación con la enfermedad coronaria aguda²³⁷.

EL TAFI Y OTRAS PATOLOGÍAS

La terapia hormonal (incluyendo los anticonceptivos orales) incrementa el nivel de TAFI, mientras que el embarazo no tiene efecto en la concentración^{277,281}. Recientemente, **Alacacioglu y cols.** han investigado los niveles de TAFI ag en 30 mujeres con preeclampsia y en 30 mujeres embarazadas. La media del TAFI ag en pacientes con preeclampsia fue de 12.55+/-1.88 µg/ml, mientras que las mujeres embarazadas sanas presentaban unos niveles de 12.29+/-3.0 µg /ml. No fue encontrada entre ambos grupos una diferencia estadísticamente significativa²⁵⁷.

También se ha demostrado, que pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM t2), obesidad y resistencia a la insulina, presentan un nivel circulante de TAFI ag elevado, lo que puede ser la causa de su tendencia a situaciones de hipofibrinólisis²⁵⁸. Por otro lado, **Antovic y cols.** demostraron en un estudio caso-control, que los niveles de TAFI ag no están relacionados con los eventos trombóticos observados en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM t1); en otro estudio, se sugirió que los niveles incrementados de TAFI en plasma parecen estar involucrados en el mecanismo del daño endotelial en pacientes con DM t2²⁵⁹.

Recientemente, se ha observado que la expresión del TAFI está influenciada por mecanismos inflamatorios. Una correlación entre los niveles de TAFI y los reactantes de fase aguda, la proteína C y la haptoglobina, fue objetivada en humanos y en ratones. El TAFI se elevó al ser una proteína de fase aguda^{205, 209}. También se ha sugerido un papel para TAFI en enfermedades infecciosas. Los niveles de TAFI en plasma se correlacionan con marcadores de fase aguda en individuos sanos, por lo que es posible que existan mecanismos mediante los cuales el incremento en los niveles de TAFI durante la inflamación, puedan contribuir al estado protrombótico y antifibrinolítico característico de la coagulación intravascular diseminada²⁶⁰.

El papel del TAFI en la inflamación podría darse en ambos sentidos: por un lado, el aumento de los niveles de TAFI puede contribuir a la inactivación de los mediadores de la inflamación, reduciendo la susceptibilidad a un shock séptico; pero por otro lado, los niveles elevados de TAFI pueden contribuir a una inhibición elevada de la fibrinólisis y por tanto facilitar los efectos de deterioro de la coagulación intravascular diseminada²⁶⁰.

Recientemente, se ha visto en un estudio prospectivo caso-control, que pacientes con familiares portadores del genotipo TAFI 325Ile/Ile presentaban un riesgo mayor de contraer infección por meningococo, así como de fallecer debido a dicha enfermedad. En este estudio se discutía también, la posibilidad de que la inhibición del TAFI pudiera ser un mecanismo

terapéuticas en el tratamiento de la sepsis y el shock diado los niveles plasmáticos de TAFI antigénico en pacientes que presentaban coagulación intravascular diseminada, no encontrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles^{262,263}.

En relación con las enfermedades infecciosas/inflamatorias, **Saibeni y cols.** objetivaron en un estudio caso-control con 81 enfermos que presentaban enfermedad inflamatoria intestinal (47 enfermos de Crohn y 34 enfermos de Colitis Ulcerosa), que los niveles de TAFI en plasma se encontraban incrementados en estos pacientes, así como la existencia de una correlación entre estos niveles y los reactantes de fase aguda, VSG y PCR. Esta elevación del TAFI, según los autores, podría contribuir a la predisposición de ciertos estados protrombóticos que ocurren frecuentemente en estos pacientes²⁶⁴.

También se han detectado niveles bajos de TAFI en pacientes con leucemia promielocítica aguda, aunque de manera interesante, la concentración antigénica de TAFI es normal. El nivel de actividad del TAFI descendería claramente un 60%, aproximadamente²⁶⁵. Esta deficiencia funcional de TAFI en la leucemia, puede contribuir a la severidad de la diátesis hemorrágica debido a la capacidad dispareja del sistema de coagulación para proteger el coágulo de fibrina de la fibrinólisis.

A propósito de los pacientes con riesgo de sangrado, **Antovic y cols.** estudiaron a 17 pacientes con hemofilia A, realizando un estudio caso-control y evaluando el TAFI total y el pro-TAFI (TAFI activado). No se encontraron diferencias significativas en los niveles del TAFI total, si bien se encontraba algo disminuido en los pacientes con hemofilia. El pro-TAFI, se encontró significativamente reducido en los pacientes con hemofilia comparado con los sujetos controles. Este estudio pone de manifiesto la relación entre una activación defectiva del TAFI y el desorden hemorrágico en las hemofilias A²⁶⁶.

II.A HIPÓTESIS

Dada la importancia del TAFI en la regulación del balance hemostático, su implicación en la inhibición de la fibrinólisis y por tanto su potencial efecto protrombótico, encontraremos niveles séricos altos de esta proteína en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa que apoyen su papel como marcador de riesgo de trombosis.

Por otro lado, cabría esperar alguna asociación entre uno o varios de los polimorfismos genéticos del TAFI con un aumento del riesgo de padecer ETV en nuestros pacientes.

II.B OBJETIVOS

1. Estudiar si los pacientes con ETV presentan niveles elevados de TAFI plasmático.
2. Analizar si los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile, modifican los niveles plasmáticos de TAFI en pacientes y controles; y si alguno de ellos se comporta como marcador de riesgo de ETV.
3. Analizar la asociación entre los niveles de TAFI plasmático y los marcadores de riesgo genético que predisponen a la ETV: FVL y PT20210A.
4. Evaluar la asociación entre los niveles plasmáticos de TAFI y los factores clínicos de riesgo adquiridos para la ETV.
5. Estudiar si existe relación entre los niveles de TAFI antigénico plasmático y el dímero-D.

IAL Y METODOS

III.A DISEÑO Y ÁMBITO

El diseño del estudio consistió en un estudio analítico observacional de tipo casos y controles. Los pacientes se seleccionaron de manera consecutiva durante el periodo comprendido entre el 01-05-2002 y el 15-01-2005, mediante una entrevista clínica, mientras que el grupo control estuvo constituido por personas sanas escogidas aleatoriamente y pareadas por edad, sexo y lugar de residencia.

El ámbito de este estudio fué el departamento de área de salud nº19 de la Comunidad Valenciana (**Figura 12**). El estudio se realizó en la Unidad de Hemostasia y Trombosis del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital General Universitario de Alicante.

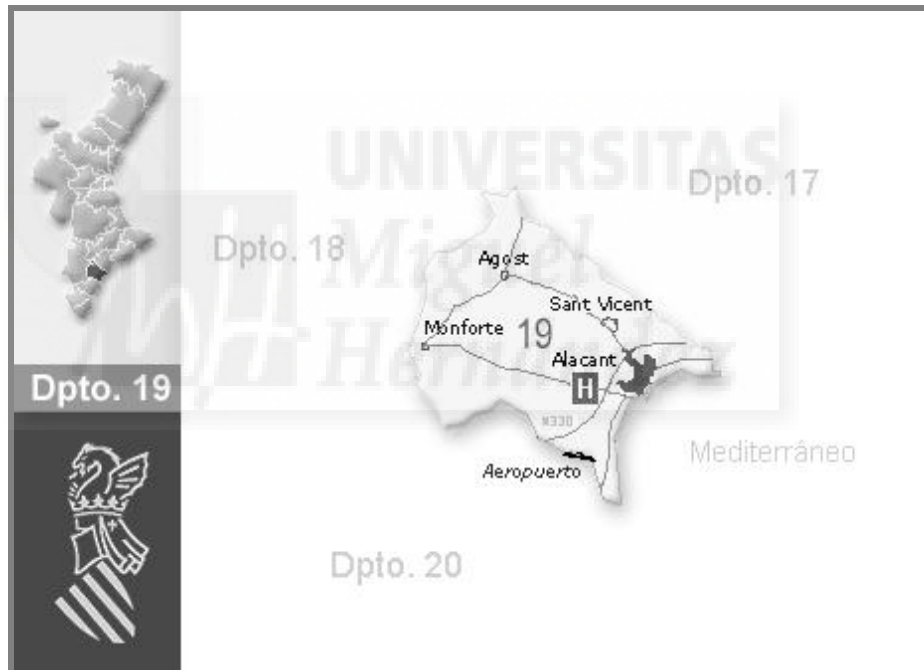


Figura 12

III.B SUJETOS

Criterios de inclusión

Pacientes con edades comprendidas entre 18 y 80 años que presentaron, al menos, un episodio de enfermedad tromboembólica venosa diagnosticado por uno de los siguientes procedimientos: eco-doppler, flebografía, gammagrafía ventilación-perfusión o angioTAC pulmonar.

momento del estudio antecedentes de enfermedad neoplásica activa, gestación o algún proceso inflamatorio-infeccioso agudo.

Número de sujetos

Se han estudiado 131 pacientes con enfermedad tromboembólica venosa y 100 sujetos sanos.

III.C VARIABLES ESTUDIADAS

Variables de identificación

- Nombre y apellido.
- Fecha de nacimiento.
- Fecha del episodio trombótico.

Variables clínicas

- Demográficas

Edad

Sexo

- Factores de riesgo adquiridos de enfermedad tromboembólica venosa

Tabaquismo.

Obesidad.

Hipercolesterolemia.

Toma de anticonceptivos orales.

Localización de la trombosis

- Trombosis venosa profunda de miembros inferiores
- Tromboembolismo pulmonar
- Trombosis venosa portal/mesentérica/suprahepática

Métodos diagnósticos de ETV

- Eco-doppler (MMII y/o abdominal)
- Flebografía
- Gammagrafía de ventilación-perfusión
- AngioTAC pulmonar

adquiridos previamente al estudio

- HBPM
- Heparina sódica

Parámetros de hemostasia

Se determinaron los siguientes parámetros de hemostasia en plasma:

- TAFI antigénico
- dímero-D

Factores de riesgo congénitos de enfermedad tromboembólica venosa

- Factor V Leiden.
- Protrombina 20210A (PT20210A).

Polimorfismos genéticos del TAFI

- Polimorfismo Alanina 147 Treonina (505A/G)
- Polimorfismo Treonina 325 Isoleucina (1040C/T)

III.D METODOLOGÍA DE LA RECOGIDA DE VARIABLES

Variables de identificación y demográficas

Fueron recogidas mediante una entrevista clínica.

Factores de riesgo adquiridos de enfermedad tromboembólica venosa

Igualmente, se utilizó la entrevista clínica a través de una encuesta epidemiológica (**Tabla 2**), para la obtención de estas variables.

Se definió la obesidad cuando el índice de masa corporal (IMC) era ≥ 30 Kg/m² en los sujetos estudiados (según criterios de la OMS). La hipercolesterolemia se definió con valores de colesterol total iguales o superiores a 200 mg/dl. Por último, se definió como fumador, al paciente que fumaba durante el episodio trombótico o lo habían hecho previamente. También se consideró fumador a todo individuo que había consumido algún tipo de tabaco, al menos durante el último mes. Se perdía esta consideración de fumador cuando el paciente llevaba diez años sin fumar.

Localización de la trombosis, Métodos diagnósticos de ETV, Medicación anticoagulante recibida.

Para la recogida de estos datos se utilizó la entrevista clínica. La encuesta epidemiológica (**Tabla2**) se realizó tanto a pacientes como a controles, citándolos telefónicamente en nuestra consulta o aprovechando la visita de control del tratamiento anticoagulante oral.

amiento anticoagulante oral, los pacientes fueron citados en nuestra Unidad. Se les suspendió dicha anticoagulación oral y se les pautó tratamiento anticoagulante con heparinas de bajo peso molecular durante 15 días. Posteriormente y una vez mantenido un ayuno mínimo de 12 horas, se les realizó una extracción de sangre de venas del antebrazo, lo más atraumática posible tras un período de reposo de unos 30 minutos y posteriormente se les pasó la encuesta epidemiológica. Se obtuvieron las siguientes muestras:

- Plasma citratado pobre en plaquetas para la realización de las pruebas de hemostasia.
- Sangre total anticoagulada con EDTA para la realización del estudio genético.

Una vez extraídas las muestras de sangre venosa, el plasma pobre en plaquetas citratado se obtuvo tras la centrifugación durante 20 minutos a 4°C y a 3200 revoluciones/minuto, siendo congelado de forma inmediata en diferentes alícuotas, para la determinación posterior de los parámetros de hemostasia.

Dímero-D

El dímero-D se determinó mediante una técnica de inmunoaglutinación, automatizada en coagulómetro STA Liatest D-DI de Diagnostica Stago (Roche Diagnostics). La cuantificación es antigénica y los valores de dímero-D considerados como normales eran ≤ 0.5 g/ml.

TAFI antigénico

Para la determinación del TAFI antigénico la técnica empleada fue un inmunoensayo de doble anticuerpo (1B1 y P4C2): $\%$ Asserachrom TAFI $^{\circledR}$ $\%$ (Diagnostica Stago, Gennevilliers, France). La característica principal de esta técnica antigénica, es su demostrada validez en cuanto a la no influencia en la determinación de los diferentes niveles de TAFI, según los diferentes genotipos que presente el paciente.

La consecuencia final de esta técnica es un análisis genotipo-independiente, a la hora de determinar el TAFI, evitando así posibles resultados artefactados.

Describimos a continuación, el procedimiento utilizado por la técnica antigénica $\%$ Asserachrom TAFI $^{\circledR}$ $\%$

Inicialmente el plasma del enfermo se diluye y se dispensa en una placa de microtitulación. En las paredes de estas microplacas se encuentra adherido un anticuerpo con afinidad para el TAFI, que reacciona con el TAFI del plasma del enfermo, quedando de esta manera unido también a las paredes de la placa, tras un período de incubación. A continuación se realizan varios lavados, eliminando todo el resto de elementos plasmáticos que no se han unido a la pared de la placa.

nombre.

- **Edad y sexo.**
 - **Localidad.**
 - **Antecedentes personales de trombosis.**
 - **Localización de la trombosis:**
 - TVP de miembros inferiores
 - TEP
 - Trombosis portal/Mesentérica/Suprahepática
 - Trombosis de senos venosos cerebrales
 - Trombosis renales
 - **Número de trombosis.**
 - **Edad de aparición.**
 - **Método diagnóstico:**
 - Gammagrafía, TAC, Eco-Doppler, Flebografía
 - **Tratamiento anticoagulante recibido previo al estudio:**
 - Anticoagulante oral
 - Heparina
-
- **Antecedentes Familiares de trombosis.**
 - **Hábitos tóxicos:**
 - Tabaco (años/paquete)
 - Alcohol (gramos)
 - Obesidad (IMC)
 - **Patología asociada:**
 - HTA (TAS >160 mmHg/ TAD>95 mmHg)
 - Hiperlipidemia (Hipercolesterolemia, Hipertrigliceridemia)
 - Patología cardíaca (miocardiopatía dilatada)
 - Neoplasia
 - Diabetes Mellitus (tipo I, II)
 - **Fármacos:**
 - Tratamiento hormonal anovulatorio
 - Tratamiento hormonal de estimulación ovárica
 - Tratamiento hormonal sustitutivo
 - Tratamiento antitrombótico activo

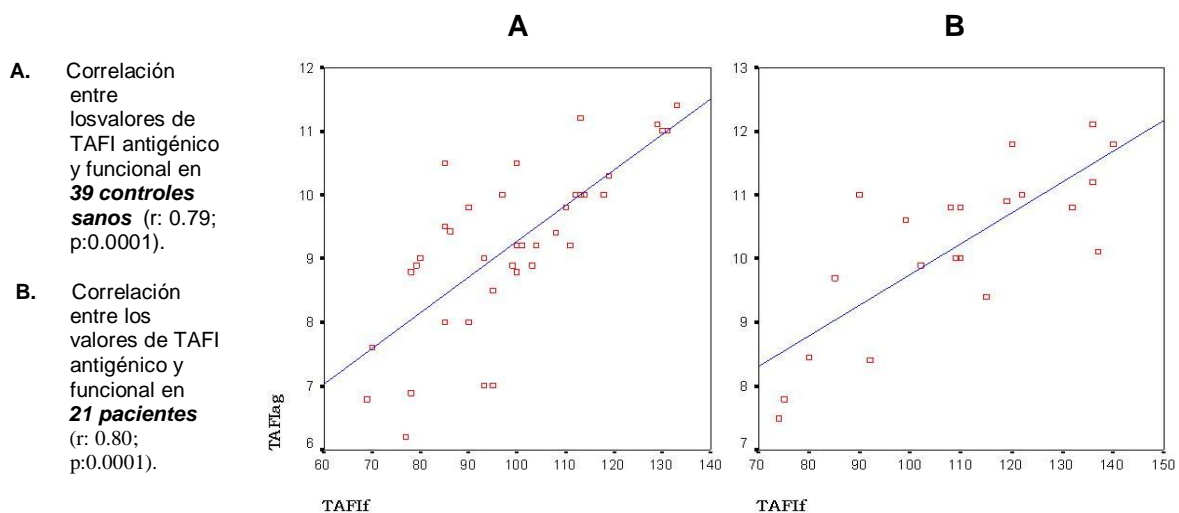
Tabla 2

lleva un segundo anticuerpo también con afinidad para el s antigénicos que quedan libres en la molécula de TAFI, y por lo tanto, se fija también a la pared de la microplaca tras otro período de incubación. El segundo anticuerpo lleva unido un enzima, en este caso la peroxidasa, que reacciona con un sustrato y que para esta técnica es la tetrametilbenzidina, produciendo un cambio de color. Se mantiene una nueva incubación en reposo de 5 minutos y se frena la reacción enzimática anterior con ácido sulfúrico 1 molar. El cambio de color producido se mide por absorbancia con un espectrofotómetro a 450 nanómetros. Una vez conocida la absorbancia de los estándares y su concentración de TAFI, se puede dibujar una curva y sobre ésta estimar el valor de TAFI de los plasmas problema.

La cuantificación del TAFI es antigénica, con niveles medios en sujetos sanos de 9.1 µg/ml. Se consideró que un paciente presentaba niveles elevados de TAFI plasmático, cuando el valor del mismo (expresado en g/ml) era \geq al p90 de los valores determinados en los controles.

Con el objeto de validar la medición de los niveles de TAFI en plasma, hemos aplicado una técnica de determinación funcional (%Stachrom TAFI, Diagnóstica Stago®, Ansnieres, France) a una muestra aleatoria de nuestros sujetos, estudiando la correlación entre los resultados de las dos técnicas. La técnica de determinación funcional %Stachrom TAFI® mide la capacidad del TAFI para activarse, al ser expuesto a un pool de trombina y trombomodulina. Una vez activado, el TAFI reacciona con el sustrato cromogénico, siendo medido por una densidad óptica de 405nm.

La correlación entre ambas técnicas (antigénica y funcional) resultó claramente positiva tanto en pacientes como en sujetos sanos. A continuación se exponen los gráficos que representan dichas relaciones:



es genéticas.

en

El test más directo para la identificación del factor V Leiden es el análisis genético, que incluye la utilización de ADN genómico como molde para la amplificación del fragmento del gen del FV que contiene la mutación, por medio de la técnica de PCR de la zona en la que se encuentra dicha mutación. Se puede detectar la presencia o ausencia de la mutación mediante restricción enzimática, uso de sondas alelo-específicas o secuenciación directa del fragmento de PCR amplificado.

Este método presenta una alta precisión y sensibilidad en la detección de individuos portadores de la mutación.

Análisis genético de la mutación 20210A en el gen de la Protrombina

El diagnóstico de laboratorio para demostrar la presencia de protrombina 20210A está basado únicamente en el análisis de DNA. La detección de esta variante alélica se realiza mediante técnicas de genética molecular, las cuales se basan en la amplificación por medio de la técnica de PCR de la zona del gen que contiene al nucleótido 20210 del gen de la protrombina, seguida de digestión por enzimas de restricción¹⁸.

Este método presenta una alta sensibilidad y precisión en la detección de individuos afectados portadores de la mutación y sanos.

Principio de la técnica (común a estas dos últimas determinaciones):

1. Obtención de DNA a partir de sangre total del paciente:

Muestra: 100 µl de sangre total fresca o congelada con EDTA.

- Lisis de hematíes.
- Separación de los leucocitos (centrifugación).
- Extracción del ADN.

2. Amplificación del gen a estudiar:

- DNA soluble.
- Mezcla de amplificación: primers específicos que llevan unidos un marcador + nucleótidos + tampón.
- Taq polimerasa.
- Termociclador.

Amplificación in vitro (PCR):

1- Se prepara la solución de trabajo de Taq polimerasa (0,2U/ul) con el buffer de dilución incluido en el kit según el nº de muestras a amplificar. 2- Se coloca el vial original de la Taq polimerasa a Tª ambiente. La concentración de la Taq Polimerasa de Qiagen es: 250U/50uL. Cada muestra usará 10uL de solución de trabajo. 3- Se precalienta el termociclador a 94°C antes de insertar los tubos. 4- Se pipetea en un tubo de amplificación: 30uL Amplificador Mix.,

DNA de la muestra o control. 5- Se colocan los tubos en y se amplifican con los ciclos correspondientes. 6- Se

guarda el DNA amplificado a 4°C o congelado a -20°C hasta el momento de la hibridación.

3. Hibridación y detección del gen (normal o mutación en microplaca):

- DNA-T: agente desnaturizante que separa las hebras de DNA.
- La sonda (oligonucleótido) de DNA complementaria al gen normal o mutado se pegarán a la base del plástico del pocillo de la microplaca.
- El gen normal se unirá a la sonda complementaria del gen normal (en un pocillo) y el gen mutado se unirá a la sonda complementaria al gen mutado (el otro pocillo).
- El conjugado, que lleva el enzima peroxidasa se unirá al marcador del gen.
- El sustrato al reaccionar con la peroxidasa se transforma en un producto de color azul.
- El color azul indica la presencia del gen.

Análisis genético de los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile del TAFI mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El volumen total de reacción es de 12.5 l. Esta cantidad incluye 100ng de DNA genómico, 4 dNTPs (cada uno con un volumen de 200 M), 3 M de MgCl₂, 0.15 M de los primers, 1 buffer para PCR y 1 unidad de Hot Start DNA polimerasa (Qiagen, Valencia, CA). Los primers utilizados para el polimorfismo Thr325Ile fueron:

-forward+5qTCTCTAGTAGCCAGTGAAGCAG-3q

-reverse+5qACATAAGGTTTCTGAGCC3q

amplificando ambos un fragmento de 88 pares de bases (pdb).

Para el polimorfismo Ala147Thr, los alelos PCR específicos precisaron 2 tipos de forward primers:

-5qTTTCTGGAAAAGAACAAG-3q 5qTTTCTGGAAAAGACAAA-3q

-reverse+5qATGGCCTATGAACCACAAGC-3q

amplificando un fragmento de 105pdb. El DNA fue sustituido por agua estéril como control negativo. El DNA fue amplificado en un primer ciclo a 95°C durante 15 minutos (min), seguido de 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos; a continuación sufre el proceso de annealing durante 30s y a 72°C durante 30s y finaliza el proceso con un ciclo de 10min a 72°C (Applied Biosystems, Foster City, CA). La temperatura de annealing para el polimorfismo Ala147Thr fue de 58°C. En el caso del polimorfismo Thr325Ile la temperatura de annealing fue de 55°C y 10 l del producto obtenido por PCR fue digerido durante 12h a 37°C con la enzima de restricción SpeI (New England Biolabs), obteniendo un fragmento de 88pdb para la variante homocigota 325Ile, dos fragmentos de 47 y 41pdb para el wild-type Thr-325 variante homocigota y tres fragmentos de 88, 47 y 41pdb para la variante heterocigota Thr325Ile. Los productos fueron separados en gel agarosa al 4% y visualizados tras teñirlos con bromuro de etidio (**Figura 13**).

Alélicas de cada polimorfismo, hemos utilizado el principio de Hardy-Weinberg en el cálculo de las mismas a partir de las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ y $p + q = 1$.

- p = frecuencia del alelo dominante en la población
- q = frecuencia del alelo recesivo en la población
- p^2 = porcentaje de individuos homocigotos dominantes
- q^2 = porcentaje de individuos recesivos dominantes
- 2pq = porcentaje de individuos heterocigotos

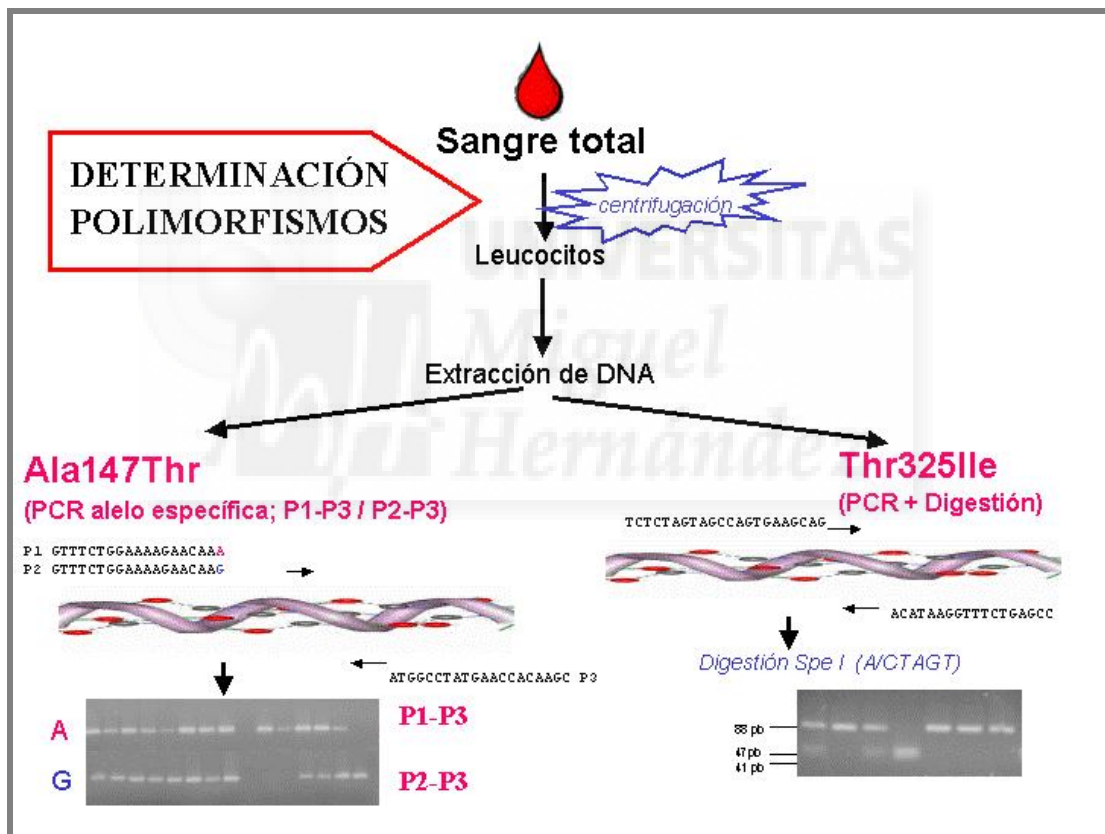


Figura 13

ESTUDIO

Variables investigadas en los pacientes

- Edad y sexo.
- Factores de riesgo de ETV: antecedentes familiares de trombosis venosa, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaquismo, obesidad, toma de anticonceptivos orales.
- Localización de la trombosis.
- Métodos diagnósticos de ETV.
- Medicación anticoagulante previa al estudio.
- Parámetro de Hemostasia: TAFI, dímero-D
- Marcadores de riesgo congénito de ETV.

2ªEtapa: Analizar la asociación entre los niveles elevados de TAFI y la presencia de ETV en los pacientes.

3ªEtapa: Analizar la asociación entre los niveles de TAFI y los diferentes polimorfismos genéticos en pacientes y en controles. Asociación de los polimorfismos genéticos con el riesgo de padecer ETV.

4ªEtapa: Análisis de la asociación entre los niveles de TAFI y los marcadores de riesgo genéticos: FVL y PT20210A.

5ªEtapa: Asociación entre los niveles de TAFI y factores de riesgo adquiridos en pacientes con ETV.

6ªEtapa: Correlación del TAFI con los niveles de dímero-D, tanto en pacientes como en controles.

III.F ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

▶▶ Para el estudio descriptivo de las variables cualitativas se utilizó la frecuencia absoluta y la frecuencia relativa en porcentajes.

▶▶ En las variables cuantitativas, se calculó su media, desviación estándar e intervalo de confianza al 95%; si la variable no seguía una distribución normal se calculó la mediana y el rango.

▶▶ Para el estudio de asociación entre variables cualitativas se utilizó la prueba de X^2 o prueba exacta de Fisher, en caso necesario. La magnitud de asociación entre las diferentes variables clínicas se expresó por medio de la odds ratio (OR). En ambos casos con intervalos

ar si los promedios de dos o más variables son diferentes
za (ANOVA).

- ▶▶ Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó la T de Student o test no paramétrico de U de Mann-Whitney, según cumplieran el ajuste a normalidad o no.
- ▶▶ Para el estudio de la asociación entre las variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de Pearson. Para su representación gráfica se utilizaron gráficas de dispersión con curva de ajuste.
- ▶▶ Para el estudio multivariante se realizó un análisis de regresión logística múltiple. Para ello se seleccionaron todas aquellas variables que fueron significativas en el estudio univariante.
- ▶▶ El nivel de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis ha sido de $p < 0.05$.
- ▶▶ Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.0[®]. Para el almacenamiento de los datos se utilizó el programa Access de Microsoft[®] y para la edición el programa Word de Microsoft[®] (Windows XP[®]).



1ª Etapa: Estudio descriptivo de las variables investigadas en los pacientes

1.1 EDAD Y SEXO

-Edad

Las edades de los pacientes y los controles se hallaban comprendidas entre los 18 y 80 años (**Figura 14**). La edad media de los pacientes fue de 56 años. En los controles la edad media fue de 55 año

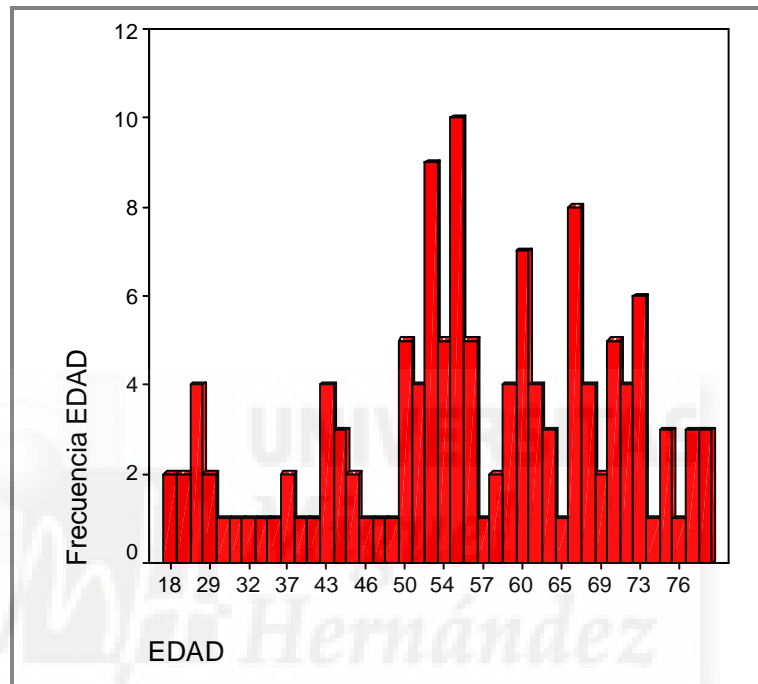


Figura 14

-Sexo

El 53% de los pacientes eran varones (70) y el 47% eran mujeres (61) (**Figura 15**).

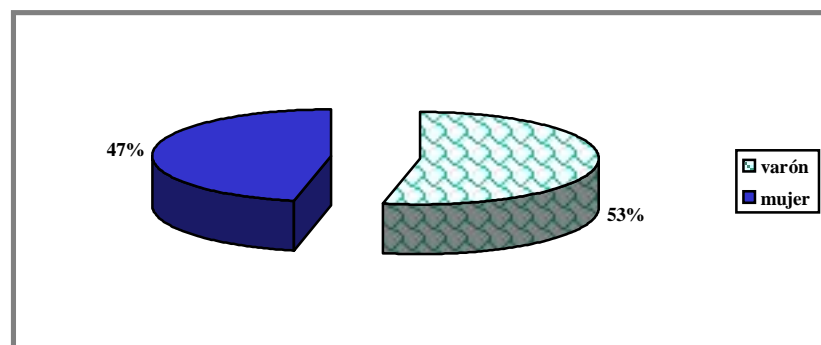


Figura 15

IRIDOS DE ETV

principales factores de riesgo adquiridos para la ETV, en los pacientes estudiados.

Factor de riesgo	Número de pacientes con factor de riesgo	% de pacientes con factor de riesgo
TABAQUISMO	29	22,1%
OBESIDAD	10	7,6%
DIABETES MELLITUS 2	6	4,6%
HIPERLIPEMIA	8	6.1%
TOMA DE ANOVULATORIOS	9	6,9%

Tabla 3

1.3 LOCALIZACIÓN DE LA TROMBOSIS VENOSA

La localización más frecuente fue a nivel poplíteo, diagnosticada en el 80% de los pacientes (105); el 18% de los pacientes presentaron un episodio de TEP (24); el 1% presentó un episodio de trombosis portal (1) y el 1% presentó un una trombosis mesentérica (1) (**Figura 16**).

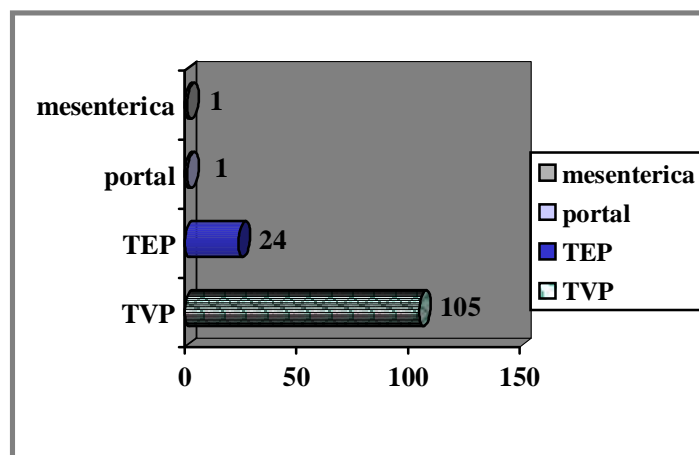


Figura 16

fueron diagnosticados mediante Eco-Doppler de MMII, el 14% por Gammagrafía pulmonar de ventilación-perfusión (19), y el resto mediante TAC torácico helicoidal, flebografía de MMII y Eco-doppler abdominal (8) (**Figura 17**).

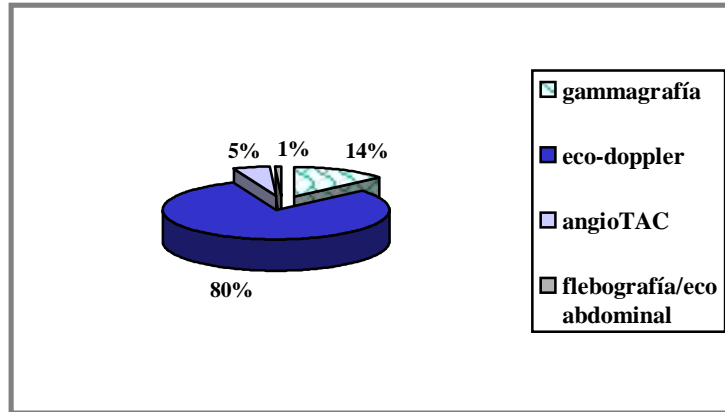


Figura 17

1.5 MEDICACIÓN ANTICOAGULANTE RECIBIDA PREVIAMENTE A LA INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO

El 88% de los pacientes habían estado en tratamiento con ACO (115) y el 12% recibió tratamiento con heparinas de bajo peso molecular (16) (**Figura 18**).

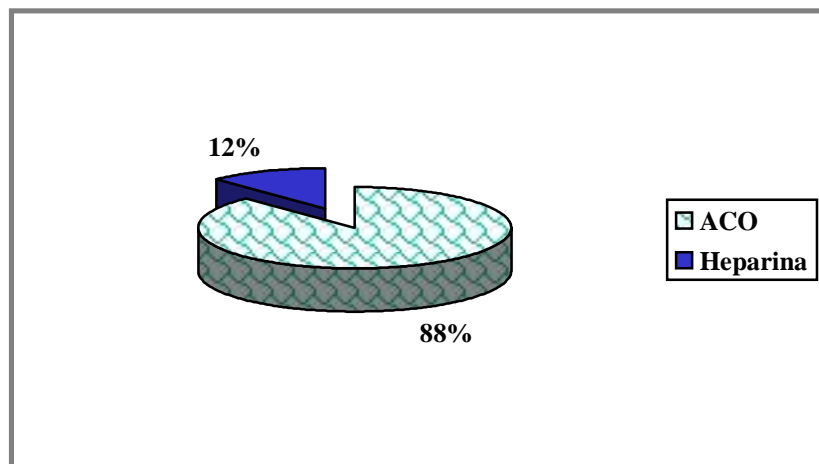


Figura 18

1.6 NIVELES ANTIGÉNICOS DE TAFI

Los pacientes presentaron unos niveles medios de TAFIag de 10.1 g/ml, con una desviación típica de 1.83. El rango fué de 6.60-17.80 g/ml. Los controles presentaron unos

ml (rango: 6.1-12.0 g/ml) En la **Figura 19** se exponen la distribución según los diferentes valores de TAFIag.

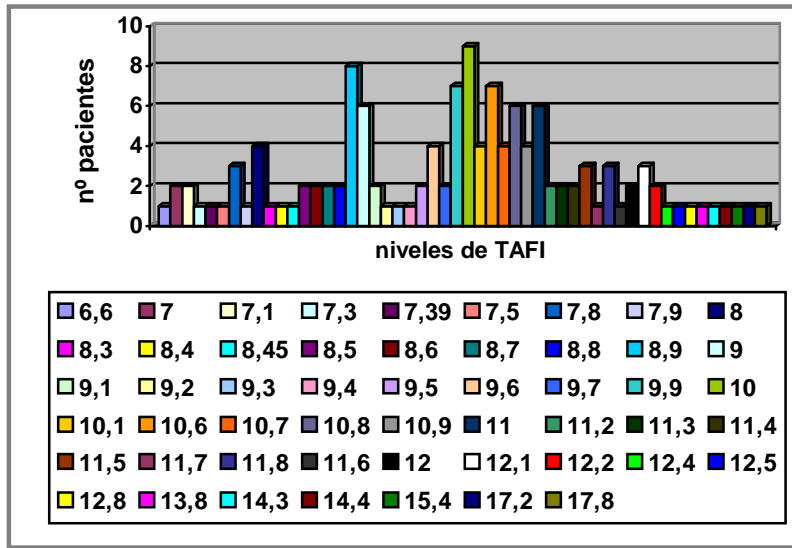


Figura 19

1.7 MARCADORES DE RIESGO GENÉTICO DE ETV

Factor V Leiden

El 12.2% de los pacientes (16) eran heterocigotos para la mutación del Factor V Leiden. El 8% de los controles (8) eran heterocigotos para dicha mutación (**Figura 20**).

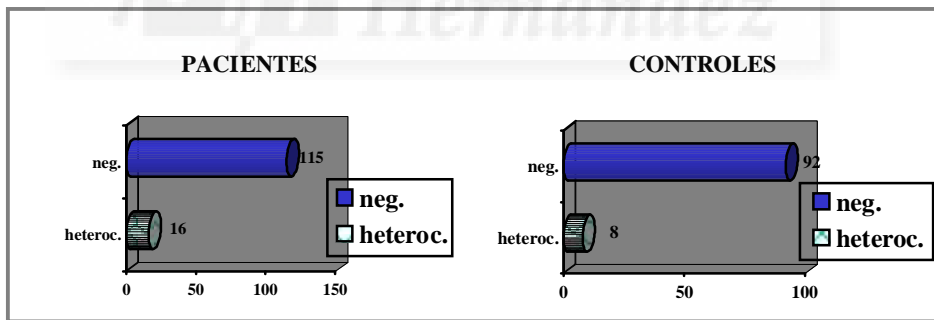


Figura 20

Protrombina 20210A

El 9.2% de los pacientes (12) y el 2% de los controles (2) eran heterocigotos para la mutación 20210A de la Protrombina (**Figura 21**).

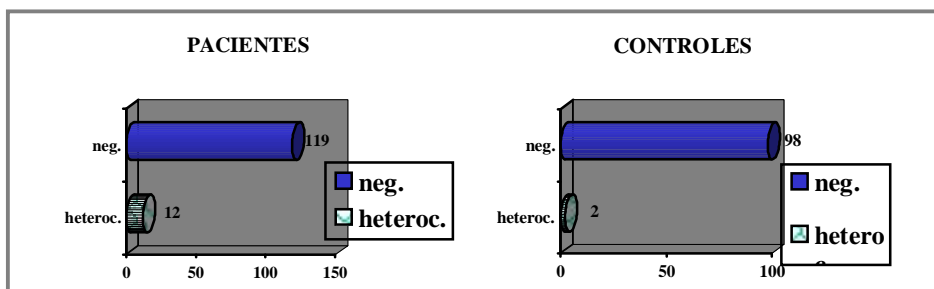


Figura 21

DEL TAFI

Polimorfismo Ala147Thr en pacientes:

El 18.3% (24) presentó el genotipo 147Thr/Thr, el 50.4% (66) el 147Thr/Ala y el resto (41), el genotipo 147Ala/Ala (**Figura 22**).

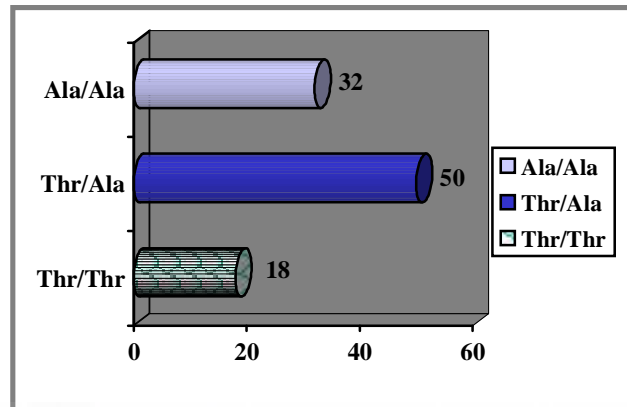


Figura 22

Polimorfismo Ala147Thr en controles:

El 20% (20) presentó el genotipo 147Thr/Thr, el 58% (58) el 147Thr/Ala y el resto (22) el genotipo 147Ala/Ala (**Figura 23**).

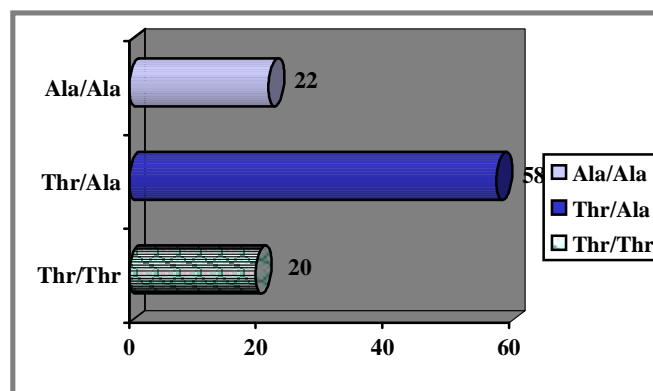


Figura 23

po Thr/Thr, el 38.2% (50) el Thr/Ile y el resto (14) el

genotipo Ile/Ile (**Figura 24**).

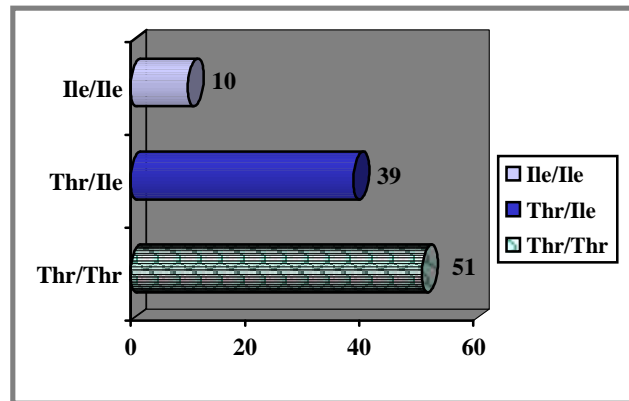


Figura 24

Polimorfismo Thr325Ile en controles:

El 33% (33) presentó el genotipo Thr/Thr, el 51% (51) el Thr/Ile y el resto (16) el genotipo Ile/Ile (**Figura 25**).

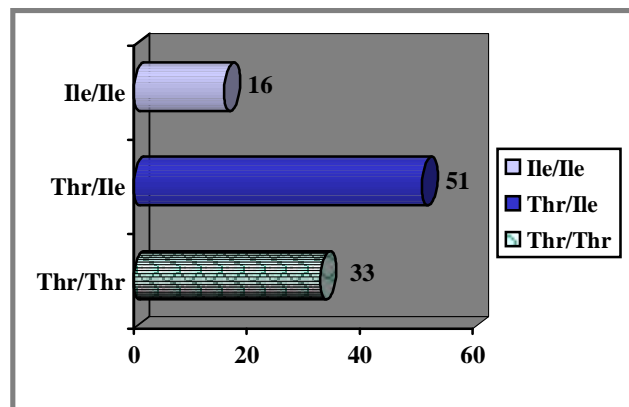


Figura 25

les de TAFI y la presencia de ETV en los pacientes.

El percentil 90 de los niveles plasmáticos de TAFI observado en los sujetos sanos correspondió a 11.0 g/ml (**Figura 26**).

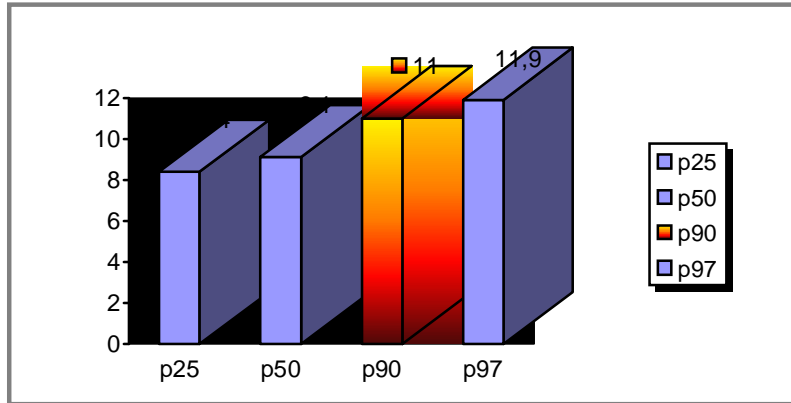


Figura 26

El porcentaje de pacientes con trombosis venosa y valores de TAFI elevados (≥ 11.0 g/ml) fué del 27.5% (36). En los controles, el 11% (11) presentó niveles elevados de TAFI plasmático. Esta diferencia fue estadísticamente significativa: $p < 0.002$ y $OR = 3.06$ (IC 95%: 1.4-6.3) (**Figura 27**)(**Tabla 4**). Cuando estos valores se ajustaron considerando la edad y el sexo, no se encontraron variaciones en el valor de la OR.

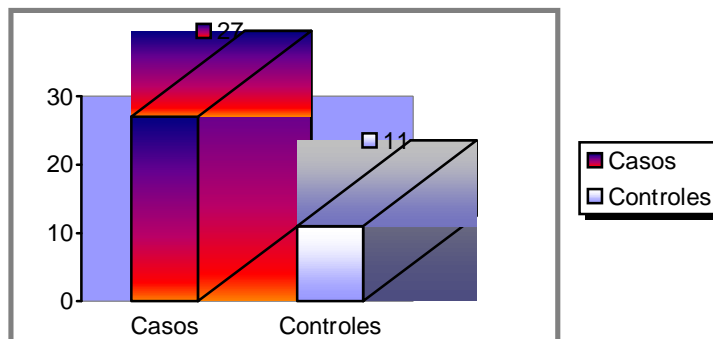


Figura 27

		CASOS	CONTROL	TOTAL
Niveles elevados de TAFI	SI	36 27%	11 11%	47 20.3%
	NO	95 72,4%	89 89,0%	184 79.7%
TOTAL		131 100,0 %	100 100,0%	231 100,0%

Tabla 4

Los niveles medios de TAFI plasmático en los pacientes fueron de 10.1 g/ml. En los controles fueron de 9.1 g/ml (**Figura 28**). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) (**Tabla 5**):

	Niveles medios TAFI	Desviación típica	Error típico de la media
Pacientes	10.17 g/ml	1.83	0.15
Controles	9.17 g/ml	1.37	0.13

Tabla 5

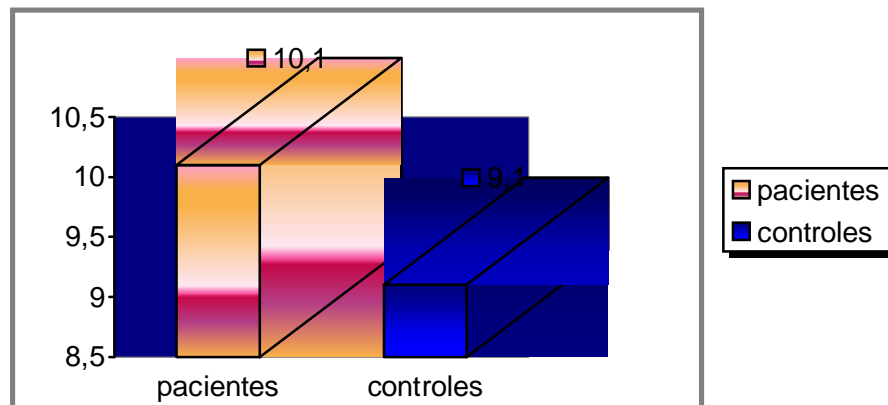


Figura 28

padecer ETV.

3.1 POLIMORFISMO ALA147THR EN PACIENTES

No encontramos diferencias significativas ($p=0.291$) entre los niveles de TAFIag y las diferentes isoformas del polimorfismo Ala147Thr (**Tabla 6**)(**Figura 29**). La frecuencia alélica Ala/Thr resultó ser de 0.59/0.41 respectivamente. Tampoco hubo diferencias entre dichos alelos y los niveles medios de TAFI. No hemos hallado en este polimorfismo, ningún genotipo que sea marcador de riesgo para ETV (**Tabla 7**).

POLIMORFISMO ALA147THR	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
147 THR/THR	10.6 g/ml	0.291
147 THR/ALA	10.1 g/ml	
147 ALA/ALA	9.9 g/ml	

Tabla 6

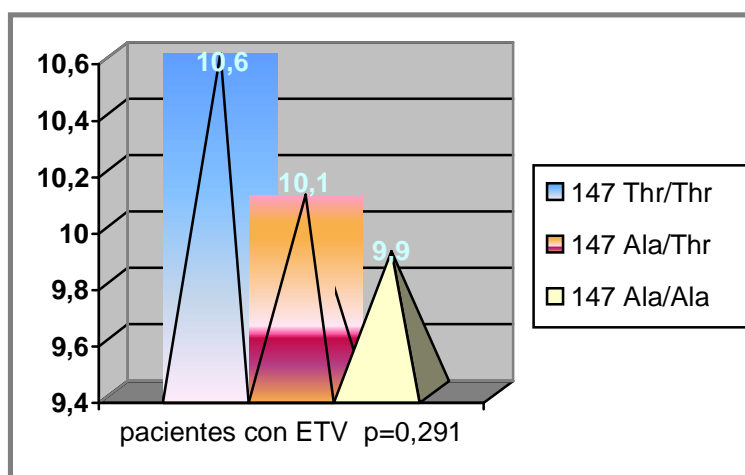


Figura 29

		Thr/Ala	Ala/Ala	TOTAL	p
CASOS	24(18.3%)	66(50.3%)	41(31.2%)	131	0.287
CONTROLES	20 (20%)	58(58%)	22(22%)	100	
TOTAL	44	124	63	231	

Tabla 7

3.2 POLIMORFISMO THR325ILE EN PACIENTES

No se han hallado tampoco diferencias significativas ($p=0.279$), entre los niveles de TAFI y las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile (**Tabla 8**)(**Figura 30**). La frecuencia alélica Ile/Thr resultó ser de 0.30/0.70 respectivamente. No hubo diferencias entre estos alelos y los niveles medios de TAFI. El genotipo 325Thr/Thr resultó estadísticamente significativo como marcador de riesgo para ETV (OR:2.1(IC 95% 1.3-3.7)) (**Tabla 9**). Al ajustar estos resultados considerando la edad y el sexo, no se encontraron variaciones en el valor de la OR.

POLIMORFISMO THR325ILE	NIVELES DE TAFI (g/ml)	p
325ILE/ILE	10.3 g/ml	0.279
325ILE/THR	9.8 g/ml	
147 THR/THR	10.3 g/ml	

Tabla 8

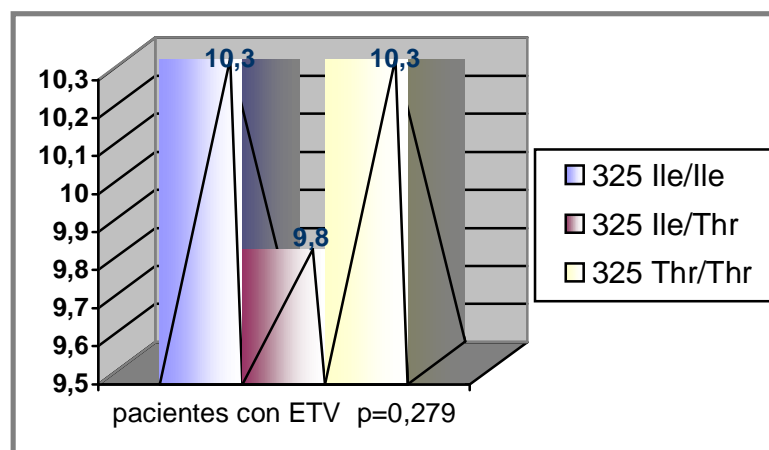


Figura 30

	Genotipo	Thr/Ile	Thr/Thr	TOTAL	p
CASOS	14(11%)	50(38%)	67(51%)	131	0.006 OR:2.1(95% IC 1.3-3.7)
CONTROLES	15(15%)	49(49%)	36(36%)	100	
TOTAL	29	102	100	231	

Tabla 9

3.3 POLIMORFISMO ALA147THR EN CONTROLES

Tampoco se han encontrado diferencias significativas en cuanto a los niveles de TAFIag y los diferentes genotipos del polimorfismo Ala147Thr, en los sujetos sanos ($p=0.264$) (**Tabla 10**)(**Figura 31**). La frecuencia alélica Ala/Thr resultó ser de 0.61/0.39 respectivamente. No hubo diferencias entre estos alelos y los niveles medios de TAFI.

POLIMORFISMO	NIVELES DE TAFI (g/ml)	p
ALA147THR		
147 THR/THR	9.3 g/ml	0.264
147 THR/ALA	8.9 g/ml	
147 ALA/ALA	9.5 g/ml	

Tabla 10

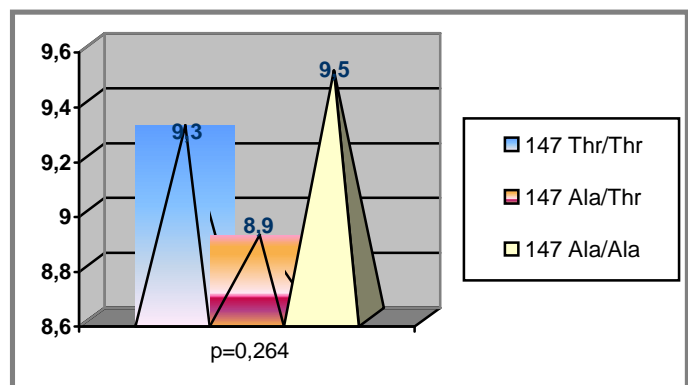


Figura 31

CONTROLES

No se encontraron diferencias significativas ($p=0.575$) en cuanto a los niveles medios de TAFI y las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile, en sujetos sanos (**Tabla 11**)(**Figura 32**). La frecuencia alélica Ile/Thr resultó ser de 0.36/0.64 respectivamente. No hubo diferencias entre estos alelos y los niveles medios de TAFI.

POLIMORFISMO THR325ILE	NIVELES DE TAFI (g/ml)	p
325ILE/ILE	9.5 g/ml	0.575
325ILE/THR	9 g/ml	
325 THR/THR	9.1 g/ml	

Tabla 11

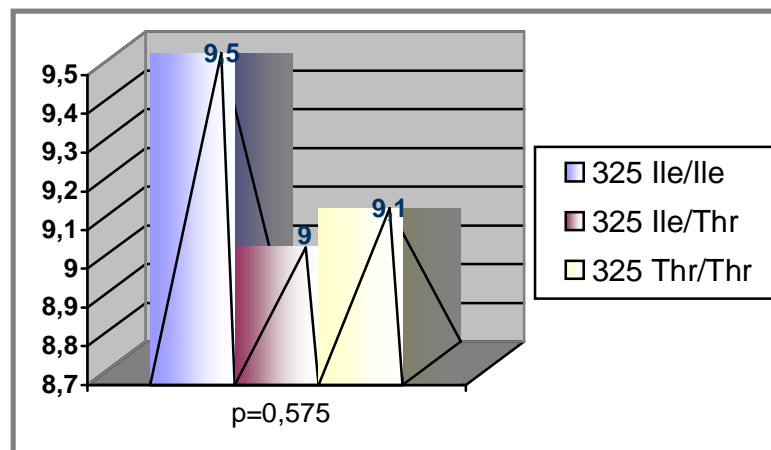


Figura 32

entre los niveles de TAFI y los marcadores de riesgo

4.1 TAFI Y FACTOR V LEIDEN

Pacientes

Quando se estudiaron los niveles medios de TAFI según la presencia o no de la mutación factor V Leiden en los pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.943$)(**Figura 33**)(**Tabla 12**).

MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
NEGATIVO (n=115)	10.15 g/ml	0.943
HETEROCIGOTO (n=16)	10.18 g/ml	

Tabla 12

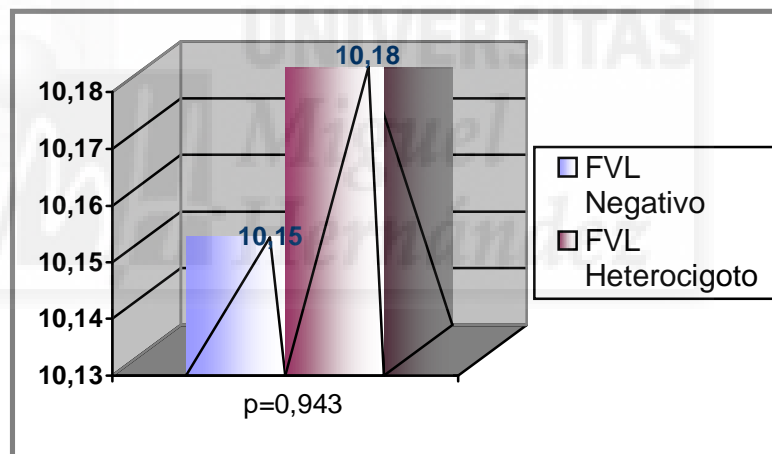


Figura 33

Controles

El estudio de los controles tampoco ofreció diferencias estadísticamente significativas ($p=0.348$)(**Figura 34**)(**Tabla 13**).

MUTACIÓN FACTOR V LEIDEN	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
NEGATIVO (n=92)	9.1 g/ml	0.943
HETEROCIGOTO (n=8)	9.6 g/ml	

Tabla 13

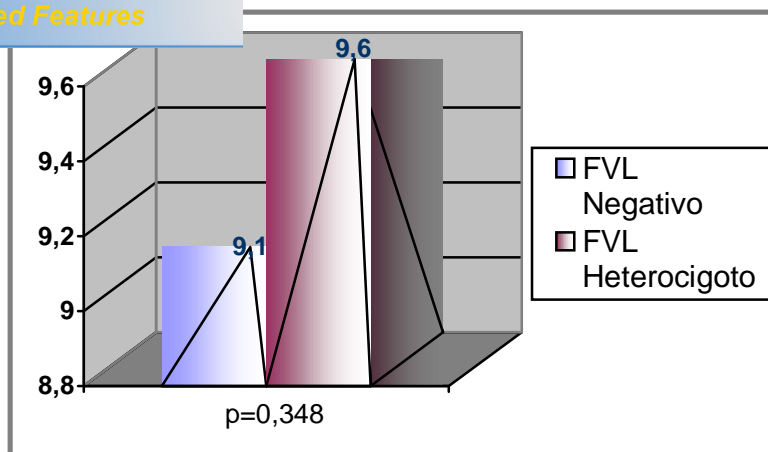


Figura 34

4.2 TAFI Y PT 20210 A

Pacientes

No hemos encontrado en los pacientes, diferencias entre los niveles medios de TAFI y el ser portador o no de la mutación de la PT20210A (p=0.146)(Figura 35)(Tabla 14).

MUTACIÓN PT20210A	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
NEGATIVO (n=118)	10.2 g/ml	0.146
HETEROCIGOTO (n=13)	9.4 g/ml	

Tabla 14

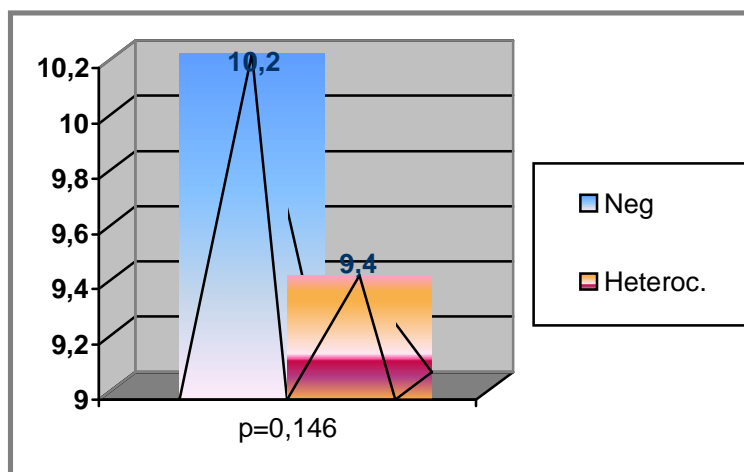


Figura 35

detectaron tampoco diferencias entre los niveles medios de TAFI y la mutación PT20210A ($p=0.792$)(**Figura 36**)(**Tabla 15**).

MUTACIÓN PT20210A	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
NEGATIVO (n=92)	9.1 g/ml	0.943
HETEROCIGOTO (n=8)	8.9 g/ml	

Tabla 15

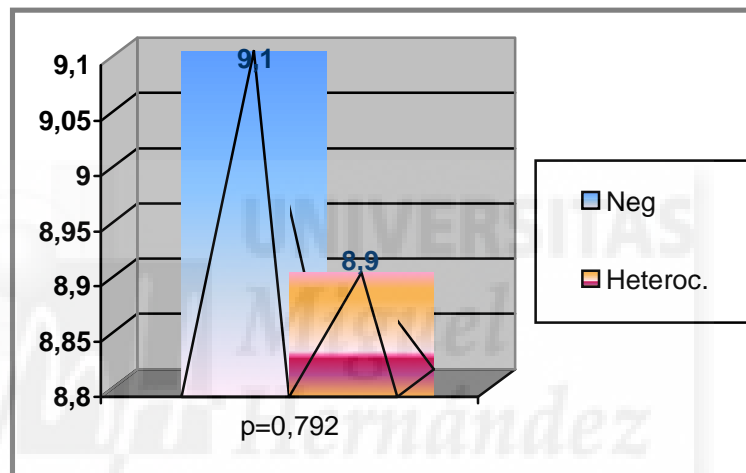


Figura 36

5ªEtapa: Correlación entre factores de riesgo adquiridos para ETV y los niveles de TAFI en pacientes y controles.

5.1 TAFI Y SEXO

Pacientes

Cuando hemos estudiado al grupo de pacientes, hemos hallado una tendencia en el límite de la significación, al determinar los niveles medios de TAFI con respecto al sexo. Las mujeres presentaban niveles de TAFI mas elevados que los varones con una $p=0.060$ (**Figura 37**)(**Tabla 16**).

SEXO	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
VARONES (n=70)	9.8 g/ml	0.060
MUJERES (n=61)	10.4 g/ml	

Tabla 16

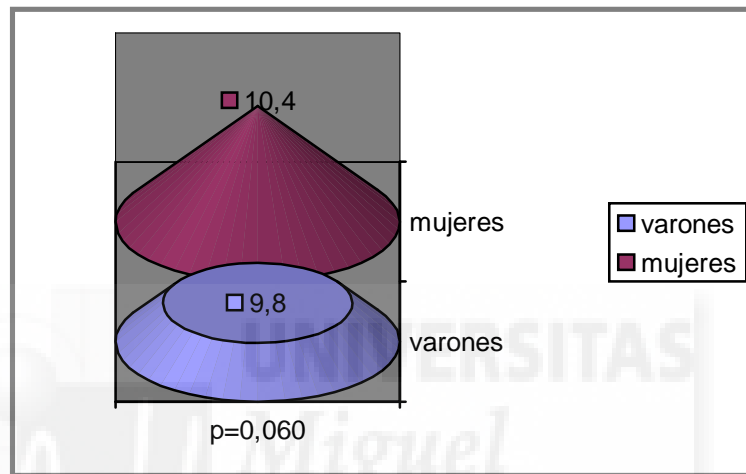


Figura 37

Controles

No hemos encontrado diferencias entre los niveles de TAFI y el sexo, en los sujetos sanos ($p=0.358$)(Figura 38)(Tabla 17).

SEXO	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
VARONES (n=60)	9.0 g/ml	0.358
MUJERES (n=40)	9.3 g/ml	

Tabla 17

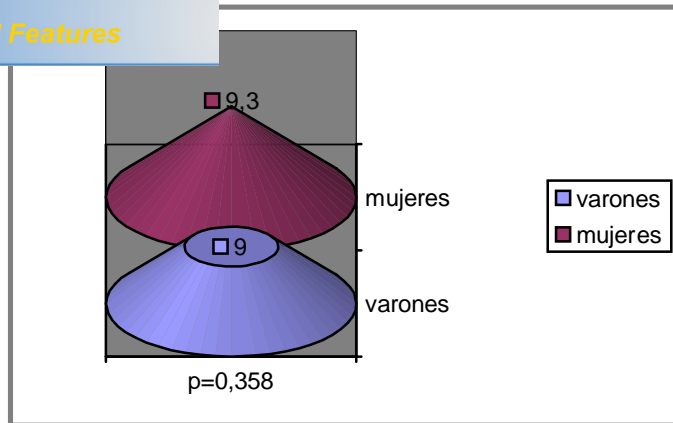


Figura 38

5.2 TAFI Y EDAD

Pacientes

No hemos encontrado diferencias significativas entre los niveles medios de TAFI y los grupos de edad estudiados en los pacientes ($p=0.195$). Si que hemos observado un aumento de los niveles de TAFI conforme aumenta la edad de los sujetos estudiados (**Figura 39**)(**Tabla 18**).

EDAD	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
18-40a (n=18)	9.6 g/ml	0.195
41-65a (n=73)	10.0 g/ml	
66-80a (n=40)	10.5 g/ml	

Tabla 18

Controles

En los sujetos controles, tampoco hemos observado diferencias significativas entre los niveles de TAFI y los grupos de edad estudiados ($p=0.222$)(**Figura 40**)(**Tabla 19**).

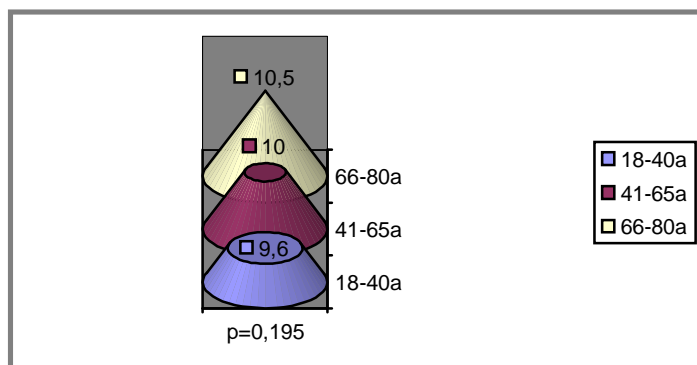


Figura 39

EDAD	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
18-40a (n=18)	9.5 g/ml	0.222
41-65a (n=50)	9.5 g/ml	
66-80a (n=32)	8.8 g/ml	

Tabla 19

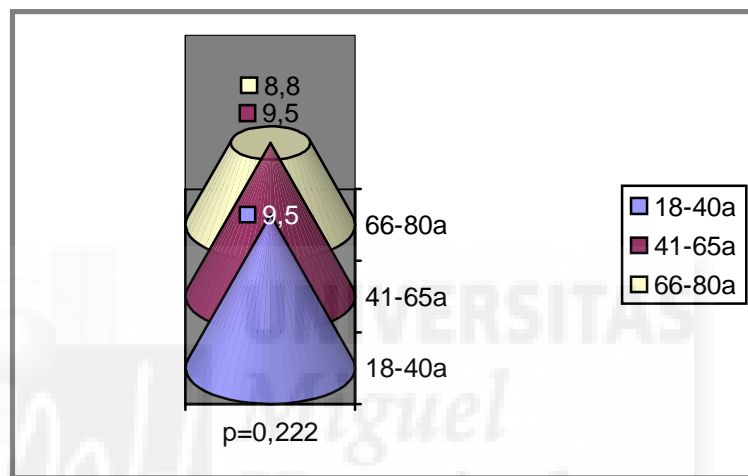


Figura 40

5.3 TAFI Y TABACO

Pacientes

En los pacientes, no hemos encontrado significación alguna al comparar los niveles medios de TAFI con el hecho de ser fumador o no ($p=0.167$)(**Figura 41**)(**Tabla 20**).

FUMADOR	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI(n=29)	9.7 g/ml	0.167
NO(n=102)	10.2 g/ml	

Tabla 20

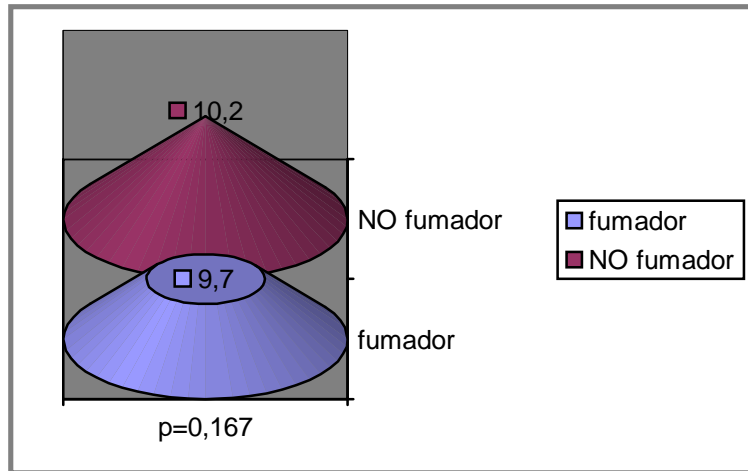


Figura 41

Controles

En los sujetos controles tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0.406$)(**Figura 42**)(**Tabla 21**).

FUMADOR	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=19)	8.9 g/ml	0.406
NO (n=81)	9.2 g/ml	

Tabla 21

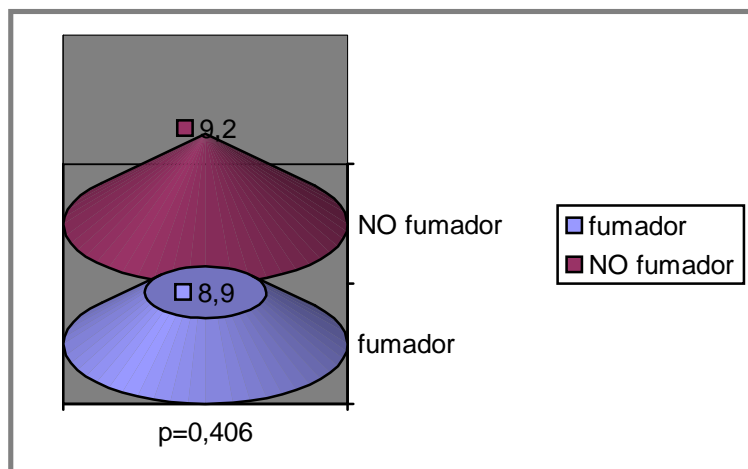


Figura 42

En los pacientes, no encontramos diferencias significativas al medir los niveles medios de TAFI, tanto en sujetos obesos como en los que no lo eran ($p=0.648$)(**Figura 43**)(**Tabla 22**).

OBESIDAD	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=10)	9.9 g/ml	0.648
NO (n=121)	10.1 g/ml	

Tabla 22

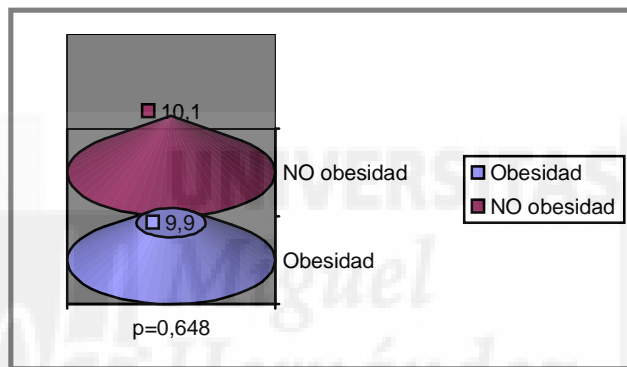


Figura 43

Controles

Si que hallamos diferencias estadísticamente significativas en los controles, ya que los sujetos obesos presentaban niveles medios de TAFIag mas elevados que los que no lo eran ($p<0.05$)(**Figura 44**)(**Tabla 23**).

OBESIDAD	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=3)	10.6 g/ml	0.05
NO (n=97)	9.1 g/ml	

Tabla 23

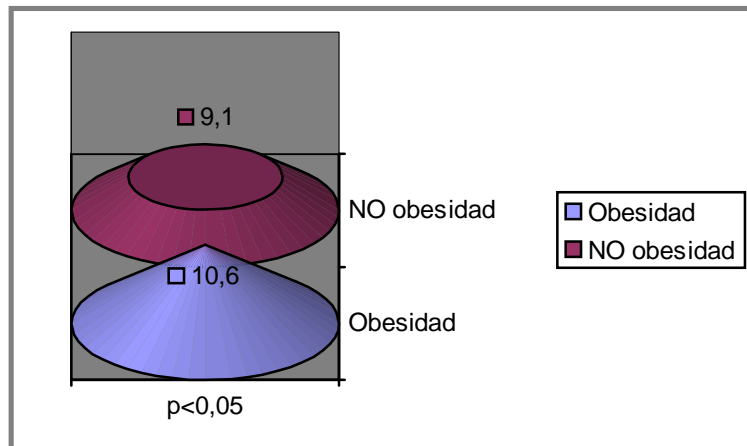


Figura 44

5.5 TAFI Y ANOVULATORIOS

Pacientes

No hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la toma de anticonceptivos orales y la elevación de los niveles medios de TAFI o no (**Figura 45**)(**Tabla 24**).

TOMA DE ANOVULATORIOS	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=9)	9.9 g/ml	0.778
NO (n=52)	10.0 g/ml	

Tabla 24

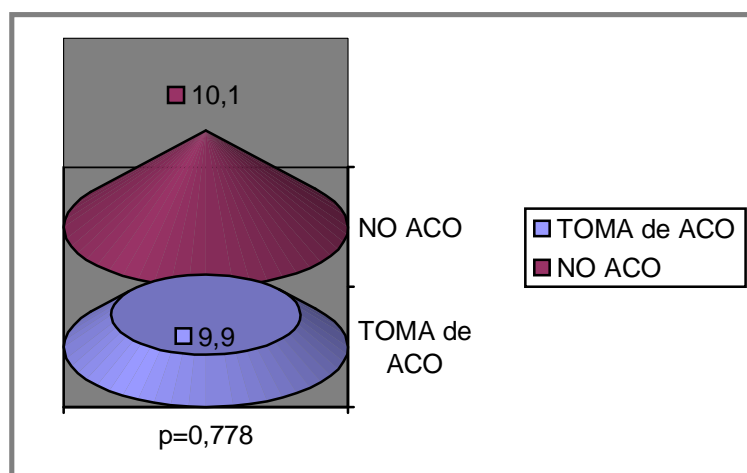


Figura 45

encias en los sujetos sanos y la toma de ACO o no (**Figura**

46)(Tabla 25).

TOMA DE ANOVULATORIOS	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=3)	10 g/ml	0.256
NO (n=37)	9.5 g/ml	

Tabla 25

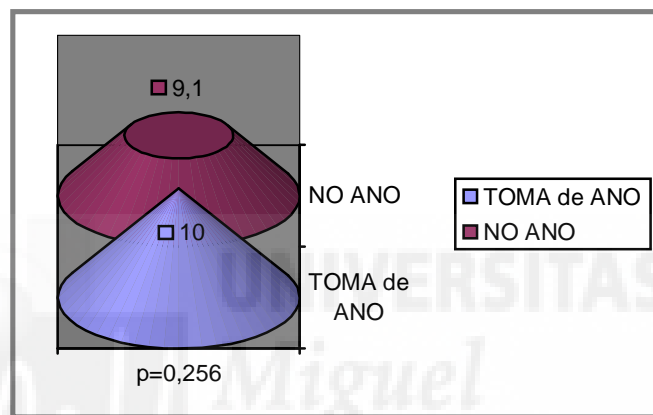


Figura 46

5.6 TAFI y DM tipo 2.

Pacientes

En los pacientes no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a los niveles medios de TAFI y padecer diabetes tipo 2 (DM tipo 2) o no ($p=0.592$)(**Figura 47)(Tabla 26)**.

DM tipo 2	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=6)	10.5 g/ml	0.592
NO (n=125)	10.1 g/ml	

Tabla 26

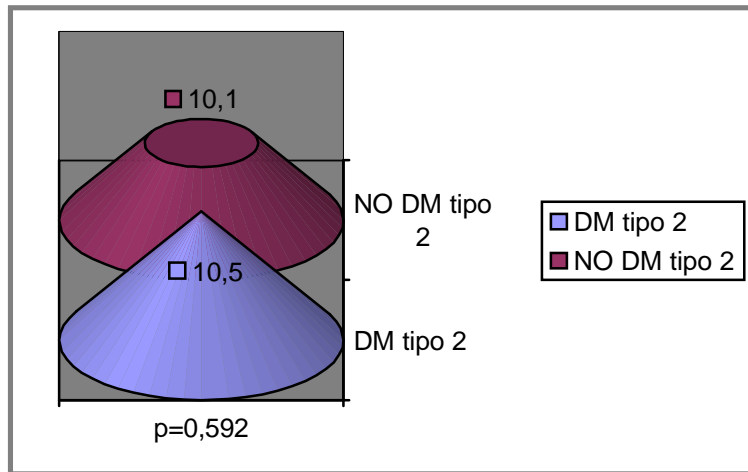


Figura 47

Controles

Tampoco encontramos diferencias en los controles ($p=0.194$) (**Figura 48**) (**Tabla 27**).

DM tipo 2	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=7)	9.8 g/ml	0.194
NO (n=93)	9.1 g/ml	

Tabla 27

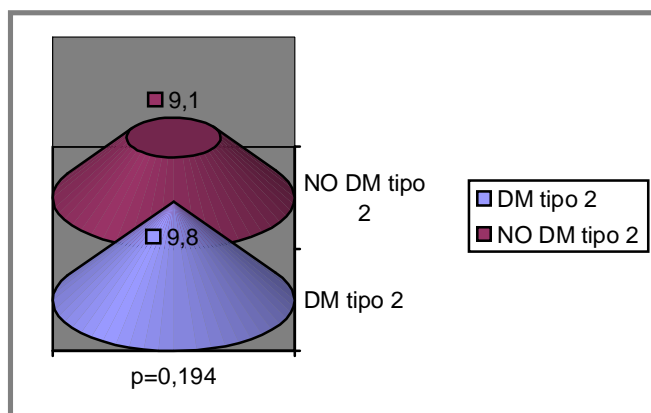


Figura 48

No hemos encontrado diferencias significativas entre los pacientes con o sin hipercolesterolemia (HCL) y los niveles de TAFI (p=0.546)(**Figura 49**)(**Tabla 28**).

HIPERCOLESTEROLEMIA	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=8)	10.5 g/ml	0.546
NO (n=123)	10.1 g/ml	

Tabla 28

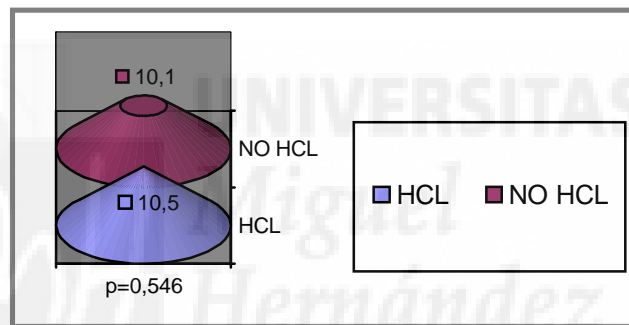


Figura 49

Controles

Sí que existían diferencias significativas entre los niveles medios de TAFI, en los sujetos sanos con o sin hipercolesterolemia (p<0.026)(**Figura 50**)(**Tabla 29**).

HIPERCOLESTEROLEMIA	NIVELES DE TAFI(g/ml)	p
SI (n=7)	10.2 g/ml	0.026
NO (n=93)	9 g/ml	

Tabla 29

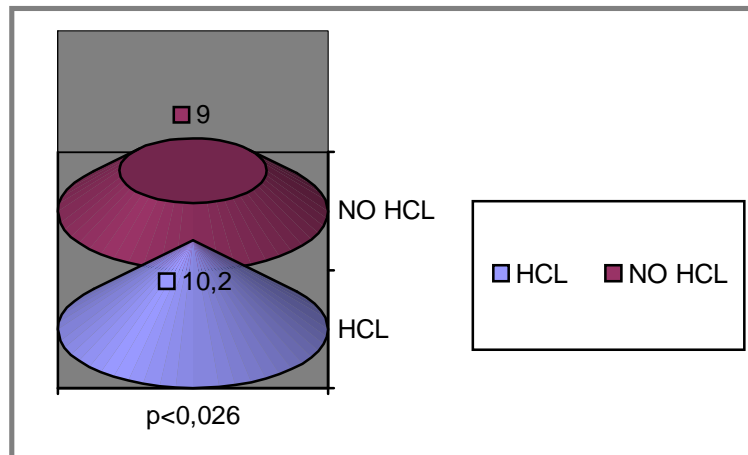


Figura 50

6ªEtapa: Correlación del TAFIag con los niveles de dímero-d, tanto en pacientes como en controles.

6.1 TAFI Y DÍMERO-D

Pacientes

No encontramos correlación estadísticamente significativa entre el dímero-d y el TAFI de los pacientes estudiados ($r=0.070$; $p=0.649$)(**Figura 51**).

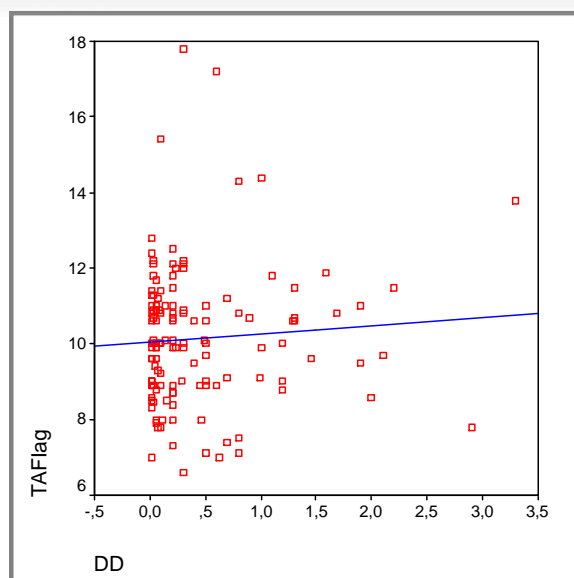


Figura 51

...e los niveles medios de TAFI y de dímero-D en los controles ($r=0.130$; $p=0.198$)(**Figura 52**).

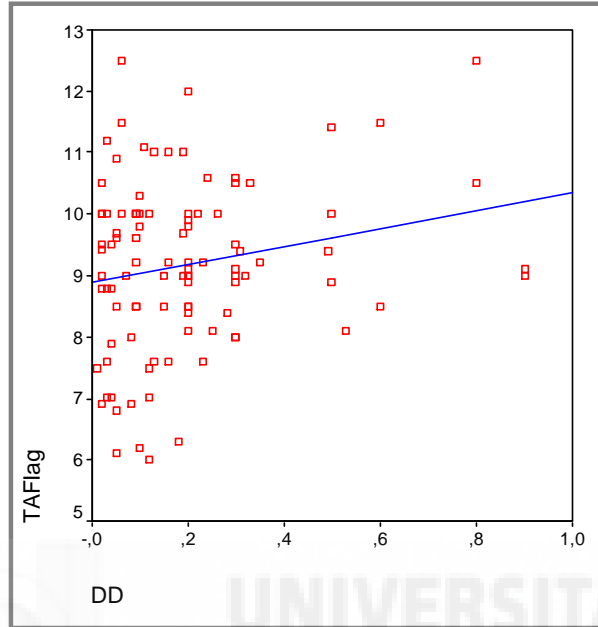


Figura 52

Los niveles plasmáticos de TAFI en sujetos sanos y en pacientes con ETV

Niveles plasmáticos de TAFI en sujetos sanos.

El nivel medio del TAFI en individuos sanos presenta gran variabilidad. La concentración media antigénica oscila entre 4-15 g/ml²¹⁴⁻²¹⁶ y sus niveles funcionales entre el 40% y 270%^{218,267}.

Chetaille y cols. analizaron los valores del TAFI en 249 sujetos, donde se objetivaron niveles entre el 41% y 259% (los resultados fueron expresados como porcentajes de los valores plasmáticos medios de un grupo control de 30 sujetos sanos). El sexo no influenciaba en la variabilidad del TAFI. Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre el TAFI y la edad en mujeres; y además, el TAFI en varones de raza caucasiana resultó significativamente más alto que el de la población masculina africana. En general se concluyó, que los niveles de TAFI fueron muy estables entre los individuos, no existiendo variaciones significativas con el ritmo circadiano²¹⁸.

En otro estudio, **Stromqvist y cols.**²¹⁷ evaluaron una serie de 479 sujetos sanos, mediante una técnica de enzimoimmunoensayo que utilizaba anticuerpos policlonales de conejo, obteniéndose unos niveles medios de TAFI en mujeres de 13.3 g/ml y unos niveles medios en varones de 13.4 g/ml. La distribución del TAFI según diferentes grupos de edad mostró niveles de TAFI significativamente mayores en las mujeres con edades comprendidas entre 30-39 años. En los varones no se mostraron diferencias significativas en cuanto a la edad. Tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo.

En nuestro estudio, al utilizar una técnica antigénica más específica para medir los niveles de TAFI plasmático (Asserachrom TAFI[®]), hemos tenido ciertas dificultades a la hora de comparar nuestros resultados con algunos de los trabajos científicos publicados recientemente. Estos inconvenientes radican en que la mayoría de los estudios han desarrollado técnicas de determinación funcional o antigénica diferentes a la nuestra, que varían tanto en la metodología de laboratorio como en las unidades de medida utilizadas para expresar los resultados. Nosotros hemos aplicado una técnica antigénica que ha demostrado ser genotipo-independiente. Esta técnica utiliza un panel de anticuerpos policlonales (anti-TAFI-1B1 y P4C2) que ha evidenciado en sujetos sanos, que los niveles de TAFI no varían en función los diferentes genotipos (polimorfismos genéticos Ala147Thr y/o Thr325Ile)²⁶⁸.

Los valores medios del TAFI determinados en nuestros controles fueron de 9.1 g/ml (6.0-12.5 g/ml). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de **Frere y cols.**, donde se determinaron los niveles medios de TAFI mediante 2 técnicas antigénicas (STA-Stachrom TAFI[®] y Asserachrom TAFI[®]) en 86 pacientes con infarto de miocardio y en 123 controles sanos. En este estudio la técnica STA-Stachrom TAFI[®] mostró unos niveles entre 6.1 y 14.1 g/ml, y la técnica Asserachrom TAFI[®] (la misma utilizada en nuestro estudio)

l. El valor máximo obtenido por **Frere y cols.** utilizando las medidas de este estudio fueron realizadas en el grupo total de sujetos (pacientes y controles)²³³.

Niveles plasmáticos de TAFI en pacientes con ETV

Numerosos estudios, han puesto de manifiesto el papel del TAFI como factor de riesgo para desarrollar enfermedades con una elevada morbimortalidad, como la cardiopatía isquémica, las enfermedades cerebrovasculares o ciertas enfermedades infecciosas^{237,254,255,263,269}. Más escasos, son los estudios que relacionan el TAFI con la ETV. Recientemente, **Van Tilburg y cols.** en un estudio de casos y controles que incluía a 474 pacientes (*Leiden Thrombophilia Study*) y 474 sujetos sanos pareados en edad y sexo, encontraron un incremento del riesgo de padecer trombosis venosa profunda de aproximadamente 2 veces superior (OR:2.0), en pacientes con niveles de TAFI ≥ 122 U/dl (percentil 90th de los sujetos sanos). La técnica de determinación antigénica usada en este estudio, fue desarrollada por los propios autores y era distinta a la aplicada en nuestro estudio. Las pacientes que tomaron contraceptivos orales en este estudio también presentaron concentraciones de TAFI más elevadas que las que no los recibieron. Tampoco se observó asociación entre los pacientes portadores de la mutación factor V Leiden y los niveles elevados de TAFI plasmático. No se estudiaron los polimorfismos genéticos del TAFI y su relación con la ETV. En nuestro estudio no hemos hallado asociación entre los niveles de TAFI y la toma de anticonceptivos orales en mujeres, el ser portador del FVL y/o presentar la mutación PT20210A²¹⁶.

En otro estudio multicéntrico de cohortes prospectivo, se evaluaron a 600 pacientes con un primer episodio de tromboembolismo venoso, intentando establecer la influencia de los niveles de TAFI en el riesgo de recurrencia de dicha patología. Se observó que existía una asociación entre la presencia de niveles elevados de TAFI plasmático (percentil 75th o >) y la recurrencia de la ETV en los pacientes. Así mismo, los pacientes con niveles elevados de TAFI presentaban niveles elevados de factores XI, VIII y IX. Estos hallazgos también se relacionaban con un alto riesgo de recurrencia de la enfermedad tromboembólica. No se estudiaron factores de riesgo genéticos. En este trabajo tampoco se estudiaron los polimorfismos genéticos del TAFI, por lo que no hemos podido contrastar dichas variables con los datos de nuestro estudio²⁴⁷.

En un tercer estudio, **Shroeder y cols.** investigaron la relación entre los niveles de TAFI plasmático y algunos parámetros que evalúan el estado de coagulación y fibrinólisis plasmática, en pacientes con tromboembolismo pulmonar. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TAFI de los pacientes (TEP) y los sujetos controles. En ambos grupos, los niveles de TAFI no se correlacionaban con el dímero-D, fibrinógeno o la proteína C, respectivamente. La edad y el sexo no influenciaban tampoco en los niveles antigénicos de TAFI. Tampoco existían diferencias entre los pacientes con TEP y

en TVP. En nuestro estudio, tampoco hemos encontrado diferencias significativas cuando hemos valorado este último aspecto. Sin embargo, en el trabajo de **Shroeder**, si que se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con TEP masivos y los pacientes con TEP menos oclusivos (con niveles mas altos de TAFI en los primeros)²²¹.

En nuestra serie hemos encontrado resultados muy similares a los trabajos de **Van Tilburg y Eichinger**^{216,247}. El 27.5% de nuestros pacientes presentaba niveles elevados de TAFI (TAFI > 11.0 g/ml). Tan sólo el 11% de los sujetos sanos tenían elevados estos niveles. Estas diferencias eran significativas ($p < 0.002$) y la estimación del riesgo (OR) fue de 3.06. Cuando determinamos si existían diferencias entre los niveles medios de TAFI de los casos y de los controles, estos eran mas elevados en los pacientes con ETV que en los controles ($p < 0.0001$). Por lo tanto, pese a determinar los niveles de TAFI mediante una técnica antigénica diferente (que recientemente ha demostrado ser polimorfismo-independiente^{233,268}, y en este sentido, mas segura que otras técnicas antigénicas utilizadas en otras series), nuestro trabajo pone de nuevo en evidencia que los niveles elevados de esta proteína constituyen un factor de riesgo en pacientes que han sufrido ETV. No pudimos contrastar nuestros resultados con ningún estudio español, al ser la nuestra, la primera comunicación de estas características.

Cuando se han analizado los niveles de TAFI en otras patologías, los resultados son algo más controvertidos; **Segev y cols.** observaron, que pacientes con cardiopatía isquémica sometidos a tratamiento con angioplastia y que además presentaban niveles descendidos de TAFI, sufrían una disminución de los niveles de reestenosis tras dichos procedimientos²⁷⁰. En el estudio *PRIME (Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction)*, se determinaron los valores medios de TAFI en pacientes con antecedentes de cardiopatía isquémica y en sujetos controles de varios países. En el estudio Francés, los pacientes presentaban unos niveles medios de TAFI de 12.75 g/ml y los controles de 12.83 g/ml. Los pacientes del Norte de Irlanda, presentaban unos niveles de 13.1 g/ml y los controles de 12.99 g/ml. No se encontró asociación entre los niveles elevados de TAFI y los eventos cardiovasculares investigados²³⁷. Estos últimos resultados sí que hemos podido compararlos con los obtenidos en nuestra serie, ya que la técnica antigénica utilizada para medir el TAFI plasmático en ambos estudios fue la misma (Asserachrom TAFI[®]). En nuestro grupo de pacientes obtuvimos unos valores medios de TAFI de 10.1 g/ml (6.6-17.8 g/ml), que son muy similares a los descritos en este trabajo. En cualquier caso, deberíamos ser prudentes a la hora de contrastar estos resultados, ya que estamos comparando dos patologías diferentes en cuanto a la fisiopatología y etiopatogenia de la trombosis (tromboembolia arterial y tromboembolia venosa).

hemos observar al comparar los resultados de todos los trabajos, es la gran variabilidad de los niveles de TAFI según el origen geográfico de los sujetos estudiados, que se hace más evidente cuando comparamos series de pacientes que presentan una mayor distancia geográfica. Este aspecto puede ser controvertido, ya que, para valorar realmente si existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TAFI de pacientes situados en diferentes localizaciones geográficas, necesitaríamos estudiar estos niveles con la misma técnica antigénica y/o funcional; y como hemos apreciado anteriormente existen multitud de técnicas de determinación tanto antigénicas como funcionales.

Otro importante trabajo es el estudio *HIFMECH (Hypercoagulability and Impaired Fibrinolytic function MECHANisms predisposing to Myocardial Infarction study)*, donde se comparaban los resultados de 598 pacientes que presentaron infarto de miocardio y 653 sujetos sanos; y donde se observó que los niveles elevados de TAFI actuaban como factor protector de Infarto de Miocardio²⁷¹. De nuevo, no pudimos contrastar nuestros niveles de TAFI con los de este trabajo, ya que la técnica de análisis fue distinta.

Por lo tanto, con respecto a otras enfermedades vasculares, el significado de los niveles de TAFI es aún desconocido, y no ofrece resultados tan concluyentes como los descritos en la Enfermedad Tromboembólica Venosa.

V.B Estudio de los polimorfismos genéticos Ala147Thr y Thr325Ile

Se han descrito numerosos polimorfismos genéticos relacionados con el gen que codifica la proteína TAFI, intentando establecer conexiones entre dichos polimorfismos y su predisposición a conformar enfermedad tromboembólica venosa o a relacionarse con niveles elevados de esta proteína; en nuestro país, no existe ningún estudio que aclare la relación existente entre los niveles de TAFI, sus polimorfismos genéticos y la ETV, siendo nuestro trabajo el primero en valorar si hay o no alguna asociación.

Distribución genotípica (Ala147Thr y Thr325Ile) en pacientes y controles

En la literatura científica, ningún genotipo se ha asociado claramente con esta enfermedad. Sin embargo, más numerosos son los estudios que revisan estas variables en pacientes con Cardiopatía Isquémica, aunque no existen conclusiones definitivas al respecto.

-Polimorfismo Ala147Thr

La distribución del polimorfismo Ala147Thr en nuestros pacientes fue de: 18.3% para el genotipo 147Thr/Thr, 50.4% 147Thr/Ala y 31.3% 147Ala/Ala. En los controles, obtuvimos unos resultados muy similares: 20% para el genotipo 147Thr/Thr, 58% para el 147Thr/Ala y 22% para 147Ala/Ala. Se respetan las frecuencias en cuanto a las isoformas del polimorfismo se refiere, tanto en pacientes como en controles y no objetivamos ninguna asociación entre

ollar ETV. Esta distribución del polimorfismo Ala147Thr a en otros países europeos como Francia e Irlanda del Norte, en el estudio *PRIME*²³⁷. La frecuencia alélica Ala/Thr determinada en nuestra serie resultó similar a la mostrada en otros estudios, sobre todo europeos^{237,272}. En el estudio *HIFMECH* realizado en varios hospitales europeos también se obtuvieron porcentajes similares de las isoformas de este polimorfismo²³³. Sin embargo, en un estudio Japonés donde se evaluó el riesgo de padecer Enfermedad Cerebrovascular Isquémica y su asociación con los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile, los porcentajes variaban siendo el genotipo Ala/Ala el mas frecuente y el Thr/Thr el menos frecuente²⁵³; no existiendo tampoco asociación de ningún genotipo del polimorfismo Ala147Thr, con el riesgo de padecer infarto cerebral en los pacientes estudiados. Las diferencias existentes entre la distribución genotípica de algunos pacientes, pueden estar relacionadas con la procedencia de la población observada (occidental, anglosajona, asiática), ya que probablemente existan variaciones genéticas que condicionen este fenómeno.

Uno de los pocos estudios realizados en pacientes con ETV, ha valorado recientemente²³⁸ la posible relación entre diferentes polimorfismos del gen TAFI (-438 G/A, Thr325Ile y Ala147Thr) y la ETV. En este estudio, los autores han aplicado un ELISA polimorfismo independiente²¹⁶ para determinar los niveles antigénicos de TAFI, y la población estudiada pertenecía al conocido trabajo *Leiden Thrombophilia Study*. Cabe destacar que el alelo 147Ala (perteneciente al polimorfismo Ala147Thr) estaba relacionado con un incremento de probabilidad de padecer ETV, siendo los niveles antigénicos de este alelo más bajos que el resto de alelos para ese polimorfismo. Por otro lado, el genotipo 147Thr/Thr presentaba niveles de TAFI mas elevados que los otros dos genotipos (147Thr/Ile y 147Ile/Ile) en los sujetos estudiados. Este resultado era similar al de **Brouwers y cols.**^{230,256}.

Nosotros no hemos objetivado alguna asociación entre los alelos de los dos polimorfismos estudiados y la ETV. Pensamos que resulta difícil comparar nuestros resultados con los de éste último trabajo, ya que se han utilizado diferentes técnicas de laboratorio para determinar el TAFI, así como para el análisis genómico. Por otro lado, ya hemos comentado que las diferencias genotípicas y fenotípicas de los sujetos estudiados pueden conllevar una influencia significativa en el análisis final de los resultados.

-Polimorfismo Thr325Ile

En los sujetos sanos el genotipo mas frecuente fue el 325Thr/Ile (49%) y el menos frecuente el 325Ile/Ile (15%). El 36% de los sujetos sanos presentó el genotipo 325Thr/Thr. La frecuencia alélica Ile/Thr resultó de nuevo similar a la registrada en otros trabajos, pese a la diferencia conocida entre grupos raciales y étnicos^{237,272}. La distribución en los pacientes de nuestro estudio fué del 10.7% para el genotipo 325Ile/Ile, 38.2% para el 325Thr/Ile y 51.1%

sultados, encontramos que el genotipo 325Thr/Thr se go para padecer ETV, ya que las diferencias entre el porcentaje de este genotipo en los pacientes y los controles, eran estadísticamente significativas ($p=0.006$) y ofrecían una OR de 2.1 (1.2-3.6). No existía asociación entre alguno de los dos alelos de este polimorfismo y el riesgo de ETV. A continuación hemos discutido los estudios más interesantes a este respecto, incluyendo los resultados en otras enfermedades vasculares, para obtener una visión más global del tema.

Al igual que para el polimorfismo Ala147Thr, en el estudio *HIFMECH*²³³ y en otro estudio Japonés²⁵³, no se encontraron diferencias entre los diferentes genotipos del polimorfismo Thr325Ile, tanto en pacientes como en controles. Un estudio realizado en Canadá, presentó la isoforma 325Thr/Ile como la más frecuente en la distribución del polimorfismo, demostrando de nuevo la variabilidad genotípica entre individuos de diferente localización geográfica²⁷⁰. Además, en este estudio se demostró que el genotipo 325Ile/Ile presentaba niveles más bajos de TAFI y se asociaba a una menor tasa de reestenosis de los catéteres coronarios percutáneos. En nuestro estudio, el genotipo 325Ile/Thr fué el que presentó niveles más bajos de TAFI, aunque no existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión clínica.

Otro trabajo que también presentó resultados discordantes a los nuestros, fue el de **Morange y cols.**²³⁷, donde no se encontró asociación entre el ser portador del polimorfismo Thr325Ile y el riesgo de presentar Cardiopatía Isquémica. Hay que significar que deberíamos tener cierta precaución al valorar estos estudios, ya que estamos comparando pacientes con diferentes patologías.

Leebeek y cols. estudiaron, entre otros parámetros, la posible relación entre los diferentes genotipos del polimorfismo Thr325Ile y el riesgo de presentar un primer episodio de isquemia cerebral aguda en 124 pacientes. De los 3 genotipos estudiados, el 325Ile/Ile presentó un aumento del riesgo con una OR de 1.39 (0.62-3.13; 95%CI)²⁷². Como se puede observar, este genotipo (325Ile/Ile) había dado resultados diferentes en pacientes con cardiopatía isquémica²⁷⁰, demostrando la gran variabilidad de resultados y siendo difícil extraer conclusiones definitivas.

En España no existen datos hasta el momento, de la distribución de los genotipos de los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile en pacientes con Enfermedad Tromboembólica Venosa, siendo nuestro estudio el primero en analizar este aspecto. Además, esta gran diversidad en cuanto al porcentaje de genotipos estudiados según los diferentes trabajos y su asociación o no a patología tromboembólica venosa, pone de manifiesto la necesidad de evaluar más a fondo esta relación, mediante trabajos con un número elevado de sujetos y aplicando técnicas polimorfismo-independientes como la utilizada en nuestra serie.

cos de TAFI y los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile

325Ile están situados en la región codificante del gen del TAFI, y han sido objeto de numerosos estudios valorando su distribución genotípica, su importancia como marcadores de riesgo para enfermedades vasculares y/o su posible relación con los niveles plasmáticos de TAFI.

Una vez agrupados los pacientes y los controles según los diferentes genotipos, no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de TAFI de cada grupo. Este hallazgo fue recientemente corroborado por **Frere y cols**²³³, al demostrar cierta ~~polimorfismo-independencia~~ en dos técnicas de determinación de TAFI. Sin embargo, otros estudios han relacionado la presencia de ciertas isoformas de algunos polimorfismos, con niveles elevados de TAFI. Así, **Rendrik y cols.** describieron 7 nuevos polimorfismos en la región promotora del gen TAFI: -152A/G, -438A/G, -530C/T, -1053C/T, -1102T/G, -690G/A y -1925T/C, observando que cinco de los siete polimorfismos, estaban localizados en regiones muy cercanas a lugares de transcripción de muchos de los factores de la coagulación. Algunos polimorfismos fueron relacionados con los niveles de TAFI antigénico, encontrándose que los niveles de TAFI en plasma fueron mayores en los genotipos 438GG/-1053CC/-1102GG y -1690AA homocigotos. Además, los polimorfismos en las posiciones -152 y -438 podrían asociarse con un descenso del riesgo de trombosis venosa profunda, especialmente en personas jóvenes⁷¹. Nuestro trabajo no evaluaba ninguno de estos polimorfismos, por lo que no pudimos comparar los resultados.

En otra comunicación, **Segev y cols.**, realizaron un ensayo prospectivo a 159 pacientes que presentaban cardiopatía isquémica (angina estable), concluyendo que los niveles antigénicos de TAFI en plasma estaban genéticamente controlados, ya que el genotipo 325Ile/Ile del polimorfismo Thr325Ile del gen del TAFI estaba asociado a niveles de TAFI antigénico mas disminuidos²⁷⁰. No hemos observado este resultado en nuestros pacientes, ya que nuestra técnica antigénica no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de TAFI y los diferentes genotipos del polimorfismo Thr325Ile. Muchos de los trabajos publicados en la literatura utilizan técnicas antigénicas que no han demostrado ser claramente genotipo-independientes, con el consiguiente riesgo de que los resultados puedan quedar artefactados, como ya explicaban **Gils y cols.** en su estudio²³¹. Estas variabilidades serían debidas a la utilización de paneles de anticuerpos, que influenciarían en los resultados de las técnicas utilizadas, dando falsas determinaciones antigénicas en función de la presencia o no de algún genotipo específico²³².

Otros autores han demostrado, que los niveles circulantes de TAFI se encontraban elevados en los polimorfismos: +1542G/A asociado con Ala147Thr, T+1583A o -23452G/1G. Nuestro estudio tampoco demostró niveles de TAFI significativamente diferentes según los diferentes genotipos del polimorfismo Ala147Thr. En otra serie, se

En la posición 325 corresponde a diferencias sustanciales en las propiedades antifibrinolíticas del TAFI²³⁴. La posición Ile-325 aumenta la vida media del TAFI de 8 a 15 minutos a 37°C, a pesar del residuo que existe en la posición 147. Así mismo, Ile-325 exhibe un efecto antifibrinolítico que es un 60% más potente que la variante Thr-325. No hemos podido aplicar estas pruebas que evalúan el nivel de funcionalidad del TAFI a todos los individuos de nuestra serie, al no disponer de las técnicas y medios necesarios para su desarrollo, en el momento del estudio. Sí que pudimos estudiar %a posteriori+, a una muestra aleatoria de pacientes y controles, el nivel funcional de TAFI (Stachrom TAFI®), obteniendo una buena correlación entre estos niveles funcionales y los niveles antigénicos (Asserachrom TAFI®).

Otro trabajo que evalúa los niveles de TAFI según diferentes genotipos, fue realizado en 2001 por **Mornage y cols.**, donde intentaron asociar los polimorfismos del TAFI, Ala147Thr y C+1245G y el riesgo de padecer Enfermedad Tromboembólica Venosa en sujetos portadores del factor V Leiden. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Este mismo grupo de trabajo estudió los niveles de TAFI en relación con sus diferentes genotipos en pacientes con enfermedad coronaria en varios países. El genotipo 147Thr/Thr presentó niveles de TAFI más elevados, así como los genotipos 325Thr/Thr, 2599CC, 438GG, 1542CC y 1583AA. El análisis de haplotipos reveló que los portadores del alelo Thr147 asociaban un mayor riesgo de enfermedad coronaria en Francia mientras que no ocurría lo mismo en el Norte de Irlanda²³⁷. De nuevo, nuestros resultados fueron completamente diferentes al no demostrar que había isoformas en nuestros sujetos (tanto pacientes como controles), que se asociaban con niveles elevados de TAFI.

En el trabajo de **Frere y cols.**, se determinaron los niveles de TAFI mediante varias técnicas (antigénicas y funcionales) en sujetos sanos y en sujetos con enfermedad coronaria cardíaca. Se puso de manifiesto la relación entre los niveles medios de TAFI plasmático y diferentes polimorfismos de esta proteína utilizando varias técnicas antigénicas. En los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile se encontraron diferencias significativas en cuanto a los niveles de TAFI, siendo los genotipos Thr/Thr147 y Thr/Thr325 los que presentaron niveles mas elevados de TAFI plasmático²³³. También se demostró en este estudio la %polimorfismo-independencia+de dos técnicas (%STA-Stachrom TAFI+y %B1/P4C2+) a la hora de determinar los niveles de TAFI, una vez determinado el análisis haplotípico de los polimorfismos estudiados.

Los niveles de TAFI para todos los genotipos estudiados (polimorfismos -438, Ala147Thr y Thr325Ile), mostraban diferencias estadísticamente significativas en el trabajo de **Martini y cols**²³⁸. Los genotipos 325Thr/Thr y el 147Thr/Thr, presentaron niveles de TAFI mas elevados en pacientes con trombosis venosa profunda. Estos datos, tampoco coincidían con los de nuestra serie, que no mostró diferencias entre los niveles de TAFI de ambos polimorfismos.

*HIFMECH*²³³, los niveles medios de TAFI plasmático no en función de los genotipos del polimorfismo Ala147Thr, tanto en los pacientes como en los controles. Una de las técnicas utilizadas en este caso, fue la aplicada en nuestra serie (Asserachrom TAFI®).

V.C Niveles plasmáticos de TAFI y factores de riesgo clínicos

En relación a los estudios en ETV, **Eichinger y cols.** no encontraron diferencias en cuanto a los niveles de TAFI y el sexo o la edad de los pacientes²⁴⁷. En otra comunicación, **Schroeder y cols.** concluyeron que la edad y el sexo no influenciaban en los niveles de TAFI plasmático²²¹. Los análisis del riesgo asociado a la edad mostraron que mientras no hay un incremento significativo de TAFI relacionado con la edad en los hombres, este sí se encuentra en mujeres en el estudio de **van Tilburg y cols.**²¹⁶.

Un interesante trabajo realizado en nuestro país por **Santamaría y cols.** (basado en pacientes que habían presentado enfermedad isquémica cerebral), no encontró diferencias en cuanto a los niveles de TAFI y los grupos de edad estudiados, sexo, hipertensión, hábito tabáquico, ingesta de alcohol, diabetes mellitus, obesidad o dislipemia²⁵². Este mismo grupo de trabajo estudió la posible relación entre los principales factores de riesgo cardiovasculares y los niveles de TAFI en la población española. Tan sólo en mujeres jóvenes se encontraron niveles de TAFI inferiores a las mujeres de mayor edad. Ningún factor cardiovascular de riesgo mostró influencia significativa sobre los niveles de TAFI²⁷².

En otra serie que relacionaba los niveles de TAFI en pacientes con **angor pectoris** estable, el nivel medio de estos fue del 100%, no existiendo diferencias significativas en cuanto a la edad, diabetes mellitus, hipertensión o antecedente de infarto de los pacientes²⁷³.

En el estudio *PRIME*, los niveles de TAFI plasmático de pacientes y controles se correlacionaron débilmente con los niveles de colesterol y triglicéridos. No hubo asociación entre las concentraciones de TAFI y la edad, sexo, hipertensión, diabetes o la condición de ser fumador²³⁷. Sin embargo, en el trabajo llevado a cabo por el grupo *HIFMECH*, la concentración de TAFI no se correlacionó con los factores de riesgo como la edad, sexo, colesterol, triglicéridos, tensión arterial o fibrinógeno, en todos los individuos del estudio. Sí que se encontró correlación entre los niveles de TAFI y los niveles de PAI-1²⁷¹.

No existen en España datos acerca de la asociación entre factores de riesgo cardiovasculares y niveles de TAFI en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, siendo nuestro estudio el primero en valorar dicha asociación. En cuanto a la edad y sexo, nuestros resultados coinciden de manera clara con los resultados publicados en la literatura más reciente^{217,218}. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de TAFI en varones y mujeres, tanto en los pacientes como en los controles; aunque sí se observó una tendencia en el límite de la significación estadística en los

presentaban niveles medios de TAFI más elevados que los controles con una $p \leq 0.06$. Esta tendencia ha sido observada por algún autor, pero en mujeres jóvenes, dato que no ha sido confirmado en nuestro estudio ni en la mayoría de los estudios recientes, donde se objetivó la no influencia de los niveles de TAFI sobre la edad o sexo de los pacientes²¹⁶. El estudio de los niveles medios de TAFI según diferentes grupos de edad (18-40, 41-65 y 66-80 años) no mostró diferencias significativas en los pacientes ni en los sujetos sanos, existiendo una discreta tendencia a valores de TAFI más elevados con el aumento de edad en los pacientes, que también ha sido reflejada en algunos trabajos, sin llegar a ser estadísticamente significativa²¹⁸.

A cerca de otros factores de riesgo vasculares estudiados en nuestra serie (obesidad, toma de anticonceptivos, diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia y el hábito tabáquico), ninguno se asoció con niveles elevados de TAFI en los pacientes. Estos resultados coinciden con los obtenidos en los diferentes estudios realizados en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, comentados anteriormente. Sin embargo, en nuestros sujetos controles, sí que se encontraron valores significativamente más elevados de TAFI en los sujetos que presentaban obesidad ($p < 0.05$) y/o hipercolesterolemia ($p < 0.02$). Esta asociación, sí que se ha visto reflejada en algunos estudios pudiendo ser un campo de investigación interesante^{219,274,275}. Así, **Aubert y cols.** valoraron los niveles de TAFI en sujetos con síndrome de resistencia a la insulina. En los pacientes se hicieron dos grupos, uno de sujetos obesos, y el otro de sujetos con un índice de masa corporal dentro de los límites de la normalidad. Los sujetos obesos presentaron niveles de TAFI más elevados que los sujetos con normopeso. En este trabajo, el índice de masa corporal y la dislipemia presentaron correlación positiva con los niveles de TAFI²⁷⁴. **Puccetti y cols.**, también presentaron un trabajo que relacionaba la presencia de niveles elevados de TAFI funcional en pacientes con hipercolesterolemia. Siguiendo con este factor de riesgo, en el VIII congreso internacional del ISTH, se presentó una comunicación en la cual se estudiaban a 50 mujeres obesas y 50 mujeres sanas pareadas por edad y sexo. La concentración de TAFI fue medida por el kit ELISA Immunoclone TAFI®. Los niveles medios de TAFI fueron normales en ambos grupos de sujetos, pero resultaron ser más elevados en el grupo de pacientes obesas, con una significación de $p < 0.0001$ ²⁷⁵.

Finalmente, con respecto a la asociación entre la diabetes, la toma de anticonceptivos orales y los niveles de TAFI, no hemos encontrado relación alguna en nuestra serie. Frente a estos datos, **Yoshimasa y cols.** objetivaron un aumento de los niveles de TAFI plasmático en relación a la hipercolesterolemia diagnosticada en 132 pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Otro trabajo, también evaluó los niveles de TAFI (TAFI-EIA Kit®) en pacientes diabéticos tipo 2, encontrando unos niveles de 139.1% frente a 99.2% en los controles. La diferencia fue estadísticamente significativa. Hubo correlación significativa entre los niveles de TAFI en

Hubo diferencias entre los niveles de TAFI y la proteína de activación del plasminógeno (PAI-1). **Alacacioglu y cols.** han investigado los niveles de TAFI en 30 pacientes con preeclampsia y 30 mujeres sanas embarazadas. La media del TAFI en pacientes con preeclampsia fue de 12.55 ± 1.88 g/ml, mientras que las mujeres embarazadas sanas presentaban unos niveles de 12.29 ± 3.0 g/ml. No fue encontrada entre ambos grupos una diferencia estadísticamente significativa. Otra serie, relacionaba la presencia de anticonceptivos de segunda y tercera generación con el aumento de los niveles de TAFI en 35 mujeres portadoras del Factor V Leiden en comparación con un grupo control de 51 mujeres sanas²⁷⁷. Los niveles de TAFI y de dímero-D fueron significativamente más elevados en las mujeres que tomaron ACO. Esta elevación de los niveles del TAFI, parecía ser α -estrógeno-dependiente (a mayor cantidad de estrógenos, mayor elevación del TAFI). No hemos incluido pacientes embarazadas en nuestro estudio para evitar posibles sesgos, por lo que no pudimos establecer ninguna asociación entre el embarazo y los niveles de TAFI.

V.D Niveles plasmáticos de TAFI y factores de riesgo genético: FVL y PT20210A

Se ha descrito en algunos trabajos el papel del TAFI en el mecanismo fisiopatológico de dos mutaciones protrombóticas (el polimorfismo PT20210A del gen de la protrombina y la mutación FV R506Q (FVL)), que están presentes en algunos pacientes con ETV. Se sugiere que, al ser el TAFI un importante nexo de unión entre la coagulación y la fibrinólisis, un aumento de sus niveles podría justificar parte de la compleja etiopatogenia de estos pacientes^{247,216}.

En el estudio realizado en pacientes con trombosis venosa profunda, **Van Tilburg y cols.** concluyen que, tras ajustar los resultados con diferentes variables, los niveles elevados de TAFI no se asocian a un aumento del riesgo de desarrollar trombosis venosa profunda en pacientes que eran portadores del FVL²¹⁶. **Rendrik y cols.** estudiaron en 388 sujetos sanos y 388 pacientes con antecedentes de TVP, varios polimorfismos del TAFI (-152 A/G, -438 A/G, -530 C/T, -1053 C/T, -1102 T/G, -690G/A y -1925 T/C). El factor V Leiden estaba presente en el 10.6% de los pacientes y en el 2.3% de los controles⁷¹. La mutación 20210A del gen de la protrombina fue hallada en el 7% de los pacientes y en el 1.3% de los controles. En este trabajo no se compararon los niveles de TAFI entre los pacientes portadores del FVL y/o PT20210A y los que no presentaban dichas mutaciones.

Nuestro estudio mostró unos resultados muy similares al estudio de **Van Tilburg y cols.**, al no encontrar asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de TAFI y el ser o no portador de las mutaciones FVL y PT20210A, tanto en pacientes como en controles. No obstante, sí que hemos observado que los pacientes con mutación Factor V Leiden (heterocigotos) presentaron niveles de TAFI más elevados que los que no eran portadores de

lo mismo en el grupo control. Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, el intento de confirmar una elevación de los niveles de TAFI en estos pacientes, nos parece un aspecto interesante a desarrollar en futuras líneas de investigación.

En cuanto a la relación existente entre los polimorfismos del TAFI y la presencia de trombosis, en familias portadoras de las mutaciones PT20210A y/o FVL, no se han descrito estudios concluyentes que demuestren asociaciones significativas. **Henry y cols.** han evaluado la posible asociación de dos polimorfismos del TAFI (Ala147Thr y C+1542G) y el riesgo de trombosis venosa en individuos portadores del Factor V Leiden en su forma heterocigota. Tras analizar los resultados, se concluyó que los polimorfismos del TAFI Ala147Thr y C+1245G no se asociaban con un mayor riesgo de padecer trombosis venosa profunda²³⁴.

Por tanto, finalmente nuestros resultados confirman la no asociación entre los niveles medios de TAFI y las mutaciones PT20210A o Factor V Leiden (tanto en pacientes con ETV, como en sujetos sanos). Aun así, pensamos que sigue existiendo muy poca bibliografía al respecto, no pudiendo elaborarse conclusiones definitivas por el momento.

V.E Correlación entre los niveles plasmáticos de TAFI y el dímero-D

Recientemente, se ha estudiado el efecto que posee *in vitro* el TAFI sobre el dímero-D en su forma no covalente ((DD)E), y por lo tanto, sobre la degradación del mismo en sus fragmentos E + DD. En este trabajo, se ha puesto de manifiesto que el TAFI produce una reducción del 96%, en la capacidad de estimular al t-PA para que actúe sobre el ((DD)E) y desfragmentarlo en los fragmentos E + DD. Por lo tanto, una de las conclusiones es que, entre las propiedades antifibrinolíticas del TAFI, se incluirían la estabilización del coágulo mediante la prevención de la degradación del ((DD)E) hacia DD y fragmento E²⁷⁸. Son muy escasos los estudios clínicos que han relacionado los niveles medios plasmáticos de TAFI y los niveles de dímero-D, tanto en enfermos con patología tromboembólica venosa como en sujetos sanos.

Schroeder y cols. observaron en su estudio, que los pacientes con tromboembolismo pulmonar masivo, presentaban niveles elevados de TAFI con una asociación estadísticamente significativa; y además, tenían niveles de dímero-D inversamente correlacionados (con los valores del TAFI). Los autores sugerían, que estos datos orientaban a que los pacientes presentaban una fibrinólisis alterada (disminuida)²²¹. En otro estudio, **Yukata y cols.** investigaron varios parámetros de fibrinólisis en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, y observaron que existía una correlación inversa ($r = -0.16$) entre los niveles de TAFI plasmático y la determinación del dímero-D, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas²⁵⁹. **Watanabe y cols.** realizaron un trabajo donde se

de TAFI en pacientes con coagulación intravascular también se encontró una correlación negativa entre el

TAFI y los niveles de dímero-D²⁷⁹.

Sin embargo, **Chabloz y cols.** no objetivaron ninguna correlación entre los niveles de TAFI de mujeres embarazadas y la determinación del dímero-D²⁸⁰. Otro estudio reciente, investigó las situaciones de hipercoagulabilidad en relación con la enfermedad inflamatoria intestinal. En este trabajo, los niveles de TAFI en estos pacientes fueron significativamente superiores que en los controles. No obstante, no se encontró correlación alguna entre los niveles de TAFI y los niveles de dímero-D²⁶⁹.

En nuestro estudio, hemos evaluado la posible correlación del dímero-D sobre el TAFI plasmático, tanto en pacientes como en los sujetos controles, no observándose correlación significativa en ninguno de los grupos mencionados, aunque se observe una mínima correlación positiva. Estos resultados ponen de nuevo la evidencia de que se necesitan más estudios controlados y aleatorizados en pacientes que presenten ETV, para evaluar definitivamente el papel de esta proteína sobre los niveles de TAFI plasmático. Así mismo, pensamos que el valor biológico del TAFI, dímero-D, PAI y el resto de proteínas que forman parte de la fibrinólisis plasmática, podría ser muy útil en el estudio y evaluación de la recurrencia de la ETV, por lo que sería necesario tenerlo en consideración en futuras líneas de estudio.

1. Los niveles elevados de TAFI antigénico plasmático constituyen un marcador de riesgo de ETV.
2. Los niveles medios de TAFlag no están influenciados por los polimorfismos genéticos Ala147Thr y Thr325Ile. Ningún genotipo perteneciente al polimorfismo Ala147Thr se comporta como marcador de riesgo para el desarrollo de ETV. La presencia del genotipo 325Thr/Thr (polimorfismo Thr325Ile) constituye un marcador de riesgo de ETV.
3. En nuestra serie, los pacientes con ETV que son portadores de las mutaciones PT20210A y/o FVL, no presentan niveles medios de TAFlag plasmático superiores a los pacientes que no lo son.
4. En los pacientes, no hemos observado variaciones del TAFlag en función de los factores de riesgo clínico estudiados (edad, sexo, obesidad, toma de anticonceptivos orales, diabetes mellitus y/o hipercolesterolemia). En los sujetos sanos, la obesidad y la hipercolesterolemia sí que aumentan los niveles medios de TAFlag plasmático.
5. Los niveles plasmáticos de dímero-D y de TAFlag no muestran correlación significativa, tanto en pacientes como en sujetos sanos.
6. Nuestros resultados evidencian la importancia que tienen ciertos marcadores biológicos de reciente aparición, como es el caso del TAFI, en el desarrollo de ETV; siendo la identificación de estos marcadores en pacientes con ETV recurrente, una interesante línea de investigación.

1. Rahimtoola A, Bergin JD. Acute pulmonary embolism: An update on diagnosis and management. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30:61-114.
2. Coon WW, Willis PW 3rd, Keller JB. Venous thromboembolism and other venous disease in the Tecumseh community health study. *Circulation*. 1973;48:839-46.
3. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, Lohse CM, O'Fallon WM, Melton LJ. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost*. 2001;86:452-63.
4. Montes Santiago J, Rey Garcia G, Mediero Dominguez A. Seasonal changes in morbimortality caused by pulmonary thromboembolism in Galicia. *An Med Interna* 2003; 20:457-60.
5. Anderson FA Jr, Wheeler HB, Goldberg RJ, Hosmer DW, Patwardhan NA, Jovanovic B, Forcier A, Dalen JE. A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study. *Arch Intern Med*. 1991;151:933-8.
6. Weinmann EE, Salzman EW. Deep-vein thrombosis. *N Engl J Med*. 1994;331:1630-41.
7. Cheuk BL, Cheung GC, Cheng SW. Epidemiology of venous thromboembolism in a Chinese population. *Br J Surg*. 2004;91:424-8.
8. Siragusa S, Piovella F, Barone M, Beltrametti C. Venous thromboembolism: epidemiology and risk factors. *Minerva Cardioangiol*. 1996;44:581-9.
9. Hawkins D. Economic considerations in the prevention and treatment of venous thromboembolism. *Am J Health Syst Pharm*. 2004;61(Suppl 7):S18-21.
10. Takase S, Bergan JJ, Schmid-Schonbein G. Expression of adhesion molecules and cytokines on saphenous veins in chronic venous insufficiency. *Ann Vasc Surg*. 2000;14:427-35.
11. Rosendaal FR. Venous Thrombosis: a multicausal disease. *Lancet*. 1993;353:1667-73.
12. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet*. 2005;365:1163-74.
13. Nordstrom M, Lindblad B, Bergqvist D, Kjellstrom T. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population. *J Intern Med*. 1992;232:155-60.
14. Kujovich JL. Hormones and pregnancy: thromboembolic risks for women. *Br J Haematol*. 2004;126:443-54.
15. Tutschek B, Struve S, Goecke T, Pillny M, Zotz R, Gerhardt A, Beckmann M. Clinical risk factors for deep venous thrombosis in pregnancy and the puerperium. *J Perinat Med*. 2002;30:367-70.
16. Rosendo A, Fernandez D, Lucio R. Epidemiología de la enfermedad tromboembólica venosa. Síndrome postrombótico. Barcelona: Edika Med, 1995;1:5-8.
17. Tapson VF. Acute pulmonary embolism. *Cardiol Clin*. 2004;22:353-65.

19. Prandoni P, Lensing AWA, Cogo A, Cupini S, Villata S. The long term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med.* 1996;125:1-7.
20. Monreal M, Ruiz J, Olazabal A, Arias A, Roca J. Deep venous thrombosis and the risk of pulmonary embolism. A systematic study. *Chest.* 1992;102:677-81.
21. Stein PD, Terrin ML, Hales CA, Palevsky HI, Saltzman HA, Thompson BT. Clinical, laboratory, roentgenographic and electrocardiographic findings in patients with acute pulmonary embolism and no pre-existing cardiac or pulmonary disease. *Chest.* 1991;100:598-603.
22. Revel MP, Petrover D, Hernigou A, Lefort C, Meyer G, Fria G. Diagnosing pulmonary embolism with four-detector row helical CT: prospective evaluation of 216 outpatients and inpatients. *Radiology.* 2005;234:265-73.
23. Hals KS, Mahler D, Baker WH. Late sequelae of deep venous thrombosis. Diagnostic and therapeutic considerations. *Am J Surg.* 1994;147:216-20.
24. Biguzzi E, Mozzi E, Alatri A, Taioli E, Moia M, Manucci P. The post-thrombotic syndrome in young women: Retrospective Evaluation of Prognostic Factors. *Thromb Haemost.* 1998;80:575-7.
25. Armon MP, Hopkinson BR. Thrombolysis of acute deep venous thrombosis. *Br J Surg.* 1996;83:580-1.
26. Maris C, Martin B, Creteur J, Remmelink M, Piagnerelli M, Salmon I, Vincent JL, Demetter P. Comparison of clinical and post-mortem findings in intensive care unit patients. *Virchows Arch.* 2007; 50:329-33.
27. Buron Fernandez MR, Minguez Garcia P, Nuevo Gonzalez JA, Puche Paniagua JJ, Gomez Sanchez-Biezma C, Aragoncillo Ballesteros P. Pulmonary thromboembolism in hospitalized patients during the period 1994-2000: an autopsy study. *An Med Interna.* 2006 ;23:317-20.
28. Pudukollu H, Khan IA, Pudukollu G, Gowda RM, Mendoza C, Sacchi TJ. Acute pulmonary embolism in elderly: clinical characteristics and outcome. *Int J Cardiol.* 2005;99:213-6.
29. Mustafa S, Stein PD, Patel KC, Otten TR, Holmes R, Silbergleit A. Upper extremity deep venous thrombosis. *Chest.* 2003;123:1953-6.
30. Gargallo Maicas C, Todoli Parra JA, Romera Barroso B, Suarez Alvarez L, Calabuig Munoz E, Saro Perez E, Bonora Tamarit V, Calabuig Alborch JR. Upper limb deep venous thrombosis. Risk factors, outcome, and postthrombotic syndrome. *Rev Clin Esp.* 2005;205:3-8.
31. Heron E, Lozinguer O, Alhenc-Gelas M, Emmerich J, Fiesinger JN. Hypercoagulable states in primary upper-extremity deep vein thrombosis. *Arch Intern Med.* 2000;160: 382-6.
32. Hendler MF, Meschengieser SS, Blanco AN, Alberto MF, Salviu MJ, Gennari L, Lazzari MA. Primary upper-extremity deep vein thrombosis: high prevalence of thrombophilic defects. *Am J Hematol.* 2004;76:330-7.

lascione MA, Margaglione M, Iannaccone L, Dandrea G, Balzano A. High prevalence of thrombophilic genotype in portal vein thrombosis. *Am J Gastroenterol.* 2001, 96:146-9.

34. Chamouard P, Pencreach E, Maloisel F, Grunebaum L, Ardizzone JF, Meyer A, Gaub MP, Goetz J, Baumann R, Uring-Lambert B, Levy S, Dufour P, Hauptmann G, Oudet P. Frequent factor II G20210A mutation in idiopathic portal vein thrombosis. *Gastroenterology.* 1999;116:140-4.
35. Amitrano L, Guardascione MA, Brancaccio V, Margaglione M, Manguso F, Iannaccone L, Grandone E, Balzano A. Risk factors and clinical presentation of portal vein thrombosis in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2004;40:736-41.
36. Samonakis DN, Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Malliaraki N, Antoniou P, Romanos J, Kouroumalis EA. Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2004;49:854-8.
37. Madonna P, De Stefano V, Coppola A, Albisinni R, Cerbone AM. G20210A PRTH gene mutation and other thrombophilic polymorphisms in patients with cerebral thrombosis. *Stroke.* 2000;31:1787-8.
38. Bienfait HP, van Duinen S, Tans JT. Latent cerebral venous and sinus thrombosis. *J Neurol.* 2003;250:436-9.
39. De Bruijn SFTM, Stam J, Koopman MMW, Vanderbroucke JP for the Cerebral Venous sinus Thrombosis Study Group. Case-control study of risk of cerebral sinus thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of hereditary prothrombotic condition. *Br Med J.* 1998;316:589-92.
40. Gadelha T, Andre C, Juca AA, Nucci M. Prothrombin 20210A and oral contraceptive use as risk factors for cerebral venous thrombosis. *Cerebrovasc Dis.* 2005;19:49-52.
41. Ventura P, Cobelli M, Marietta M, Panini R, Rosa MC, Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and other newly recognized inherited coagulation disorders (factor V Leiden and prothrombin gene mutation) in patients with idiopathic cerebral vein thrombosis. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17:153-9.
42. Bernardi E, Prandoni P. The post-thrombotic syndrome. *Curr Opin Pulm Med.* 2000;6:335-42.
43. Coleridge Smith PD. The management of chronic venous disorders of the leg: An evidence-based report of an International Task Force. *Phlebology.* 1999;14:1-6.
44. Gabriel F, Labios M, Portoles O, Guillen M, Corella D, Frances F, Martinez M, Gil J, Saiz C. Incidence of post-thrombotic syndrome and its association with various risk factors in a cohort of Spanish patients after one year of follow-up following acute deep venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004;92:328-36.
45. Boursier V, Priollet P. Chronic venous insufficiency. Varicose veins. *Rev Prat.* 2002;52:443-9.
46. Priollet P. Essential varicose veins and chronic venous insufficiency. *Rev Prat.* 1994;44:739-44.

-thrombotic syndrome: current knowledge, controversies,
Blood Rev. 2002;16:155-65.

48. Evers EJ, Wuppermann T. Ultrasound diagnosis in post-thrombotic syndrome. Comparative study with color duplex, cw-Doppler and B-image ultrasound. *Ultraschall Med.* 1995;16:259-63.
49. Sanchez Carpio C, Rodi E, Piola P, Fernanda Piola M. Trombofilia--current status. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba.* 2004;61:32-6.
50. Egeberg O. Inherited antithrombotic deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:516-30.
51. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia. Am J Hum Genet.* 2000;67:1452-9.
52. Leme DA, Mannucci PM, Baner KA, Bertina RM, Bochkov J, Boulygenkov V. Inherited thrombophilia: part 1. *Thomb Hemost.* 1996;76:651-62.
53. Soto I. Trombofilia y complicaciones del embarazo. *Trombosis y Hemostasia.* 2000;13 (supl 1):73-5.
54. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Criteria of screening for inherited thrombophilia among patients with venous thromboembolism. *Haematologica.* 2002;87:40-1.
55. Feero WG. Genetic thrombophilia. *Prim Care.* 2004;31:685-709.
56. De Stefano V, Rossi E, Paciaroni K, Leone G. Screening for inherited thrombophilia: Indications and therapeutic implications. *Haematologica.* 2002;87:1095-108.
57. Gallus AS. Management options for thrombophilias. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:118-26.
58. Anton N, Massicotte MP. Venous thromboembolism in pediatrics. *Semin Vasc Med.* 2001; 1:111-22.
59. Buil A, Soria JM, Souto JC, Almasy L, Lathrop M, Blangero J, Fontcuberta J. Protein C levels are regulated by a quantitative trait locus on chromosome 16: results from the Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia (GAIT) Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1321-5.
60. Simmonds RE, Zoller B, Ireland H, Thompson E, De Frutos PG, Dahlback B, Lane DA. Genetic and phenotypic analysis of a large (122-member) protein S-deficient kindred provides an explanation for the familial coexistence of type I and Type III plasma phenotypes. *Blood.* 1997;89:4364-70.
61. Dahlback B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol.* 2004;79:109-16.
62. Tran M, Spencer FA. Thromboepidemiology: identifying patients with heritable risk for thrombin-mediated thromboembolic events. *Am Heart J.* 2005;149(1 Suppl):S9-18.

- der Schaaf W, Kluin-Nelemans HC, van der Meer J. Venous thrombosis and arterial thrombosis between familial protein S deficiency and factor V Leiden: results from a family cohort study to assess the clinical impact of a laboratory test-based classification. *Br J Haematol.* 2005;128:703-10.
64. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, García de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med.* 1998;128:8-14.
65. Favaloro EJ, Orsag I, Bukuya M, McDonald D. A 9-year retrospective assessment of laboratory testing for activated protein C resistance: evolution of a novel approach to thrombophilia investigations. *Pathology.* 2002;34:348-55.
66. Jennings I, Cooper P. Screening for thrombophilia: a laboratory perspective. *Br J Biomed Sci.* 2003; 60: 39-51.
67. Bertina RM, Reistma PM, Rosendal FR, Van der Brouke JP. Resistance to activated protein C and factor V Leiden as a risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1995;74:449-53.
68. Juul K, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. Factor V Leiden and the risk for venous thromboembolism in the adult Danish population. *Ann Intern Med.* 2004;140:330-7.
69. Griffin JH, Heeb MJ, Kojima Y. Activated protein C resistance molecular mechanisms. *Thromb Haemost.* 1995;74:444-8.
70. Zhao L, Morser J, Bajzar L, Nesheim M, Nagashima M. Identification and characterization of two thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor isoforms. *Thromb Haemost.* 1998;80:949-55.
71. Franco RF, Fagundes MG, Meijers JC, Reitsma PH, Lourenco D, Morelli V, Maffei FH, Ferrari IC, Piccinato CE, Silva WA Jr, Zago MA. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica.* 2001;86:510-7.
72. Marchetti M, Pistorio A, Barosi G. Extended anticoagulation for prevention of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden--cost-effectiveness analysis. *Thromb Haemost.* 2000;84:752-7.
73. Dahlbäck B. Resistance to activated protein C, the Arg506 to Gln mutation in the factor V gene, and venous thrombosis. Functional test and DNA-bases assay, pros and cons. *Thromb Haemost.* 1995;73:739-42.
74. Dahlbäck B, Carlson M, Svenson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1004-8.
75. Joffe HV, Goldhaber SZ. Laboratory thrombophilias and venous thromboembolism. *Vasc Med.* 2002;7:93-102.
76. Koster, T, Rosendaal FR, De Ronde H, Briët E, Vandenbrouche JP. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;342:1503-6.

Leiden: association with venous thromboembolism in
J Biomed Sci. 2004;61:157-64.

78. Kujovich JL. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:412-24.
79. Ament L. Factor V Leiden: a review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2003;17(3):190-5.
80. Krabbendam I, Franx A, Bots ML, Fijnheer R, Bruinse HW. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;118:143-53.
81. van Vliet HA, Frolich M, Christella M, Thomassen LG, Doggen CJ, Rosendaal FR, Rosing J, Helmerhorst FM. Association between sex hormone-binding globulin levels and activated protein C resistance in explaining the risk of thrombosis in users of oral contraceptives containing different progestogens. *Hum Reprod.* 2005;20:563-8.
82. Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Guillonneau S, Kirzin JM, Aiach M, Ochat N, Scarabin PY. Impact of progestagens on activated protein C (APC) resistance among users of oral contraceptives. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1594-600.
83. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-703.
84. Gonzalez Ordonez AJ, Medina Rodriguez JM, Fernandez Alvarez CR, Sanchez Garcia J, Martin Sanchez L, Coto Garcia E, Alvarez Martinez MV. [20210A mutation of the prothrombin and venous thromboembolism gene]. *Sangre (Barc).* 1999;44:13-8.
85. Arruda VR, Annichino JM, Goncalves MS, Costa FF. Prevalence of the prothrombin gene variant (PT20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost.* 1997;78:1430-1433.
86. Brown K, Luddington R, Williamson D, Baker P, Baglin T. Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene. *Br J Haematol.* 1997;98:907-9.
87. Rosendaal FR, Doggen CJM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998;79:706-8.
88. Keenan C, Livingstone WJ, White B, Mynett-Johnson L, Cusack S, Lawler M, Smith OP. Prevalence of the prothrombin G20210A mutation in the Irish populations: use of a novel polymerase chain reaction approach. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000;11:669-72.
89. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Rio E, Oliver A, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta J. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost.* 1998;80:366-9.
90. Miles JS, Miletich JP, Goldhaber SZ, Hennekens CH, Ridker PM. G20210A mutation in the prothrombin gene and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Am Coll-Cardiol.* 2001;37:215-8.

92. Aznar J, Mira Y, Estelles A, Vaya A. Anticonceptivos orales y riesgo trombótico. *Thromb Haemost.* 2000;13:76-96.
93. Ebbesen LS. Hyperhomocysteinemia, thrombosis and vascular biology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004;50:917-30.
94. Ganji V, Kafai MR; Third National Health and Nutrition Examination Survey. Demographic, health, lifestyle, and blood vitamin determinants of serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:826-33.
95. Langman LJ, Ray JG, Evrovski J, Yeo E, Cole DE. Hyperhomocyst(e)inemia and the increased risk of venous thromboembolism: more evidence from a case-control study. *Arch Intern Med.* 2000;160:961-4.
96. González I, Souto JC, Mateo J, Córdoba A, Blanco-Vaca F, Fontcuberta J. Moderate hyper-homocysteinemia is highly prevalent defect in Spanish patients with venous thromboembolic disease. *Haematologica.* 1998;83:1126-7.
97. Kang SS, Zhou J, Wong PWK, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988;43:414-21.
98. Chua B, Kifley A, Wong TY, Mitchell P. Homocysteine and retinal vein occlusion: a population-based study. *Am J Ophthalmol.* 2005;139:181-2.
99. Del Bianco A, Maruotti G, Fulgieri AM, Celeste T, Lombardi L, Amato NA, Pietropaolo F. [Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia]. *Minerva Ginecol.* 2004;56:379-83.
100. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol.* 2004;104:336-43.
101. Keijzer MB, den Heijer M, Blom HJ, Bos GM, Willems HP, Gerrits H, Rosendaal FR. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2002;88(5):723-8.
102. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR. No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med.* 2007;167:497-501.
103. Girolami A, Spiezia L, Girolami B, Zocca N, Luzzatto G. Effect of age on oral contraceptive-induced venous thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2004;10:259-63.
104. Bernstein R, Haim N, Brenner B, Sarig G, Bar-Sela G, Gaitini D. Venous sonography for the diagnosis of asymptomatic deep vein thrombosis in patients with cancer undergoing chemotherapy. *J Ultrasound Med.* 2004;23:655-8.

105. J. Epidemiology, etiology and diagnosis of venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2004;83:95-103.
106. Ozturk MA, Haznedaroglu IC, Turgut M, Goker H. Current debates in antiphospholipid syndrome: the acquired antibody-mediated thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2004;10:89-126.
107. Favaloro EJ. Diagnostic issues in thrombophilia: a laboratory scientist's view. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:11-6.
108. Gathof BS, Picker SM, Rojo J. Epidemiology, etiology and diagnosis of venous thrombosis. *Eur J Med Res*. 2004;9:95-103.
109. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Étude de la Trombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost*. 2000;83:657-60.
110. Meyer MS, Ola E, Dahl M, Daniel J, Quinlan PM, Rosencher N. Quantificación of risk factors for venous thromboembolism: a preliminary study for the development of a risk assessment tool. *Haematologica*. 2003; 88: 1410-21.
111. Kyrle PA, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Weltermann A, Eichinger S. The risk of recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med*. 2004;17:350:2558-63.
112. Tsai A, Cushman M, Rosamond W, Heckbert S, Polak J: Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence. *Arch Intern Med*. 2002;162:1182-9.
113. Pierre-Paul D, Mureebe L, Gahtan V, Kerstein MD. Role of race and sex in diagnosis and one-year follow up of deep venous thrombosis. *Surg Technol Int*. 2004;13:215-8.
114. Gallus AS. Travel, venous thromboembolism, and thrombophilia. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:90-6.
115. Drife J. Thromboembolism. *Br Med Bull*. 2003;67:177-90.
116. Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svardsudd K. Smoking and abdominal Obesity, Risk factors for venous thrombosis among middle-aged men: The study of men born in 1913. *Arch Intern Med*. 1999;159:1886-90.
117. Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ. Risk Factors For Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. *Arch Intern Med*. 2000;160: 809-15.
118. Grove P. Venous thrombosis related to peripherally inserted central catheters. *J Vasc Interv Radiol*. 2000;11:837-40.
119. McDonald J, Watt JM. Comparison of technical success and outcome of tunneled catheters inserted via the jugular subclavian Approaches. *J Vasc Interv Radiol*. 2000; 11:225-31.
120. Rosovsky RP, Kuter DJ. Catheter-related thrombosis in cancer patients: pathophysiology, diagnosis, and management. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005;19:183-202.

P, Goudot D. Catheter-related upper extremity deep s:a prospective study based on Doppler US. Radiology.

122. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. JAMA. 2005;293:715-22.
123. Samonakis DN, Koutroubakis IE, Sfiridaki A, Malliaraki N, Antoniou P, Romanos J, Kouroumalis EA. Hypercoagulable states in patients with hepatocellular carcinoma. Dig Dis Sci. 2004;49:854-8.
124. Kearon C. Epidemiology of venous thromboembolism. Semin Vasc Med. 2001;1:7-26.
125. White RH, Zhou H, Romano PS. Incidence of symptomatic venous thromboembolism after different elective or urgent surgical procedures. Thromb Haemost. 2003;90:446-55.
126. Browd SR, Ragel BT, Davis GE, Scott AM, Skalabrin EJ, Couldwell WT. Prophylaxis for deep venous thrombosis in neurosurgery: a review of the literature. Neurosurg Focus. 2004;17:1-10.
127. Knudson MM, Ikossi DG. Venous thromboembolism after trauma. Curr Opin Crit Care. 2004;10:539-48.
128. Aito S, Pieri A, D'Andrea M, Marcelli F, Cominelli E. Primary prevention of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in acute spinal cord injured patients. Spinal Cord. 2002;40:300-3.
129. Abelseth G, Buckley RE, Pineo GE, Hull R, Rose MS. Incidence of deep-vein thrombosis in patients with fractures of the lower extremity distal to the hip. J Orthop Trauma. 1996;10:230-5.
130. Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma. N Engl J Med. 1994;331:1601-6.
131. Kujovich JL. Hormones and pregnancy: thromboembolic risks for women. Br J Haematol. 2004;126:443-54.
132. Ninet J. [The risk of maternal venous thromboembolism disease. Synopsis and definition of high-risk groups]. Ann Med Interne. 2003;154:301-9.
133. Yilmazer M, Kurtay G, Sonmezer M, Akar N. Factor V Leiden and prothrombin 20210 G-A mutations in controls and in patients with thromboembolic events during pregnancy or the puerperium. Arch Gynecol Obstet. 2003;268:304-8.
134. Anderson FA Jr, Wheeler HB. Venous thromboembolism. Risk factors and prophylaxis. Clin Chest Med. 1995;16:235-51.
135. Moores L, Bilello KL, Murin S. Sex and gender issues and venous thromboembolism. Clin Chest Med. 2004;25:281-97.
136. Gilabert J, Fernandez JA, España F, Aznar J, Estellés A. Physiological coagulation inhibitors in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. Thromb Haemost. 1988;49:319-29.

GTH Study Group on Natural Inhibitors. Thrombosis risk
fibrinogen III, protein C and protein S deficiency taking oral
contraceptives. *Thromb Haemost.* 1994;71:548-52.

138. Legnani C, Cini M, Cosmi B, Poggi M, Boggian O, Palareti G. Risk of deep vein thrombosis: interaction between oral contraceptives and high factor VIII levels. *Haematologica.* 2004;89:1347-51.
139. Gomes MP, Deitcher SR. Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med.* 2004;164:1965-76.
140. Jick H, Kaye JA, Vasilakis C, Jick SS. Risk of venous thromboembolism among users of third generation oral contraceptives compared with levonorgestrel before and after 1995: cohort and case control analysis. *BMJ.* 2000;321:1190-5.
141. Kemmeren JM, Algra A, Grobbee DE. Third generation oral contraceptives and risk of venous thrombosis: meta-analysis. *BMJ* 2001;323:131-4.
142. Women's Health Initiative Investigators. Risk and benefit of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321-33.
143. Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS, Sidney S, Rosendaal FR; Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA.* 2004;292:1573-80.
144. Rand JH, Wu XX. Antibody-mediated interference with annexins in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Res.* 2004;114:383-9.
145. Galli M, Barbui T. Antiphospholipid syndrome: clinical and diagnostic utility of laboratory tests. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:17-24.
146. Zanon E, Saggiorato G, Ramon R, Girolami A, Pagnan A, Prandoni P. Anti-prothrombin antibodies as a potential risk factor of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2004;91:255-8.
147. Meroni PL, Moia M, Derksen RH, Tincani A, McIntyre JA, Arnout JM, Koike T, Piette JC, Khamashta MA, Shoenfeld Y. Venous thromboembolism in the antiphospholipid syndrome: management guidelines for secondary prophylaxis. *Lupus.* 2003;12:504-7.
148. Tirado I, Mateo J, Soria JM, Oliver A, Martinez-Sanchez E, Vallve C, Borrell M, Urrutia T, Fontcuberta J. The ABO blood group genotype and factor VIII levels as independent risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2005;93:468-74.
149. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med.* 2002;162:1182-9.
150. Wibbenmeyer LA, Hoballah JJ, Amelon MJ, Chang PX, Loret De Mola RM, Lewis RD 2nd, Warner B, Kealey GP. The prevalence of venous thromboembolism of the lower extremity among thermally injured patients determined by duplex sonography. *J Trauma.* 2003;55:1162-7.

Chino-Bizzacchi JM, Arruda VR. Inherited risk factors for
thrombotic syndrome. *Eur J Pediatr.* 1998;157:939-42.

152. Casserley LF, Reddy SM, Dember LM. Venous thromboembolism in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2000;36:405-11.

153. Koeleman BP, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood.* 1994 15;84:1031-5.

154. Ehrenforth S, Nemes L, Mannhalter C, Rosendaal FR, Koder S, Zoghalmi-Rintelen C, Scharrer I, Pabinger I. Impact of environmental and hereditary risk factors on the clinical manifestation of thrombophilia in homozygous carriers of factor V:G1691A. *J Thromb Haemost.* 2004;2:430-6.

155. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med.* 1998;338:1793-7.

156. Langan RC. Factor V Leiden mutation and pregnancy. *J Am Board Fam Pract.* 2004;17:306-8.

157. Meglic L, Stegnar M, Milanez T, Bozic M, Peterlin B, Peternel P, Novak-Antolic Z. Factor V Leiden, prothrombin 20210G --> A, methylenetetrahydrofolate reductase 677C --> T and plasminogen activator inhibitor 4G/5G polymorphism in women with pregnancy-related venous thromboembolism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003 10;111:157-63.

158. Souto JC, Almasy L, Borrell M, Blanco-Vaca F, Mateo J, Soria JM, Coll I, Felices R, Stone W, Fontcuberta J, Blangero J. Genetic susceptibility to thrombosis and its relationship to physiological risk factors: the GAIT study. *Genetic Analysis of Idiopathic Thrombophilia.* *Am J Hum Genet.* 2000;67:1452-9.

159. Kearon C. Long-term management of patients after venous thromboembolism. *Circulation.* 2004;110(9 Suppl 1):10-8.

160. Mann KG. Thrombosis: theoretical considerations. *Am J Clin Nutr.* 1997; 65:1657S-1664S.

161. Agnelli G, Becattini C, Prandoni P. Recurrent venous thromboembolism in men and women. *N Engl J Med.* 2004;351:2015-8.

162. Heit JA. Predictors of Recurrence After deep vein Thrombosis and Pulmonary Embolism. *Arch Intern Med.* 2000;160:761-8.

163. Garcia-Fuster MJ, Forner MJ, Fernandez C, Gil J, Vaya A, Maldonado L. Long-term prospective study of recurrent venous thromboembolism in patients younger than 50 years. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2005;34(1):6-12.

164. Buller HR, Agnelli G, Hull RD, Hyers TM, Prins MH, Raskob GE. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004;126(3 Suppl):401S-428S.

165. de Godoy JM, de Godoy MF, Braile DM. Recurrent thrombosis in patients with deep vein thrombosis and/or venous thromboembolism associated with anticardiolipin antibodies. *Angiology.* 2006;57:79-83.

- , Lafuente-Guijosa A, Martínez-González J, Carrasco P, bus regression and recurrent venous thromboembolism. Effects of low-molecular-weight heparins: a meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2004;2:1581-7.
167. Baglin T, Luddington R, Brown K, Baglin C. Incidence of recurrent venous thromboembolism in relation to clinical and thrombophilic risk factors: prospective cohort study. *Lancet.* 2003;362:523-6.
168. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, Rossi E, Leone G. The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *N Engl J Med.* 1999;341:801-6.
169. Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, Prins MH, Buller HR, van der Meer J. The incidence of recurrent venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden is related to concomitant thrombophilic disorders. *Br J Haematol.* 2002;116:625-31.
170. van Hinsbergh VW. The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;95:198-201.
171. Colman R., Hirsh J, Marther V., Clowes A, George J. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Lippincott Williams & Wilkins. Fifth Edition. 2005.
172. Dahlback B, Villoutreix BO. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway. Novel Insights Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;28:12-15.
173. Lijnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol.* 1995;8:277-90.
174. M. Agirbasli . Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. *Int J Clin Pract.* 2005;59:102-6.
175. Donmez A, Aksu K, Celik HA, Keser G, Cagircan S, Omay SB, Inal V, Aydin HH, Tombuloglu M, Doganavsargil E. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in Behcet's disease. *Thromb Res.* 2005;115:287-92.
176. Folsom AR, Cushman M, Heckbert SR, Rosamond WD, Aleksic N. Prospective study of fibrinolytic markers and venous thromboembolism. *J Clin Epidemiol.* 2003;56:598-603.
177. Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992;3:605-14.
178. Murray JC, Buetow KH, Donovan M, Hornung S, Motulsky AG, Distèche C, Dyer K, Swisshelm K, Anderson J, Giblett E, Sadler E, Eddy R, Shows T. Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27. *Am J Hum Genet.* 1987;40:338-50.
179. Ladenvall P, Nilsson S, Jood K, Rosengren A, Blomstrand C, Jern C. Genetic variation at the human tissue-type plasminogen activator (tPA) locus: haplotypes and analysis of association to plasma levels of tPA. *Eur J Hum Genet.* 2003;11:603-10.

Nakagawa, B Rajput, and Y Nagamine. Multiple nuclear
nnces of the urokinase-type plasminogen activator gene.

181. Belin D, Wohlwend A, Schleuning WD, Kruithof EK, Vassalli JD. Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J.* 1989;8:3287-94.
182. You WK, So SH, Sohn YD, Lee H, Park DH, Chung SI, Chung KH. Characterization and biological activities of recombinant human plasminogen kringle 1-3 produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2004;36:1-10.
183. Borglum AD, Byskov A, Ragno P, Roldan AL, Tripputi P, Cassani G, Dano K, Blasi F, Bolund L, Kruse TA. Assignment of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am J Hum Genet.* 1992;50:492-7.
184. Folk JE, Finlayson JS. The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem.* 1977;31:1-133.
185. Ichinose A, Kaetsu H. Molecular approach to structure-function relationship of human coagulation factor XIII. *Methods Enzymol.* 1993;222:36-51.
186. Taubenfeld SM, Song Y, Sheng D, Ball EL, Matsueda GR. A monoclonal antibody against a peptide sequence of fibrinogen gamma chain acts as an inhibitor of factor XIII-mediated crosslinking of human fibrin. *Thromb Haemost.* 1995;74:923-7.
187. Tamaki T, Aoki N. Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta.* 1981;661:280-6.
188. Sakata Y, Aoki N. Significance of cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor to fibrin in inhibition of fibrinolysis and in hemostasis. *J Clin Invest.* 1982;69:536-42.
189. Samokhin GP, Lorand L. Contact with the N termini in the central E domain enhances the reactivities of the distal D domains of fibrin to factor XIIIa. *J Biol Chem.* 1995;270:21827-32.
190. Badimon L, Martinez-Gonzalez J. Endothelium and vascular protection: an update. *Rev Esp Cardiol.* 2002;55:17-26.
191. Caprini JA, Glase CJ, Anderson CB, Hathaway K. Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism. *Circulation.* 2004;109:14-8.
192. Eichinger S, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Quehenberger P, Schneider B, Weltermann A, Wagner O, Kyrle PA. D-dimer levels and risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA.* 2003;290:1071-4.
193. Rathbun SW, Whitsett TL, Raskob GE. Negative D-dimer result to exclude recurrent deep venous thrombosis: a management trial. *Ann Intern Med.* 2004;141:839-45.
194. Brotman DJ. Identifying patients at risk of recurrent venous thromboembolism. *JAMA.* 2003;290:3192.
195. Frieria-Reyes A, Caballero P, Ruiz-Gimenez N, Artieda P, Dominguez L, Perez-Amor E, Suarez C; Grupo de Estudio de Enfermedad Tromboembolica Venosa. Usefulness of fast

als for diagnosing pulmonary embolism in an emergency
199-504.

196. van der Graaf F, van den Borne H, van der Kolk M, de Wild PJ, Janssen GW, van Uum SH. Exclusion of deep venous thrombosis with D-dimer testing--comparison of 13 D-dimer methods in 99 outpatients suspected of deep venous thrombosis using venography as reference standard. *Thromb Haemost.* 2000;83:191-8.
197. Kearon C, Ginsberg JS, Douketis J, Crowther M, Brill-Edwards P, Weitz JI, Hirsh J. Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-dimer testing. *Ann Intern Med.* 2001;135:108-11.
198. Kraaijenhagen RA, Lensing AW, Wallis JW, van Beek EJ, ten Cate JW, Buller HR. Diagnostic management of venous thromboembolism. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11:541-86.
199. De Groot MR, van Marwijk Kooy M, Pouwels JG, Engelage AH, Kuipers BF, Buller HR. The use of a rapid D-dimer blood test in the diagnostic work-up for pulmonary embolism: a management study. *Thromb Haemost.* 1999;82:1588-92.
200. Teplyakov A, Polyakov K, Obmolova G, Strokopytov B, Kuranova I, Osterman A, Grishin N, Smulevitch S, Zagnitko O, Galperina O, Matz M, Stepanov V. Crystal structure of carboxypeptidase T from *Thermoactinomyces vulgaris*. *Eur J Biochem.* 1992;208:281-8.
201. Skidgel RA, Davis RM, Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones. *J Biol Chem.* 1989;264:2236-41.
202. Hendriks D, Scharpe S, van Sande M, Lommaert MP. Characterisation of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989;27:277-85.
203. Wang W, Hendriks DF, Scharpe SS. Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J Biol Chem.* 1994;269:15937-44.
204. Campbell W, Okada H. An arginine specific carboxypeptidase generated in blood during coagulation or inflammation which is unrelated to carboxypeptidase N or its subunits. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;162:933-9.
205. Eaton DL, Malloy BE, Tsai SP, Henzel W, Drayna D. Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma. *J Biol Chem.* 1991;266:21833-8.
206. Wang W, Hendriks DF, Scharpe SS. Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with high affinity for plasminogen. *J Biol Chem.* 1994 3;269:15937-44.
207. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270:14477-84.
208. Boffa MB, Wang W, Bajzar L, Nesheim ME. Plasma and recombinant thrombin-activable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and activated TAFI compared with respect to glycosylation, thrombin/thrombomodulin-dependent activation, thermal stability, and enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1998;273:2127-35.

Nesheim ME. Roles of thermal instability and proteolytic thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.*

210. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JC, Bouma BN. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. *Blood.* 2003 15;101:4844-6.
211. Schatteman K, Goossens F, Leurs J, Verkerk R, Scharpe S, Michiels JJ, Hendriks D. Carboxypeptidase U at the interface between coagulation and fibrinolysis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7:93-101.
212. Aloy P, Catasus L, Villegas V, Reverter D, Vendrell J, Aviles FX. Comparative analysis of the sequences and three-dimensional models of human procarboxypeptidases A1, A2 and B. *Biol Chem.* 1998;379:149-55.
213. Barbosa Pereira PJ, Segura-Martin S, Oliva B, Ferrer-Orta C, Aviles FX, Coll M, Gomis-Ruth FX, Vendrell J. Human procarboxypeptidase B: three-dimensional structure and implications for thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). *J Mol Biol.* 2002;321:537-47.
214. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem.* 1996;271:16603-8.
215. Mosnier LO, von dem Borne PA, Meijers JC, 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.
216. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood.* 2000;95:2855-9.
217. Stromqvist M, Schatteman K, Leurs J, Verkerk R, Andersson JO, Johansson T, Scharpe S, Hendriks D. Immunological assay for the determination of procarboxypeptidase U antigen levels in human plasma. *Thromb Haemost.* 2001;85:12-7.
218. Chetaille P, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost.* 2000;83:902-5.
219. Monasterio J, Bermudez P, Quiroga D, Francisco E, Meneses B, Montaner J. Plasma thrombin-activatable fibrinolytic inhibitor (TAFI) among healthy subjects and patients with vascular diseases: a validation study. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003;33:382-6.
220. Mosnier LO, Meijers JC, 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.
221. Schroeder V, Kucher N, Kohler HP. Role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with acute pulmonary embolism. *J Thromb Haemost.* 2003;1:492-3.
222. Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277:1021-30.

r LO, Bos R, Bouma BN, Nieuwenhuis HK, Fijnheer R.
-activatable fibrinolysis inhibitor) in acute promyelocytic
518-23.

224. Lai E. Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res.* 2001;11:927-9.

225. Kato T, Akatsu H, Sato T, Matsuo S, Yamamoto T, Campbell W, Hotta N, Okada N, Okada H. Molecular cloning and partial characterization of rat procarboxypeptidase R and carboxypeptidase N. *Microbiol Immunol.* 2000;44:719-28.

226. Sato T, Miwa T, Akatsu H, Matsukawa N, Obata K, Okada N, Campbell W, Okada H. Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not. *J Immunol.* 2000;165:1053-8.

227. Marx PF. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Curr Med Chem.* 2004;11:2335-48.

228. Boffa MB, Reid TS, Joo E, Nesheim ME, Koschinsky ML. Characterization of the gene encoding human TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; plasma procarboxypeptidase B). *Biochemistry.* 1999;38:6547-58.

229. Vanhoof G, Wauters J, Schatteman K, Hendriks D, Goossens F, Bossuyt P, Scharpe S. The gene for human carboxypeptidase U (CPU)--a proposed novel regulator of plasminogen activation--maps to 13q14.11. *Genomics.* 1996;38:454-5.

230. Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, Bulk S, Schneider M, Boffa M, Koschinsky M, van Tilburg NH, Nesheim ME, Bertina RM, Gomez Garcia EB. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood.* 2001;98:1992-3.

231. Gils A, Alessi MC, Brouwers E, Peeters M, Marx P, Leurs J, Bouma B, Hendriks D, Juhan-Vague I, Declerck PJ. Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1122-7.

232. Guimaraes AH, van Tilburg NH, Vos HL, Bertina RM, Rijken DC. Association between thrombin activatable fibrinolysis inhibitor genotype and levels in plasma: comparison of different assays. *Br J Haematol.* 2004;124:659-65.

233. Frere C, Morange PE, Saut N, Tregouet DA, Grosley M, Beltran J, Juhan-Vague I, Alessi MC. Quantification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene polymorphism effects on plasma levels of TAFI measured with assays insensitive to isoform-dependent artefact. *Thromb Haemost.* 2005;94:373-9.

234. Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, Juhan-Vague I. 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.

235. Zidane M, de Visser MC, ten Wolde M, Vos HL, de Monye W, Bertina RM, Huisman MV. Frequency of the TAFI -438 G/A and factor XIII A Val34Leu polymorphisms in patients with objectively proven pulmonary embolism. *Thromb Haemost.* 2003;90:439-45.

id V, Henry M, Juhan-Vague I. Ala147Thr and C+1542G
not associated with a higher risk of venous thrombosis
ost. 2001;86:1583-4.

237. Morange PE, Tregouet DA, Frere C, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P, Cambien F, Tiret L, Juhan-Vague I; The Prime Study Group. TAFI gene haplotypes, TAFI plasma levels and future risk of coronary heart disease: the PRIME Study. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1503-10.

238. C.H. Martini, A. Brandts, E.L.E. de Bruijne, A. van Hylckama Vlieg, F.W.G. Leebeek, T. Lisman and F.R. Rosendaal. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. *British Journal of Haematology.* 2006;134:92. 94.

239. Bouma BN, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost.* 2003;1:1566-74.

240. Mosnier LO, von dem Borne PA, Meijers JC, 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.

241. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1995;74:90-3.

242. Rand MD, Lock JB, van't Veer C, Gaffney DP, Mann KG. Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood.* 1996;88:3432-45.

243. Sakata Y, Loskutoff DJ, Gladson CL, Hekman CM, Griffin JH. Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor. *Blood.* 1986;68:1218-23.

244. Bajzar L, Fredenburgh JC, Nesheim M. The activated protein C-mediated enhancement of tissue-type plasminogen activator-induced fibrinolysis in a cell-free system. *J Biol Chem.* 1990;265:16948-54.

245. Bjorkman JA, Abrahamsson TI, Nerme VK, Mattsson CJ. Inhibition of carboxypeptidase U (TAFIa) activity improves rt-PA induced thrombolysis in a dog model of coronary artery thrombosis. *Thromb Res.* 2005;116(6):519-24. Epub 2005 Mar 17.

246. Nagashima M, Werner M, Wang M, Zhao L, Light DR, Pagila R, Morser J, Verhallen P. An inhibitor of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor potentiates tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis in a rabbit jugular vein thrombolysis model. *Thromb Res.* 2000;98:333-42.

247. Eichinger S, Schonauer V, Weltermann A, Minar E, Bialonczyk C, Hirschl M, Schneider B, Quehenberger P, Kyrle PA. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood.* 2004;103:3773-6.

248. Libourel EJ, Bank I, Meinardi JR, Balje -Volkers CP, Hamulyak K, Middeldorp S, Koopman MM, van Pampus EC, Prins MH, Buller HR, van der Meer J. Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism. *Haematologica.* 2002;87:1068-73.

ombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen and TAFI
nce caused by factor V Leiden mutation. *Thromb Res.*

250. Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood.* 2004;103:2157-61.

251. Verdú J, Marco P, García M.C, Lucas J. TAFI plasma levels are not increased in patients with venous thromboembolic disease and factor V Leiden or prothrombin 20210A mutations. *Med Clin Barc.*2006;23:436.

252. Santamaria A, Oliver A, Borrell M, Mateo J, Belvis R, Marti-Fabregas J, Ortin R, Tirado I, Souto JC, Fontcuberta J. Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels. *Stroke.* 2003;34:2387-91.

253. Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, Campbell W, Kondo I, Kosaka K, Yamamoto T, Okada H. TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction. *Br J Haematol.* 2004;127:440-7.

254. Zorio E, Castello R, Falco C, Espana F, Osa A, Almenar L, Aznar J, Estelles A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. *Br J Haematol.* 2003;122:958-65.

255 Santamaria A, Martinez-Rubio A, Borrell M, Mateo J, Ortin R, Fontcuberta J. Risk of acute coronary artery disease associated with functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor plasma level. *Haematologica.* 2004;89:880-1.

256. Brouwers GJ, Leebeek FW, Tanck MW, Wouter Jukema J, Klufft C, de Maat MP. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thromb Haemost.* 2003;90:92-100.

257. Alacacioglu I, Ozcan MA, Alacacioglu A, Polat M, Yuksel F, Demirkan F, Piskin O, Ozgenc Y, Ozsan HG, Undar B. Plasma levels of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in normal and preeclamptic pregnant women. *Thromb Res.* 2004;114:155-9.

258. Kolaz E., Lewandowski K., Turowiecka A. TAFI in patients with obesity. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1.

259. Yano Y, Kitagawa N, Gabazza EC, Morioka K, Urakawa H, Tanaka T, Katsuki A, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Taguchi O, Sumida Y, Adachi Y. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in normotensive type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:736-41.

260. Saibeni S, Bottasso B, Spina L, Bajetta M, Danese S, Gasbarrini A, de Franchis R, Vecchi M. Assessment of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) plasma levels in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1966-70.

261. Kremer Hovinga JA, Franco RF, Zago MA, Ten Cate H, Westendorp RG, Reitsma PH. A functional single nucleotide polymorphism in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene associates with outcome of meningococcal disease. *J Thromb Haemost.* 2004;2:54-7.

YB, You JY, Lee SC, Hsu HC, Chau WK, Ho CH. Plasma le fibrinolysis inhibitor did not differ in patients with or jagulation. *Ann Hematol.* 2005 ;84:675-80.

263. Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, Kohler HP, Wuillemin WA. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res.* 2006;118:205-12.

264. Saibeni S, Bottasso B, Spina L, Bajetta M, Danese S, Gasbarrini A, de Franchis R, Vecchi M. Assessment of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) plasma levels in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol.* 2004;99:1966-70.

265. Meijers JC, Oudijk EJ, Mosnier LO, Bos R, Bouma BN, Nieuwenhuis HK, Fijnheer R. Reduced activity of TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2000;108:518-23.

266. Antovic J, Schulman S, Eelde A, Blomback M. Total thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen and pro-TAFI in patients with haemophilia A. *Haemophilia.* 2001;7:557-60.

267. Stromqvist M, Schatteman K, Leurs J, Verkerk R, Andersson JO, Johansson T, Scharpe S, Hendriks D. Immunological assay for the determination of procarboxypeptidase U antigen levels in human plasma. *Thromb Haemost.* 2001;85:12-7.

268. Verdú J, Marco P, Benloch S, Sanchez J, Lucas J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD). *Thromb Haemost* 2006;95:585. 6.

269. Needham J, Mahmood A, Taylor J. Hypercoagulability in inflammatory bowel disease. XIX International ISTH Congress. *J Thromb Haemost.* 2003; Supplement 1, P0910.

270. Segev A, Hegele RA, Lau HK, Sparkes JD, Teitel JM, Chisholm RJ, Strauss BH. Thr325Ile polymorphism of the TAFI gene is related to TAFI antigen plasma levels and angiographic restenosis after percutaneous coronary interventions. *Thromb Res.* 2004;114:137-41.

271. Juhan-Vague I, Morange PE, Frere C, Aillaud MF, Alessi MC, Hawe E, Boquist S, Tornvall P, Yudkin JS, Tremoli E, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE; HIFMECH Study Group. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the north and south of Europe: the HIFMECH study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 ;22:867-73.

272. F.W.G.Leebeek, M.P.J.Van goor, A.H.C.Guimaraes, G.J.Brouwers, M.P.M.de Maat, D.W.J.Dippel, D.C.Rijken. High functional levels if thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. *Journal of thrombosis and Haemostasis.* 2005;3:2211-2218.

273. Silveira A, Schatteman K, Goossens F, Moor E, Scharpe S, Stromqvist M, Hendriks D, Hamsten A. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2000;84:364-8.

274. Aubert H, Frere C, Aillaud MF, Morange PE, Juhan-Vague I, Alessi MC. Weak and non-independent association between plasma TAFI antigen levels and the insulin resistance syndrome. *J Thromb Haemost.* 2003;1:791-7.

Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Auteri Heart J. 2002;3:579-86.

276. Aso Y, Wakabayashi S, Yamamoto R, Matsutomo R, Takebayashi K, Inukai T. Metabolic syndrome accompanied by hypercholesterolemia is strongly associated with proinflammatory state and impairment of fibrinolysis in patients with type 2 diabetes: synergistic effects of plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Diabetes Care*. 2005;28:2211-6.

277. Kemmeren JM, Algra A, Meijers JC, Bouma BN, Grobbee DE. Effect of second- and third-generation oral contraceptives on fibrinolysis in the absence or presence of the factor V Leiden mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002;13:373-81.

278. Stewart RJ, Fredenburgh JC, Rischke JA, Bajzar L, Weitz JI. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor attenuates (DD)E-mediated stimulation of plasminogen activation by reducing the affinity of (DD)E for tissue plasminogen activator. A potential mechanism for enhancing the fibrin specificity of tissue plasminogen activator. *J Biol Chem*. 2000;275:36612-20.

279. Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T, Mori Y, Nishikawa M, Gabazza EC, Nobori T, Shiku H. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res*. 2001;104:1-6.

280. Chabloz P, Reber G, Boehlen F, Hohlfeld P, de Moerloose P. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. *Br J Haematol*. 2001;115:150-2.

281. Meijers JC, Middeldorp S, Tekelenburg W, van den Ende AE, Tans G, Prins MH, Rosing J, Buller HR, Bouma BN. Increased fibrinolytic activity during use of oral contraceptives is counteracted by an enhanced factor XI-independent down regulation of fibrinolysis: a randomized cross-over study of two low-dose oral contraceptives. *Thromb Haemost*. 2000;84:9-14.

VIII.A ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos.

AAF: Anticuerpos antifosfolípidos.

ACA: Anticuerpo anticardiolipina.

ACO: Anticoagulantes orales.

Ag: Antigénico.

ANO: Anovulatorios/Anticonceptivos Orales.

AL: Anticoagulante lúpico.

AT-III: Antitrombina III.

CBS: Cistationina B-sintetasa.

CBP: Carboxipeptidasa.

CID: Coagulación intravascular diseminada.

Col.s.: Colaboradores.

CPU: Carboxipeptidasa U.

DD: Dímero-d.

DM: Diabetes Mellitus.

EACA: Ácido épsilon aminocaproico.

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético.

EFG: Factor de crecimiento epidérmico.

EP: Embolismo pulmonar.

ETV: Enfermedad tromboembólica venosa.

FT: Factor tisular.

FVa = FVL = FVLeiden: Factor V Leiden.

GP: Glicoproteína.

HBPM: Heparina de bajo peso molecular.

HCL: Hipercolesterolemia.

HTA: Hipertensión arterial.

IC: Intervalo de confianza.

IMC: Índice de masa corporal.

INR: International Normality Rate.

IVC: Insuficiencia venosa crónica.

kD: Kilodaltons.

Kg/m²: Kilogramos por metro cuadrado.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

mg/dl: Miligramos por decilitro.

MTHFR: Metilen-tetrahidro-folato-reductasa.

Mut: Mutado.

ng/ml: Nanogramos por mililitro.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OR: Odds Ratio.

PAI: Inhibidor del activador de la plasmina.

PC: Proteína C.

PCA: Proteína C activada.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pdb: Pares de bases.

PDF: Productos de degradación de la fibrina.

PI: Plasminógeno.

pl: Plasmina.

PS: Proteína S.

PT 20210 A: Protrombina 20210 A.

RPCA: Resistencia a la proteína C activada.

RR: Riesgo relativo.

SAF: Síndrome antifosfolípido.

Scu-PA: Prourocinasa.

SPT: Síndrome posttrombótico.

Tª: Temperatura.

TAC: Tomografía axial computerizada.

TAFI: Inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina.

TAFIa: Inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina, activado.

TAFIf: Inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina, funcional.

Tcu-PA: Urocinasa.

TEP: Tromboembolismo pulmonar.

TF: Factor tisular.

THS: Terapia hormonal sustitutiva.

TM: Trombomodulina.

TR: Trombina.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada.

TVC: Trombosis venosa cerebral.

TVM: Trombosis mesentérica.

asminogeno tipo urocin.

WT: ÍWild type+

µg/ml: Microgramos por mililitro.

VIII.B INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1. Componentes del sistema fibrinolítico.

Tabla 2. Cuestionario epidemiológico.

Tabla 3. Frecuencias absolutas y relativas de los factores de riesgo adquiridos asociados a ETV en los pacientes.

Tabla 4. Asociación de la presencia de niveles elevados de TAFI sobre el riesgo de padecer ETV.

Tabla 5. Niveles medios de TAFI en pacientes y controles.

Tabla 6. Niveles medios de TAFI en pacientes según las diferentes isoformas del polimorfismo Ala147Thr.

Tabla 7. Niveles medios de TAFI en pacientes según las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile.

Tabla 8. Niveles medios de TAFI en controles según las diferentes isoformas del polimorfismo Ala147Thr.

Tabla 9. Niveles medios de TAFI en controles según las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile.

Tabla 10. Asociación del FVLeiden con los niveles de TAFI medios en pacientes.

Tabla 11. Asociación del FVLeiden con los niveles de TAFI medios en controles.

Tabla 12. Asociación de la PT20210A con los niveles de TAFI medios en pacientes.

Tabla 13. Asociación de la PT20210A con los niveles de TAFI medios en controles.

Tabla 14. Influencia del sexo sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 15. Influencia del sexo sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 16. Influencia de la edad sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 17. Influencia de la edad sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 18. Influencia del tabaco sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 19. Influencia del tabaco sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 20. Influencia de la obesidad sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 21. Influencia de la obesidad sobre los niveles medios de TAFI en controles.

e anovulatorios sobre los niveles medios de TAFI en

Tabla 23. Influencia de la toma de anovulatorios sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 24. Influencia de la DM tipo 2 sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 25. Influencia de la DM tipo 2 sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 26. Influencia de la hipercolesterolemia sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Tabla 27. Influencia de la hipercolesterolemia sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Tabla 28. Asociación de los genotipos del polimorfismo Ala147Thr con el riesgo de padecer ETV.

Tabla 29. Asociación de los genotipos del polimorfismo Thr325Ile con el riesgo de padecer ETV.

FIGURAS

Figura 1. Esquema de la trombofilia como ejemplo de enfermedad multifactorial.

Figura 2. Estudios de laboratorio para el diagnóstico de la trombofilia congénita.

Figura 3. Activación e inhibición del sistema fibrinolítico.

Figura 4. Formación, polimerización y degradación de la fibrina (extraído de [Wikipedia web-encyclopedia](#)).

Figura 5. Representación de la estructura de TAFI activado dilucidada por modelado Molecular (extraída del [Brookhaven Protein Data Bank](#)).

Figura 6. Representación de los principales dominios del TAFI (extraído de [Haematologic Technologies, Inc](#), 57 River Road Essex Junction, VT. USA).

Figura 7. Activación del TAFI por el complejo trombina-trombomodulina.

Figura 8. Localización genómica del TAFI (extraído de [GeneCards Homepage](#), Weizmann Institute of Science).

Figura 9. El TAFI y el sistema de la fibrinólisis.

Figura 10. Papel del TAFI en el modelo de coagulación revisado.

Figura 11. Papel de la trombomodulina en la activación del TAFI. Nexos de unión entre la coagulación y la fibrinólisis (extraído de la revista: *Chest* 2003;124;33-39).

Figura 12. Representación del área de salud nº19 de la Comunidad Valenciana.

Figura 13. Principio de la técnica de determinación de los polimorfismos genéticos del TAFI.

Figura 14. Frecuencias para la edad media de los pacientes.

Figura 15. Distribución de los pacientes por sexos.

Figura 16. Localización de la trombosis venosa.

ETV.

ə.

Figura 19. Frecuencias para los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 20. Frecuencia del FVLeiden en los pacientes y controles.

Figura 21. Frecuencia de la PT20210A en los pacientes y controles.

Figura 22. Frecuencia (%) de los genotipos del polimorfismo Ala147Thr en los pacientes.

Figura 23. Frecuencia (%) de los genotipos del polimorfismo Ala147Thr en los controles.

Figura 24. Frecuencia (%) de los genotipos del polimorfismo Thr325Ile en los pacientes.

Figura 25. Frecuencia (%) de los genotipos del polimorfismo Thr325Ile en los controles.

Figura 26. Distribución de los percentiles de los niveles de TAFI en sujetos sanos.

Figura 27. Niveles elevados de TAFI en pacientes y controles.

Figura 28. Niveles medios de TAFI en pacientes y controles.

Figura 29. Niveles medios de TAFI en pacientes según las diferentes isoformas del polimorfismo Ala147Thr.

Figura 30. Niveles medios de TAFI en pacientes según las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile.

Figura 31. Niveles medios de TAFI en controles según las diferentes isoformas del polimorfismo Ala147Thr.

Figura 32. Niveles medios de TAFI en controles según las diferentes isoformas del polimorfismo Thr325Ile.

Figura 33. Asociación del FVLeiden con los niveles de TAFI medios en pacientes.

Figura 34. Asociación del FVLeiden con los niveles de TAFI medios en controles.

Figura 35. Asociación de la PT20210A con los niveles de TAFI medios en pacientes.

Figura 36. Asociación de la PT20210A con los niveles de TAFI medios en controles.

Figura 37. Influencia del sexo sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 38. Influencia del sexo sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Figura 39. Influencia de la edad sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 40. Influencia de la edad sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Figura 41. Influencia del tabaco sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 42. Influencia del tabaco sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Figura 43. Influencia de la obesidad sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 44. Influencia de la obesidad sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Figura 45. Influencia de la toma de anovulatorios sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

Figura 46. Influencia de la toma de anovulatorios sobre los niveles medios de TAFI en controles.

Figura 47. Influencia de la DM tipo 2 sobre los niveles medios de TAFI en pacientes.

sobre los niveles medios de TAFI en controles.

hipercolesterolemia sobre los niveles medios de TAFI en
pacientes.

Figura 50. Influencia de la hipercolesterolemia sobre los niveles medios de TAFI en
controles.

Figura 51. Correlación entre el dímero-d y el TAFI en los pacientes.

Figura 52. Correlación entre el dímero-d y el TAFI en los controles.



1. Verdú J, Marco P, Benlloch S, Sanchez J, Lucas J. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD). *Thromb Haemost* 2006; 95: 585-6.

Letters to the Editor

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD)

Dear Sir,

We read with great interest a recent publication by Frere, et al. (1) where the authors compare three different antigenic assays for TAFI quantification in plasma and its relationship with TAFI gene polymorphisms.

The clinical role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), a carboxypeptidase-B like proenzyme, remains elusive and still needs to be clearly defined. Investigations have been complicated by the lack of good functional assays and the variability of the results obtained with antigenic assays (relating to the specificity of the antibodies used in assays with the different polymorphic forms of TAFI). Several studies have researched the genotype-dependent variation of TAFI and have shown discrepancies in different ELISA assays (2-4).

Recent reports suggest that variations in TAFI levels can be associated with cardiovascular diseases, stroke and VTD. High plasma levels of TAFI have been reported in coronary artery disease, stroke and venous thromboembolism, and these findings were found to be influenced by TAFI gene polymorphisms (5, 8-10). Our aim was to evaluate an ELISA assay, which shows no variability of antigen TAFI levels depending on the genotype, in healthy subjects.

Patients and methods

For this purpose, between December 2002 and February 2004, we included a Spanish population (122 subjects) in a case-control study to determine plasma levels of TAFI and its relationship with two of its genotypic variations (Ala147Thr and Thr325Ile polymorphisms). Sixty consecutive patients, aged between 18 and 80 years, affected with objectively documented symptomatic VTD of the lower limbs and/or pulmonary embolism and 62 controls, also aged between 18 and 80 years, were matched for sex and age. To be eligible as controls, subjects had to be free of manifest or previous venous thromboembolic or arterial disease. Written informed consent was obtained from all participating subjects. All subjects were Caucasian. DVT, either distal or proximal, had to be confirmed by duplex ultrasonography. Diagnosis of PE was based on a positive helicoidal CT scan, a positive angiography, or a high probability ventilation/perfusion lung scan along with a high clinical probability. TAFI plasma levels were determined by a new polymorphism-independent ELISA assay ("Asserachrom TAFI[®]", Diagnostica Stago, Genevilliers, France), using a new panel of antibodies (anti-TAFI 1b1 and T4E2). Genotypic determination of Ala147Thr and Thr325Ile polymorphisms was performed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction. Statistical analysis was made using SPSS program (v.11.0). A p value < 0.05 was considered as significant.

Results

Table 1 shows the results of plasma TAFI levels in patients, depending on the genotype. Plasma TAFI levels were higher in Thr/Thr 147 genotype carriers (p=0.03).

Table 2 shows the value of plasma TAFI levels in controls, depending on the genotype. No significant differences were observed between all genotypes studied (p=0.2).

Moreover, in patients, TAFI levels above the 90th percentile of the controls (>10.9 µg/ml) increased the risk for VTD 4-fold compared with TAFI levels below the 90th percentile (OR=4.0;

Correspondence to:
José V. Belmar, MD
Haematology Department
General Hospital of Alicante
Maestro Alonso 109
03010 Alicante, Spain
Tel: +34 965 938300, Fax: +34 965 938300
E-mail: pepewer2@mixmail.com

Received September 15, 2005
Accepted after resubmission January 5, 2006

Prepublished online February 10, 2006 DOI 10.1160/TH05-09-0620

Thromb Haemost 2006; 95: 585-6

Genotype	N	TAFI (µg/ml)	P
147Ttr/Ala 147Ab/Ala	43 10	9.8 g/ml 10.8 g/ml	0.03
325Ttr/Thr 325Ttr/Le 325Ile/Le	25 29 7	10.1 g/ml 10.2 g/ml 9.9 g/ml	0.91 (n.s)

Table 2: Genotypes and plasma TAFI levels in controls.

Genotype of controls	N	Median TAFI levels	P
147Ttr/Thr 147Ttr/Ala 147Ab/Ala	16 38 7	8.9 µg/ml 9.1 µg/ml 8.9 µg/ml	0.90 (n.s)
325Ttr/Thr 325Ttr/Le 325Ile/Le	9 31 22	10.1 µg/ml 10.2 µg/ml 9.9 µg/ml	0.33 (n.s)

95% Confidence Interval (CI); 1.4–10.9). Adjustment for conventional risk DVT factors (obesity, smoking, hipercholesterolemia, sex, age and use of oral anticonceptives) did not modify our results in both patients and controls.

Discussion

Most of the presently commercially available antigen assays seemed to be partially dependent on different genotypes, indicating that previous data showing an association between certain genotypes and apparently higher antigen levels are the consequence of differential immunological reactivities of the iso-

forms in these ELISA (11). In light of our results, the ELISA assay “Asserachrom TAFI[®]” does not reflect differences in expression of TAFI levels in control subjects (TAFI levels are polymorphism-independent). Nevertheless, in several studies, this genotype-independent association has not been proved in healthy individuals (6, 7). Furthermore, in VDT patients, Thr147Thr genotype showed a significant increase of TAFI levels. These results agree with the HIFMECH study where TAFI levels were increased in genotype Thr147Thr carriers (1). The association between TAFI levels above the 90th percentile of the controls and the 4-fold increase of the risk for DVT found in our study agree with studies by Eichinger, et al. (9) and Van Tilburg, et al. (10). Eichinger, et al. demonstrated that a high TAFI level in thrombosis patients was associated with a 2-fold higher risk for recurrence of DVT (RR: 1.795% CI, 1.1–2.7) and Van Tilburg, et al. demonstrated that TAFI levels above 90th percentile of the controls increased the risk for thrombosis nearly 2-fold compared with TAFI levels below the 90th percentile (OR: 1.795% CI, 1.1–2.5).

Therefore, we can conclude that the new ELISA assay is safe and not polymorphism-dependent in healthy controls. Besides, TAFI levels above the 90th percentile of the controls increased the risk for VDT 4-fold compared with TAFI levels below the 90th percentile. We believe that new prospective studies must be performed to evaluate these polymorphism-independent TAFI assays, in order to estimate the true contribution of TAFI levels in thromboembolic conditions.

José Verdú¹, Pascual Marco¹, Susana Benlloch², José Sanchez², Javier Lucas¹

¹Sección de Hemostasia y Trombosis, ²Unidad de Investigación, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain

References

- Frère C, Morange PE, Saut N, et al. Quantification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene polymorphism effects on plasma levels of TAFI measured with assays insensitive to isoform-dependent artefact. *Thromb Haemost* 2005; 94: 373–9.
- 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.
- Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, et al. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood* 2001; 98: 1992–3.
- Guimaraes AH, van Tilburg NH, Vos HL, et al. Association between thrombin activatable fibrinolysis inhibitor genotype and levels in plasma: comparison of different assays. *Br J Haematol* 2004; 124: 659–65.
- van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2855–9.
- Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, et al.; HIF-MECH Study Group. 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.
- Tregouet DA, Aubert H, Henry M, et al. Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphisms. *Hum Genet* 2001; 109: 191–7.
- Leebeek FW, Goor MP, Guimaraes AH, et al. High functional levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2211–8.
- Eichinger S, Schonauer V, Weltemann A, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. *Blood* 2004; 103: 3773–6.
- Van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000; 95: 2855–9.
- Gils A, Alessi MC, Brouwers E, et al. Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1122–7.

ASSOCIATION BETWEEN THE THR325ILE AND ALA147THR POLYMORPHISMS OF THE TAFI GENE AND THE RISK OF VENOUS THROMBOSIS DISEASE.

José Verdú*, Pascual Marco*, Susana Benlloch*, Javier Lucas*

*From the Hemostasis and Thrombosis Unit, University General Hospital of Alicante, Alicante, Spain.

Correspondence to José Verdú, Hemostasis and Thrombosis Unit, University General Hospital of Alicante, C/ Maestro Alonso 109 s/n, c.p:03010; Alicante, Spain. E-mail: pepever2@mixmail.com

To the Editor:

Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is a procarboxipeptidase B (proCBP) that is rapidly activated by the thrombin-thrombomodulin complex. ProCBP is transformed into the active enzyme, activated TAFI (TAFIa), by thrombin produced during blood coagulation. TAFIa down-regulates fibrinolysis by removing C-terminal lysine residues from fibrin, and consequently, reduced plasmin production. It has been shown that high plasma antigen (ag) levels of TAFI could be a risk factor for venous thrombosis disease (VTD), ischemic heart disease (IHD) and ischemic stroke (IS)^{1,2}. Numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human gene encoding TAFI have been identified. These SNPs are located in the 5'-flanking region, the protein coding regions and in the region encoding the 3'-untranslated region of the mRNA. Only a few studies have investigated the role of the TAFI gene SNPs in VTD. Recently, R.Y.L Zee and cols. reported a case-control controlled trial in which no evidence for an association between six TAFI SNPs and the risk of VTD was observed³. Other SNPs (-438G>A, +1542C>G and -152A>G, -530C>T, -1925T>C and -1690A>A) have been identified as risk factors for VTD, although the results obtained are still controversial and a clear documentation of this association has not always been established⁴.

We evaluated the contribution of two polymorphism, Ala147Thr (rs n° 3742264A>G) and Thr325Ile (rs n° 2296642C>T), to the risk of DVT using a case-control study with prospective inclusion of the participants. The study was carried out in a Spanish Mediterranean area, in the city of Alicante. The population examined in this study consisted of 131 patients admitted to the University General Hospital of Alicante between January 2002 and December 2005 and 100 age-and-sex matched healthy subjects of the same race and without a history of VTD. Diagnosis of deep venous thrombosis (DVT) was confirmed by a positive report of venous doppler ultrasound or venography, whereas the diagnosis of pulmonary embolism (PE) was confirmed in the presence of either a positive angio-computed tomography or a ventilation/perfusion pulmonary gammagraphy. Genotyping for TAFI polymorphisms was performed by using allele-specific polymerase-chain-reactions (PCR). In the case of Thr325Ile polymorphism PCR was followed by "Spe1-A/CTAG7" restriction digestion. Allele frequencies were estimated by gene counting. Departure from Hardy-Weinberg equilibrium was tested separately in cases and controls and in each population by a chi-square test with one degree of freedom. Determination of antigenic TAFI (TAFIag) was performed using a new commercially available ELISA (TAFI-1B1; Diagnostica Stago, Asnières, France) which has been previously shown to be insensitive to TAFI polymorphisms isoforms⁵. All analyses were performed according to the SPSS 11.0 software. The significance of the differences of observed alleles and genotypes between groups was tested using the χ^2 analysis. ORs and 95% CIs were calculated. For all multivariate analyses, the data were adjusted for potential confounding thrombotic variables, such as age, sex, smoking habit, diabetes or body mass index. Statistical significance was taken at $p < 0.05$.

In our present study, no difference was observed in Ala147Thr and Thr325Ile alleles distribution in subjects with VTD (147Ala/Thr: 0.59/0.41; 325Ile/Thr: 0.30/0.70) compared to controls (147Ala/Thr: 0.61/0.39; 325Ile/Thr: 0.27/0.73), and there were no association between these alleles and TAFIag levels in all subjects. **Table 1** shows the genotype distribution of two polymorphisms. In our study we have founded a higher frequency of 325Thr/Thr genotype in subjects with VTD than in controls (OR:2.1, CI:1.3-3.7; $p=0.006$). When looking at the TAFIag levels, no difference was observed between the two groups of individuals and Ala147Thr ($p=0.291$) or Thr325Ile ($p=0.279$) genotypes.

Little is known globally about the frequency of polymorphisms in the TAFI gene in patients diagnosed of DVT. Recently, C.H.Martini et al, reported that carriers of the 147Ala allele (polymorphism Ala147Thr) which is associated with lower TAFI antigen levels than 147Thr allele, showed an increased risk of VTD. In another study performed in heterozygous Factor V Leiden carriers ($n=313$) from 220 unrelated families diagnosed in 1995-1998, the Ala147Thr alleles frequencies were not significantly different between individuals with or without Venous Thrombosis (VT). In addition, the genotype distribution of the Ala147Thr polymorphism was no different between individuals with or without VTD. In accordance with these findings, R.Y.L Zee et al have founded no evidence for an association of six TAFI gene polymorphisms (rs n°3742266A>G, Thr325Ile, rs n°1548325C>T, rs n°7989892T>C, rs n°1926447C>T and rs n°1049669G>A) and the risk of VTD. Conversely, in our study, we have founded that the 325Thr/Thr genotype of the Thr325Ile polymorphism was associated with increased risk of VTD. Furthermore, we found no statistically significant association

between the genotypes of Ala147Thr polymorphism and VTD risk. To our knowledge, our study is the first to show an association between the 325Thr/Thr genotype and the risk for VTD. In conclusion, our data suggest that 325Thr/Thr genotype might be a possible risk factor for VTD. However, more studies on the relationship between the genetic polymorphisms of the TAFI gene and VTD are warranted.

	Patients (n=131)	Controls (n=100)	*p (95%CI)	**OR
<i>Distribution of genotypes of Ala147Thr polymorphism</i>				
-Thr147Thr	24 (18%)	20 (20%)	0.287	-
-Ala147Thr	66 (51%)	58 (58%)		
-Ala147Ala	41 (31%)	22 (22%)		
<i>Distribution of genotypes of Thr325Ile polymorphism</i>				
-Ile325Ile	14 (10%)	16 (16%)	0.006	2.1 (1.3-3.7)
-Thr325Ile	50 (39%)	51 (51%)		
-Thr325Thr	67 (51%)	33 (33%)		

Table 1. Distribution of Ala147Thr and Thr325Ile TAFI polymorphisms in patients and controls. *p value was considered statistically significant when $p < 0.005$ - **OR were obtained from the χ^2 test and adjusted for DVT risk factors.





CARTAS CIENTÍFICAS

El TAFI antigénico no se encuentra elevado en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa portadores de las mutaciones factor V Leiden o protrombina 20210A

Sr. Editor: La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es un proceso grave y potencialmente mortal, que se caracteriza por la aparición de un trombo formado en el interior del sistema venoso profundo, que puede crecer, fragmentarse y llegar al pulmón provocando una embolia pulmonar. Se considera que la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar son 2 manifestaciones de la misma enfermedad, a la que llamamos ETV¹. Esta es el resultado del efecto combinado de la expresión de ciertos genes y factores de riesgo adquiridos. Las mutaciones del factor V Leiden (FVL) y de la protrombina 20210A (PT20210A) son 2 de los factores de riesgo genético que más se han estudiado en la patología de origen trombotico^{2,3}. Recientemente se ha descrito una proteína que participa en el sistema de la fibrinólisis y cuya elevación plasmática ha demostrado ser un factor de riesgo para la ETV y su recurrencia. Esta proteína se llama TAFI (de *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*, inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina)⁴. Además se ha descrito en algunos trabajos el papel del TAFI en el mecanismo fisiopatológico de las mutaciones FVL y PT20210A, de tal modo que los títulos elevados de dicha proteína podrían contribuir al mecanismo protrombotico de estas alteraciones genéticas^{5,7}. Nuestro objetivo ha sido cuantificar las concentraciones de TAFI antigénico (TAFIag) en pacientes con ETV que además son portadores de las mutaciones FVL y PT20210A, y compararlas con las de personas sin dichas mutaciones.

Se diseñó un estudio de casos y controles que incluyó a 131 pacientes con ETV, con edades comprendidas entre 18 y 80 años y previo consentimiento informado verbal y escrito, y a 100 sujetos sanos escogidos aleatoriamente y pareados por edad, sexo y lugar de residencia. El diagnóstico de ETV se realizó mediante las técnicas eco Doppler venoso, angiografía computarizada pulmonar, venografía o gammagrafía de ventilación-perfusión. Los valores de TAFIag se determinaron mediante la técnica de inmunoensayo independiente del polimorfismo Asserachrom[®] TAFI. El análisis genético del FVL y de la PT20210A incluía la utilización de ADN genómico como molde para la amplificación del fragmento de los genes del FV y de la PT que contienen la mutación. El valor de significación estadística utilizado en los contrastes de hipótesis fue de p inferior a 0,05. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.0.

Las concentraciones plasmáticas medias de TAFIag en los pacientes con ETV fueron más elevadas que en los controles (10,1 frente a 9,1 $\mu\text{g/ml}$; $\text{odds ratio} = 3,06$; $p = 0,0001$). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de TAFIag de los pacientes portadores de la mutación FVL y los que no lo eran, pese a que los de los primeros eran algo superiores ($p = 0,943$). Tampoco observamos diferencias significativas entre las concentraciones medias de TAFI de los pacientes con la mutación PT20210A y los que no la tenían. En este caso, los pacientes sin la mutación presentaban valores más elevados ($p = 0,146$).

La ETV es una enfermedad de etiología multifactorial. Recientemente se está estudiando la

relación existente entre la ETV y una proteína cuya función principal es lisar los residuos carboxiterminales de la plasmina, lo que conduciría a un estado de hipofibrinólisis plasmática⁶. Esta proteína es el TAFI. Uno de los aspectos poco estudiados en relación con este nuevo factor de riesgo es el papel que desempeña el TAFI plasmático en pacientes con ETV que además son portadores de las mutaciones FVL y PT20210A. Alguno trabajo ha intentado implicar a esta proteína en la fisiopatología de la trombosis causada por estas 2 mutaciones, con resultados dispares. En nuestro estudio hemos evaluado la posible situación de hipofibrinólisis mediada por el TAFIag en estos pacientes. Aquellos con ETV que además presentaban una mutación u otra (FVL o PT20210A) no tenían concentraciones medias de TAFI superiores a las de los pacientes con ETV que no presentaban ninguna mutación. Este estudio indicaría que entre los mecanismos por los que se incrementa el riesgo de trombosis en pacientes con ETV que presentan la mutación FVL o la PT20210A no se encuentra un estado de hipofibrinólisis plasmática causado por títulos elevados de TAFIag.

Agradecemos la determinante colaboración técnica de D. José Llorca.

José Verda Belmar, Pascual Marco Vera,
Carmen García Hernández
y Javier Lucas Boronat

Unidad de Hemostasia y Trombosis.
Servicio de Hematología y Hemoterapia.
Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, España.

- Rahimtoola A, Bergin JD. Acute pulmonary embolism: an update on diagnosis and management. *Curr Probl Cardiol*. 2005;30:61-114.
- Gabriel Botella F, Labios Gómez M, Brasó Aznar JV. Trombosis venosa profunda: presente y futuro. *Med Clin (Barc)*. 2000;114:584-96.
- Gallus AS. Management options for thrombophilias. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31:118-26.
- Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem*. 1995;270:14477-84.
- Van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood*. 2000;95:2855-9.
- Libourel EJ, Bank I, Meinardi JR, Balje-Volkers CP, Hamulyak K, Middeldorp S, et al. Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism. *Haematologica*. 2002;87:1013.
- Franco RF, Fagundes MG, Meijers JC, Reitsma PH, Lourenco D, Morelli V, et al. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica*. 2001;86:510-7.

ch ez J, Benlloch S, García M.C, Botella C, Romero A.
antigénico en pacientes con ETV: asociación con los
r/Ile. Un estudio de casos y controles. XLVII Reunión

Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y XXI Congreso de
la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. 2005. Madrid, 27-29 de Octubre.
Sesión Plenaria.

NIVELES PLASMÁTICOS DE TAFI ANTIGÉNICO EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA: ASOCIACIÓN
CON LOS POLIMORFISMOS 147 ALA/THR Y EL 325 THR/ILE. UN
ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES

SP-08

J. Verdu Belmar*, P. Marco Vera*, J. Lucas Boronat*, J. Sánchez**, S. Bellod***,
C. García*, C. Botella Prieto* y A. Romero Casanova*

*Hematología, **Servicio de Medicina Preventiva y Estadística, ***Unidad de Investigación, Hospital
General Alicante. Alicante.

Introducción: El TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) es una procarbopeptidasa de síntesis hepática. Su principal acción la realiza mediante la activación de la trombina, siendo capaz de disminuir la formación de plasmina y conllevando un estado de hipofibrinólisis plasmática. Por todo ello, el aumento de los niveles plasmáticos de TAFI podría aumentar el riesgo de padecer enfermedad tromboembólica venosa (ETV). Estudios recientes han demostrado que niveles elevados de TAFI pueden asociarse con aumento del riesgo de presentar ETV. Se ha visto también que los niveles de TAFI en plasma pueden estar determinados por los polimorfismos genéticos 147 Ala/Thr y 325 Thr/Ile.

Objetivos: Estudiar si los pacientes con niveles elevados de TAFI antigénico, tienen un mayor riesgo de padecer ETV. Analizar si los polimorfismos 147 Ala/Thr y el 325 Thr/Ile modifican los niveles de TAFI antigénico plasmático y por tanto si potencian el riesgo de padecer ETV. Estudiar la distribución por edad y sexo de los niveles de TAFI ag tanto en pacientes como en controles.

Pacientes y métodos: Se han estudiado 37 pacientes consecutivos afectados de ETV, 6 meses después del episodio trombótico y 38 controles sanos. Los niveles de TAFI ag se han determinado mediante la técnica de ELISA ("Asserachrom® TAFI"). Por este novedoso método no se han detectado variaciones de los niveles de TAFI plasmático en función de los polimorfismos presentes en el sujeto. Los polimorfismos genéticos se han realizado por PCR alelo-específica.

Resultados: La edad media de los 75 sujetos fue de 57 años. Los niveles medios de TAFI en pacientes fueron de 10,16 mcg/ml y en los controles de 8,97 mcg/ml. El percentil 90 (p90) de los valores del TAFI en la población control correspondió a 10,50 mcg/ml. El 43% de los pacientes con ETV presentó niveles elevados de TAFI respecto a los controles ($p = 0,009$) y una OR de 4,063. En los pacientes, los niveles medios de TAFI en las mujeres fueron de 10,4 mcg/ml y en los varones de 9,8 mcg/ml ($p = 0,196$). Los niveles medios de TAFI en pacientes con edad igual o menor a 59 años de edad fueron de 10,09 mcg/ml y en pacientes con edad igual o mayor a 60 años fueron de 10,25 mcg/ml, ($p = 0,749$). No hemos encontrado diferencias entre los niveles medios de TAFI ag y su relación con los polimorfismos genéticos en los sujetos estudiados.

Conclusiones: En nuestro estudio, niveles elevados de TAFI ag plasmático multiplican por 4 el riesgo de presentar enfermedad tromboembólica venosa. La técnica de ELISA ("Asserachrom® TAFI") ha demostrado que los niveles medios de TAFI no están determinados por los polimorfismos genéticos del TAFI estudiados (147 Ala/Thr y el 325 Thr/Ile). Estos resultados guardan relación con los últimos datos que aporta la literatura médica. Tampoco hemos encontrado diferencias entre los niveles de TAFI ag en hombres y mujeres.

ero A, Sánchez S, Castaño V. Thrombin activatable
polymorphism and risk for venous thrombosis disease
national Society on Thrombosis and Haemostasis
(ISTH) and 53rd Annual SSC Meeting. 2007. Geneva, Switzerland. July 6-12. Abstract n°
961023.

THROMBIN ACTIVATABLE FIBRINOLYSIS INHIBITOR (TAFI) GENE POLYMORPHISM AND RISK FOR VENOUS THROMBOSIS DISEASE (VTD)

Verdú J.¹, Marco P.¹, Benlloch I.¹, Lucas J.¹

¹Haematology and Haemotherapy, General Hospital of Alicante, Alicante, Spain

Introduction: TAFI is a procarboxipeptidase B activated by Thrombin-thrombomodulin pathway. Activated TAFI reduces plasminogen activation, blocking C-terminal lysine/arginine fibrin residues. High plasma levels of TAFI have been related as a risk factor for VTD, but only a few reports have shown the role of the TAFI gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in VTD. The aim of our study was to establish the relationship between two TAFI gene SNPs and the risk for DVT.

Methods: A prospective case-control study was carried out in a Spanish Mediterranean population. We include 131 unrelated patients (F61/M70) diagnosed of deep venous thrombosis (n=107) or pulmonary thromboembolism (n=24) and 100 age- and sex-matched healthy subjects (F 65/M 66). Excluding criteria: malignancy, pregnancy or acute infectious/inflammatory diseases. Genotypes of Ala147Thr (rs n° 3742264A>G) and Thr325Ile (rs n° 2296642C>T) were performed by using allele-specific digestion of polymerase-chain-reaction products.

Results: The genotype distribution of the Ala147Thr polymorphism was similar in patients with VTD (Thr/Thr147 18.3%, Thr/Ala147 50.3% and Ala/Ala147 31.2%) and in controls (Thr/Thr147 20%, Thr/Ala147 58% and Ala/Ala147 22%), but the frequencies of Thr325Ile polymorphism genotypes were different between cases (Ile/Ile325 10%, Ile/Thr325 40% and **Thr/Thr325 50%**) and healthy subjects (Ile/Ile325 15%, Ile/Thr325 52% and **Thr/Thr325 33%**) (OR:2.1, CI:1.3-3.7; p=0.006). No difference was observed in Ala147Thr and Thr325Ile alleles distribution in all subjects.

Conclusions: These findings suggest that 325Thr/Thr genotype of Thr325Ile polymorphism is associated with an increased risk for DVT. To our knowledge, our study is the first to show this association. Furthermore, we found no association between the Ala147Thr SNP and VTD risk.

cía M.C, Botella C, Fernández P, Romero A, Sánchez
o se encuentra elevado en pacientes con enfermedad
es de las mutaciones factor v leiden o protrombina

20210A. XLVIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y XXII Congreso de la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia. 2006. Granada, 26-28 de Octubre. Póster nº 294.

EL TAFI ANTIGÉNICO NO SE ENCUENTRA ELEVADO EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA
VENOSA PORTADORES DE LAS MUTACIONES FACTOR V
LEIDEN O PROTROMBINA 20210A

P-294

J.J. Verdú Belmar, P. Marco Vera, C. García Hernández, J. Lucas Boronat,
A. Romero Casanova, C. Botella Prieto y S. Sánchez Sánchez

Unidad de Hemostasia y Trombosis. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante.

Fundamento y objetivo: La enfermedad tromboembólica venosa (ETV) es una patología crónica de etiología multicausal. Muchos son los factores de riesgo implicados en su patogenia, incluidas las mutaciones genéticas Factor V Leiden (FVL) y la Protrombina 20210A (PT20210A). Recientemente se ha identificado una nueva proteína llamada TAFI. Niveles elevados de esta proteína se han observado en la enfermedad coronaria, los ictus cerebrovasculares y la ETV. Nuestro objetivo es evaluar los niveles de TAFI en pacientes con ETV y que son portadores o no, de las mutaciones FVL y PT20210A.

Pacientes y métodos: Hemos incluido a 131 pacientes con ETV, diagnosticados en el Hospital General de Alicante y dentro de un estudio casos-contróles. Hemos determinado los niveles de TAFIantigenico (TAFIag) en relación con la presencia o no de las mutaciones FVL o PT20210A en los pacientes.

Resultados: No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los niveles medios de TAFIag de los pacientes que eran portadores de la mutación FVL y los que no lo eran, pese a tener los primeros niveles algo superiores ($p = 0,943$). Tampoco hemos encontrado diferencias significativas entre los niveles medios de TAFI de pacientes que padecían la mutación PT20210A y los que no la padecían. En este caso, los pacientes que no padecían la mutación presentaban niveles mas elevados ($p = 0,146$).

Conclusión: Nuestros resultados sugieren, que dentro de los mecanismos fisiopatológicos de los eventos trombóticos que ocurren en los pacientes con ETV y que además son portadores de alguna de las dos mutaciones genéticas descritas, los niveles elevados de TAFI y su consiguiente estado de hipofibrinólisis, no parecen jugar un papel esencial.

