



**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Medicina**

**TESIS DOCTORAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN
MEDICINA INTERNA**

**DEFICIT DE PROTEINA Z DE LA COAGULACION Y
ANTICUERPOS ANTI-PROTEINA Z COMO FACTORES
DE RIESGO DE RECIDIVA TROMBOTICA ARTERIAL Y
VENOSA. ESTUDIO PROSPECTIVO A LARGO PLAZO.**

José Pardos Gea

Directores tesis:

José Ordi-Ros

Josefina Cortés Hernández

Departamento de Medicina
Universidad Autònoma de Barcelona (UAB) 2015

José Ordi Ros Doctor en Medicina, Facultativo del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Profesor Asociado de la UAB, Coordinador del Área de Investigación en Enfermedades Respiratorias y Autoinmunes Sistémicas del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR) y **Josefina Cortés Hernández** Doctora en Medicina, Especialista en Medicina Interna, e Investigadora de la Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR)

CERTIFICAN:

Como director y co-director respectivamente, que el trabajo titulado:
“Déficit de proteína z de la coagulación y anticuerpos anti-proteína z como factores de riesgo de recidiva trombótica arterial y venosa. Estudio prospectivo a largo plazo” realizado por el licenciado José Pardos Gea, reúne todos los requisitos científicos y formales para proceder a su lectura y defensa como tesis para acceder al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firman el presente certificado en Barcelona a

José Ordi Ros

Josefina Cortés Hernández

AGRADECIMIENTOS

A Brahms, Shumman, Bruckner, Sergiu Celidibache, Rufus Wainwright, Stevie Wonder y otros genios musicales por compartir e inspirar las horas de escritura de esta tesis.

Al servicio de Medicina Interna del Hospital Vall d'Hebrón donde se creó y mantiene un modelo docente, investigador y asistencial de excelencia, que ha marcado a muchas generaciones medicas, y del que estoy agradecido en formar parte.

A Miquel Vilardell, por su afecto y confianza personal desde que nos conocemos.

A mis adjuntos y maestros, ahora compañeros Albert Selva, Roser Solans, Ferran Martínez, Segundo Bujan, Pepe Barbé, Pep Fernández Cortijo, Carmen Pérez, Antonio Sanjose, Vicent Fonollosa, Carmen Simeón, Carmen Alemán, gracias por todo.

A Fina Cortés por su entusiasmo, nivel investigador y orientación en la presente tesis.

A Pep Ordi por cobijarme en ese primer despacho al que ahora ya no sabría llegar en el hospital, por su afecto durante todos estos años, y por guiarme en el mundo de la medicina, la autoinmunidad y la trombosis, fruto de inspiración de la presente tesis.

A la Unidad de Hemostasia y la Dra. Nicolau por su inestimable ayuda.

A Jordi Pérez, amigo y compañero de batallas “domiciliarias” que ha sabido encontrar su camino.

A mis padres y hermana, no solo por lo obvio, sino por todo aquello que siguen dándome de más.

A tu Meritxell, que concentres en la teva persona tot lo que admiro i estimo.

Als meus fills Carla i Marc, petits tresors que brillen dia a dia mes.

ÍNDICE

	Pág.
1 ABREVIATURAS	7
2 INTRODUCCIÓN	8
2.1 Fisiología de la proteína Z (PZ) de la coagulación.....	8
2.1.1 Síntesis y estructura.....	8-10
2.1.2 Función. Sistema proteína Z/proteasa inhibidora dependiente de proteína Z.....	10-19
2.1.2.1 Estudios iniciales	10-11
2.1.2.2 Descripción de la proteasa inhibidora dependiente de proteína Z (ZPI)	11-12
2.1.2.3 Estructura y características del complejo PZ/ZPI.....	12-14
2.1.2.4 Función anticoagulante del complejo PZ/ZPI; interacción PZ/ZPI con factor Xa.....	14-19
2.1.3 Niveles plasmáticos de proteína Z	20
2.1.3.1 Determinantes genéticos (polimorfismos) y adquiridos de su variabilidad.	20-23
2.1.3.2 Correlación con niveles plasmáticos y actividad de ZPI	23-24
2.2 Fisiopatología de la proteína Z de la coagulación.....	25
2.2.1 Modelos animales.....	25-27
2.2.2 Estudios clínicos.....	28
2.2.2.1 Trombosis arterial	28-29
2.2.2.2 Trombosis venosa	30-31
2.2.2.3 Patología gestacional. Anticuerpos anti-proteína Z	32
3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. HIPÓTESIS	33-34
4 OBJETIVOS	35-36
5 MÉTODOS	37
5.1 Población y diseño del estudio. Criterios de inclusión.....	37-38
5.2 Estudios analíticos y pruebas complementarias	38
5.2.1 Proteína Z.....	38-39
5.2.2 Anticuerpos anti-PZ	39-40
5.2.3 Estudio de trombofilia	40
5.3 Evaluación clínica y de factores de riesgo trombótico.....	40-43
5.4 Estadística.....	43

6 RESULTADOS	44
6.1 Evaluación inicial	44
6.1.1 Relación PZ y primer evento trombótico	44-48
6.1.2 Relación anticuerpos anti-PZ y primer evento trombótico	48-49
6.1.3 Correlación anticuerpos anti-PZ y concentración plasmática de PZ	49
6.2 Evaluación prospectiva	50-51
6.2.1 Estabilidad de la concentración plasmática a largo plazo	52
6.2.2 Relación PZ y recidiva trombótica	53-56
6.2.3 Relación PZ y enfermedad arteriosclerótica	56-57
6.2.4 Relación anticuerpos anti-PZ y recidiva trombótica	58
7 DISCUSIÓN	59
7.1 Estableciendo causa y efecto en la asociación déficit de PZ y trombosis	60-69
7.2 Anticuerpos anti-PZ. Algún papel real en trombosis vascular?	70-73
7.3 Limitaciones o sesgos potenciales del estudio	73-75
8 CONCLUSIONES	76
9 BIBLIOGRAFÍA	76-95
10 ANEXOS	96-98

1 ABREVIATURAS

AIT: accidente isquémico transitorio.

AL/aCL: anticoagulante lúpico/anticardiolipina

Anti-PZ: Anticuerpos anti-proteína Z.

AT: antitrombina / antithrombin.

DO: densidad óptica.

EGF: factor de crecimiento epidérmico (EGF) / epidermal growth factor

EPCR: receptor endotelial de la proteína C/endothelial protein C receptor.

Factor Xa: factor X activado.

GLA: ácido gammacarboxiglutamico (GLA) / gammacarboxyglutamic acid.

HNF-4: factor nuclear hepatocítico 4 alfa / hepatocytic nuclear factor 4 alpha

ITB: Índice tobillo-brazo.

KO: knock-out

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa.

PAI-1: activador del inhibidor de plasminógeno 1/ plasminogen activator inhibitor 1.

PAS: presión arterial sistólica.

PC: proteína C / protein C.

PZ: proteína Z / protein Z.

SNP: polimorfismo de nucleótido único/ single nucleotide polymorphism.

tPA: activador del plasminógeno tisular / tissue plasminogen activator.

TEP: tromboembolismo pulmonar.

TVP: trombosis venosa profunda.

UA: unidad arbitraria.

ZPI: Proteasa inhibidora dependiente de proteína Z/Protein Z-dependent protease inhibitor.

2 INTRODUCCIÓN

La respuesta procoagulante está restringida en espacio y tiempo al momento de la lesión vascular por los sistemas anticoagulante y fibrinolítico. La familia más importante de proteínas anticoagulantes es la de las proteasas dependientes de serina o serpinas, como son la antitrombina, la proteína C y el inhibidor de la activación del plasminógeno 1 (PAI-1) [1]. El último sistema de proteínas anticoagulantes descrito en humanos ha sido el de la proteína Z (PZ) [2] y la proteasa inhibidora dependiente de proteína Z (ZPI) [3], motivo de nuestra investigación y desarrollo de esta tesis.

2.1 Fisiología de la proteína Z de la coagulación.

2.1.1 Síntesis y estructura.

La PZ de la coagulación fue inicialmente descrita en 1977 en su forma bovina [4] por Prowse y Esnouf en el proceso de descripción de otras proteínas vitamina K dependientes y se nombro como z al ser la última en la columna de cromatografía [5]. La forma humana fue descrita por Broze en 1984 [2].

La PZ humana es sintetizada en el hígado mayoritariamente [6], sin acuerdo sobre una posible síntesis en células endoteliales vasculares [7,8]. El gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 13q34 [9]. Se trata de una glicoproteína de una sola cadena de 360 aminoácidos con 62KDa con una semivida de 2,5 días [10]. Su síntesis vitamina K dependiente, como lo son la trombina, el factor VII, XI, X y la proteína C,

le confiere como a estas la característica presencia del dominio N-terminal de ácido gammacarboxiglutamico (GLA), esencial para la unión a los fosfolípidos de membrana dependiente de calcio; a diferencia de ellas la PZ posee 13 residuos GLA (Figura 1) uno más que las otras proteínas de la coagulación vitamina K dependientes, importante característica que determina una velocidad de unión a fosfolípidos de membrana 100 veces menor [11]. Los tres dominios restantes son dos dominios del tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF1 y EGF2), y un dominio pseudo-catalítico sin actividad proteolítica (Figura 2) La falta de histidina y serina (substituidos por treonina y alanina respectivamente) en el dominio impide a la PZ tener actividad proteasa, a diferencia del resto de proteínas de la coagulación vitamina K dependientes [12-15].

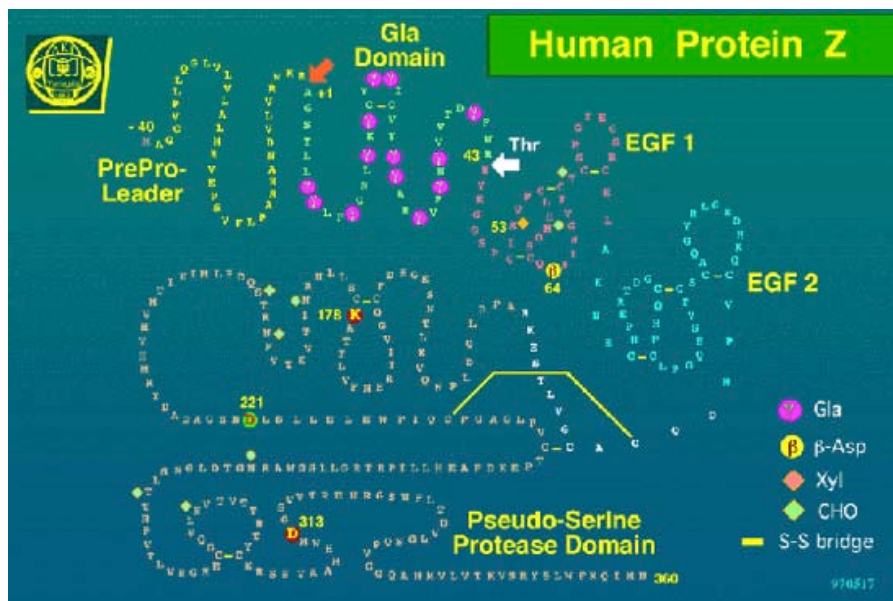


Figura 1. Proteína Z humana, estructura secundaria.

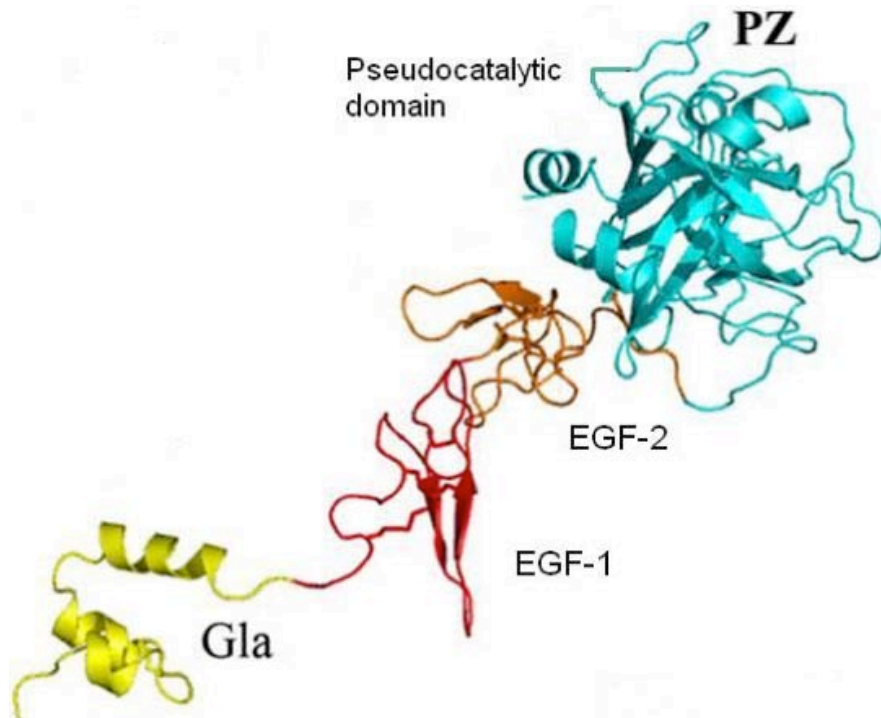


Figura 2. Proteína Z humana, estructura terciaria

2.1.2 Función. Complejo proteína Z/proteasa inhibidora dependiente de proteína Z (PZ/ZPI)

2.1.2.1 Estudios iniciales

Desde la descripción inicial de la PZ bovina en 1977 se tardaron bastantes años en publicarse estudios sobre su función fisiológica. A principios de los años 90 estudios in vitro objetivaron como la PZ bovina se unía a la trombina (factor II) y promovía su unión a fosfolípidos de membrana [16], por lo que se pensó en una actividad procoagulativa de la misma. Esta idea pareció corroborarse clínicamente en humanos ya que los primeros casos de déficit de PZ descritos en la literatura se asociaban a fenómenos hemorrágicos [17,18,19], y en alguno de estos casos se uso con éxito el complejo protrombínico sustitutivo, donde se pudo aislar la presencia de PZ [20].

Durante cierto tiempo se creyó a la PZ como una proteína procoagulante. La demostración por parte de Hogg et al [21] que la PZ humana, a diferencia de su homóloga bovina, no poseía la capacidad de unión a trombina y por lo tanto de esta a membranas fosfolípídicas y estudios clínicos como el de Gamba et al [22] que no confirmaba la relación entre déficit de PZ y hemorragia iniciaron el cambio de tendencia en la idea de la funcionalidad de la PZ.

2.1.2.2 ZPI.

El paso definitivo para entender la actividad de PZ en la coagulación humana llegó de la mano del grupo de Han y Broze que objetivamente como la incubación de PZ con factor X activado (Xa), cefalina y calcio prolongaban el tiempo de coagulación en muestras deficientes de factor X. En la investigación siguiente este mismo grupo pudo identificar que la acción inhibidora del factor Xa la realizaba una proteasa que actuaba únicamente en presencia de PZ, fosfolípidos y calcio, llamándola proteasa inhibidora dependiente de proteína Z o ZPI [3].

Se trata de una proteasa de síntesis hepática y cuyo gen reside en el cromosoma 14q32.1. [23,24]. Su estructura aminoacídica contiene 423 residuos, con un peso molecular de 72 KDa y presenta una homología de entre el 35-50% con otras proteasas de la familia de las serpinas. En humanos y ratones el residuo primario aminoácido (P1) que ocupa el centro de la zona catalítica en la ZPI es una tirosina, a diferencia de otras proteasas (Figura 3). Su síntesis no es vitamina K dependiente.

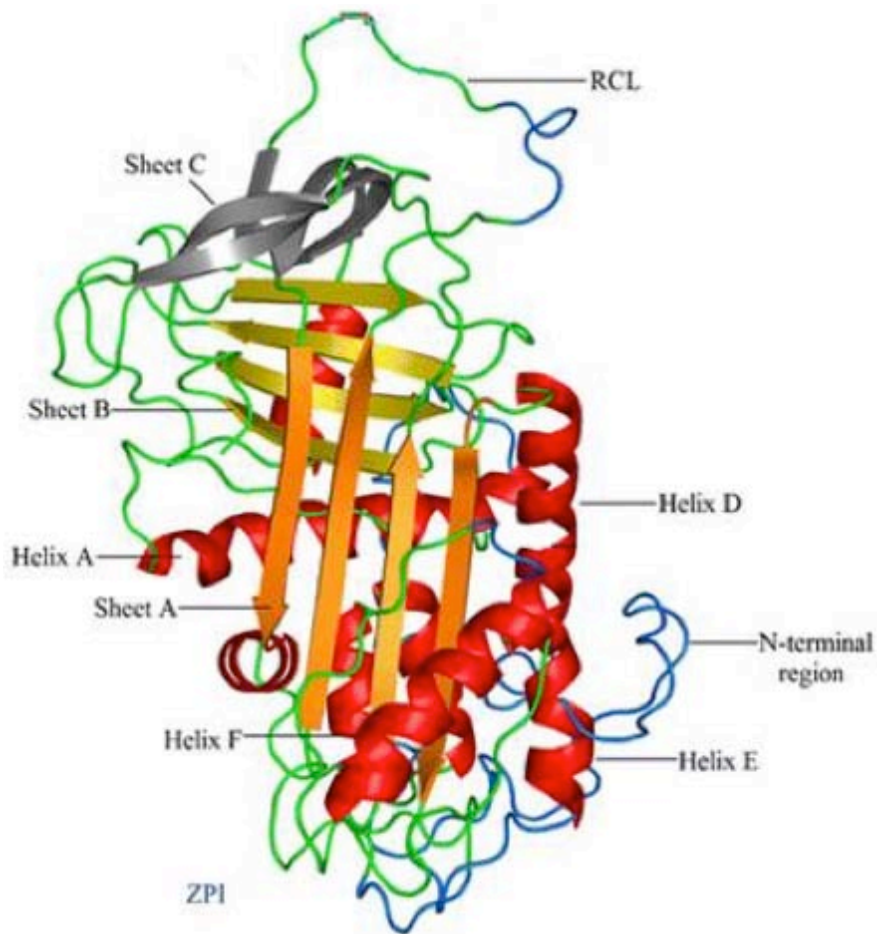
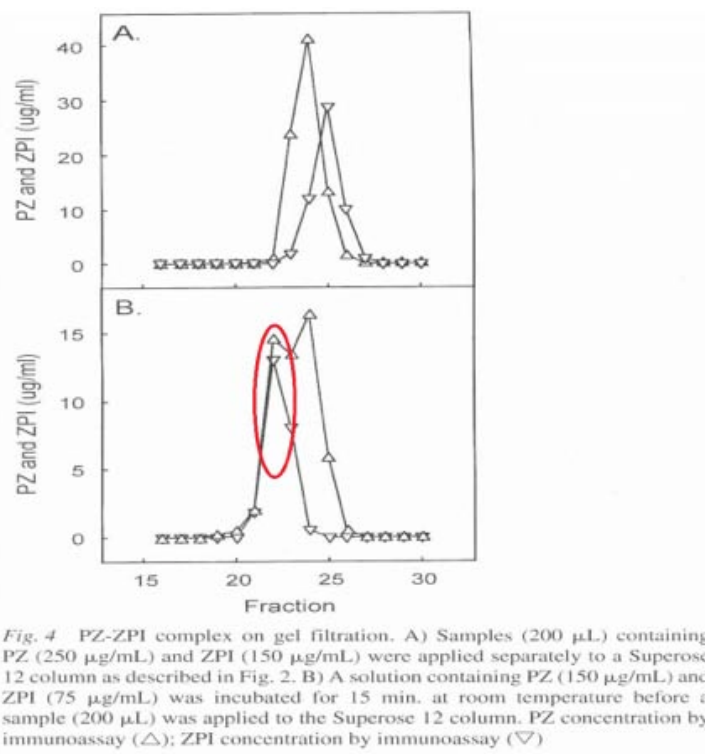


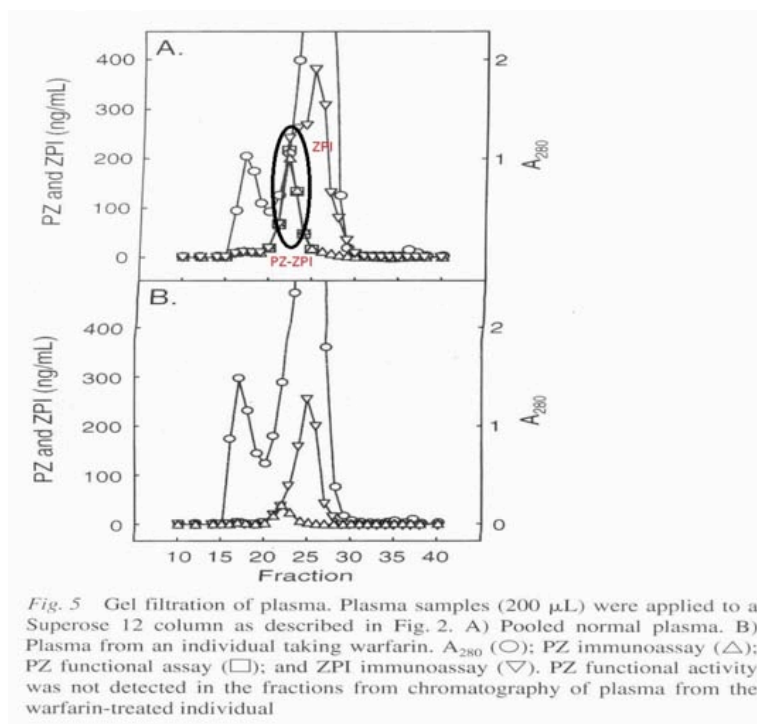
Figura 3. ZPI humana, estructura terciaria

2.1.2.3 Estructura y características del complejo PZ/ZPI

En el año 2001, Tabatabai et al [26], realizando estudios de purificación de PZ y ZPI, hacen la primera demostración grafica in vitro de la interacción entre ambas, tras constatar en cromatografía de gel la aparición de una columna de peso molecular superior (150 KDa o fracción 22, elipse roja en Gráfica 1) correspondiente al complejo PZ/ZPI, solo si ambas proteínas se incubaban previamente durante 15 min. Estos mismos autores demuestran que en plasma en situación fisiológica la práctica totalidad de la PZ plasmática se encuentra unida a la ZPI formando una estructura dimérica PZ-ZPI estable (elipse negra en Grafica 2), con un exceso de ZPI no unido a PZ.



Grafica 1. Interacción PZ/ZPI, primera evidencia in vitro



Grafica 2. Complejo PZ/ZPI en plasma, primera identificación

En los últimos años se han descrito las peculiaridades de la interacción PZ/ZPI [27-31]. En PZ los residuos aminoacídicos His-210, Arg-212, Arg 298 en el centro C-terminal pseudo-catalítico interaccionan con varios residuos en hélix G y A de ZPI, el más relevante de los cuales es Asp-293 por ser la base en la fuerza de la unión (Figura 4). Más recientemente se ha demostrado como ZPI también interacciona mediante residuo Tyr -240 con una cavidad hidrofóbica en dominio EGF-2 de PZ.

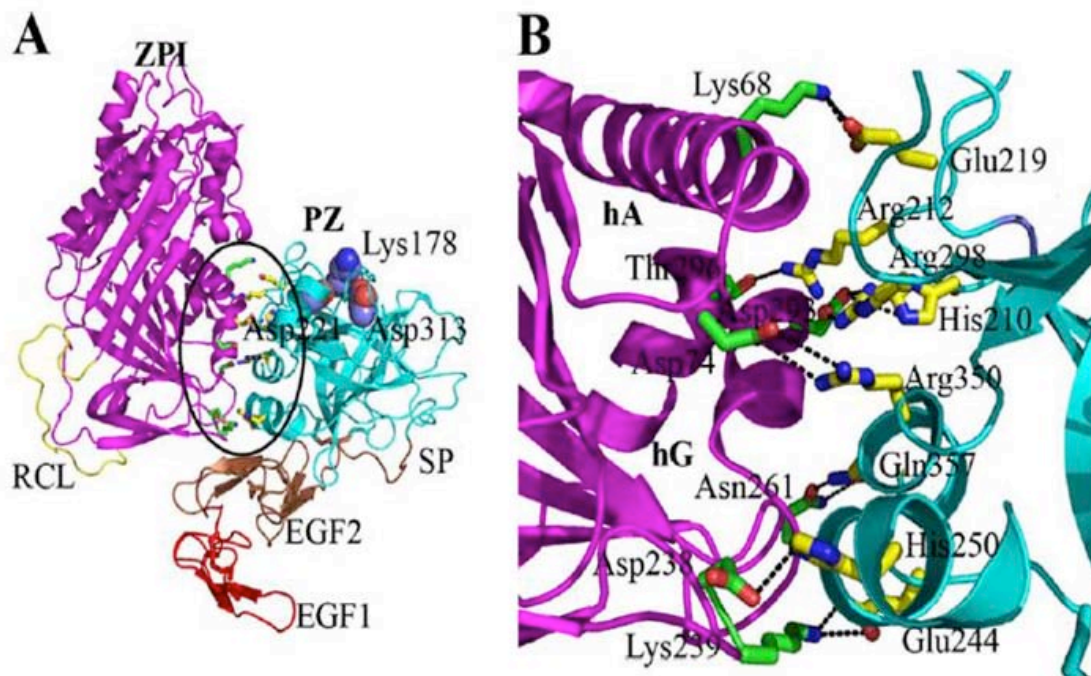


Figura 4. Complejo PZ-ZPI. Estructura terciaria (A) con dominios de interacción (circulo en A, detalle en B).

2.1.2.4 Función anticoagulante del complejo PZ/ZPI; interacción PZ/ZPI y factor Xa.

La primera evidencia documentada de la actividad cofactor de la PZ sobre la ZPI se refleja en los estudios de Han a principios del 2000 [3,25]. In vitro se objetivó como la PZ incrementaba en 1000 veces la acción inhibitoria de la ZPI sobre el factor Xa, en presencia de calcio y cefalina (Gráfico 3). En otros sistemas anticoagulantes cofactor-proteasa humanos (Tabla 1) también se han calculado los ratios en los que los cofactores incrementan la actividad de las proteasas, siendo el calculado para PZ el mayor de todos.

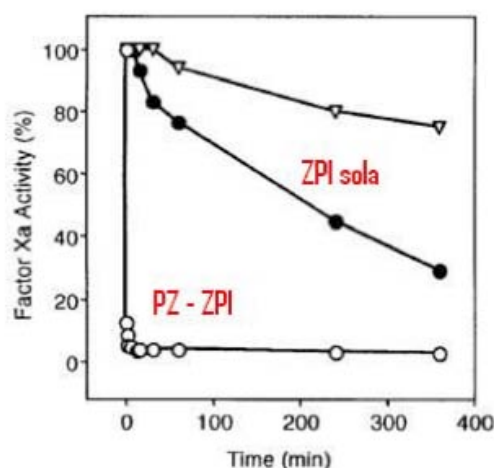


Figure 1. Inhibition of factor Xa by ZPI. ZPI inhibition of factor Xa is shown in the presence and absence of PZ. Mixtures containing factor Xa (5 nmol/L), phospholipids (15 μmol/L), CaCl₂ (4 mmol/L), with or without PZ (40 nmol/L), were constructed in HSA at room temperature, and the reaction was initiated by the addition of ZPI (60 nmol/L). Samples were removed at various times and diluted in HSA, and remaining factor Xa activity was determined by coagulation assay. ▽, without PZ or ZPI; ○, ZPI with PZ; and ●, ZPI without PZ.

Grafico 3. Función cofactor de PZ sobre ZPI en la inhibición de factor Xa.

Tabla 1. Principales sistemas anticoagulantes cofactor- proteasa humanos.

<i>COFACTOR activador</i>	<i>RATIO</i>	<i>PROTEASA anticoagulante</i>	<i>DIANA</i>
Heparina Glucolípidos de membrana en endotelio vascular	x300	Antitrombina	Factor Xa
Proteína S Trombomodulina Endothelial protein C receptor	x140	Proteína C	Factor Va y VIIIa
Vitronectina	x200	PAI-1	tPA
Dermatan sulfato Heparina		Heparin cofactor II	Trombina
Proteína Z (Fosfolípidos membrana en plaquetas + Calcio)	x1000	ZPI	Factor Xa
Heparina	x100		

PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1. tPA; tissue plasminogen activator

Las proteasas por tanto tienen poca actividad sin la presencia de los cofactores, como la antitrombina, que inhibe escasamente al factor Xa si no existe una lesión del endotelio vascular con exposición de glucolípidos tipo glucosaminoglicanos, hecho que limita la actividad anticoagulante a la zona de lesión [32]. El complejo PZ/ZPI

no inhibe ningún otro factor de la coagulación. La molécula de ZPI sola si puede, de manera independiente de PZ, fosfolípidos o calcio, inhibir a los factores XIa y IXa [33], a nivel práctico esta actividad es escasa ya que ZPI está casi en su totalidad unida a PZ en situación normal y la forma libre suele ser una forma inactivada tras haberse liberado de su unión inhibidora al factor Xa.

A nivel fisiológico cuando se produce la activación intrínseca o extrínseca de la coagulación en un punto del torrente sanguíneo se forman factor Xa y Va. Ambas proteínas se forman localmente en la lesión pero pueden viajar a distancia vía torrente sanguíneo a otras zonas y en estas provocar activación de la cascada coagulación con trombosis consecuente. El control tanto local como a distancia de factor Xa lo llevan a cabo de manera coordinada el sistema PZ/ZPI y la antitrombina (Figura 5) [34,35]. En ambos casos se inhibe el factor Xa antes que este forme parte del complejo protrombinasa. La antitrombina inhibiría factor Xa más frecuentemente sobre la superficie del endotelio vascular dañado, y el complejo PZ/ZPI lo harían en la superficie plaquetar y torrente sanguíneo [36-38].

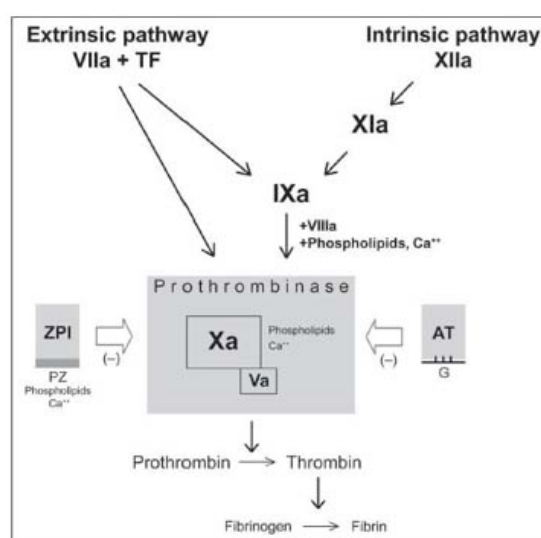


Figura 5. Acción anticoagulante del complejo PZ/ZPI

El complejo PZ/ZPI, como dímero en la circulación, tiene poca afinidad por el factor Xa circulante debido a que el centro de la zona catalítica de la ZPI tiene un residuo tirosina, aminoácido que no tienen otras serpinas proteasas, y que le confiere esta característica. Esto asegurará que ZPI necesite para realizar su efecto anticoagulante al cofactor PZ. El efecto cofactor que tiene la PZ sobre la ZPI se basa en su anclaje inicial a la membrana y al factor Xa (Figura 6 esquema A), mediante el cual consigue aproximar a la proteasa hasta el factor Xa unido a la membrana fosfolipídica (Figura 6 esquema A y B) [28]. Esto permitirá que ZPI este durante un mayor periodo de tiempo unido al factor Xa y consiga completar correctamente su acción proteolítica. Este mecanismo de acción de la PZ, definido por algunos autores como de anclaje, es el mismo que usa la vitronectina con la PAI-1 [39]. La actividad cofactor de la PZ no produce en cambio ningún cambio conformacional en la molécula de ZPI o mecanismo alostérico, modo de acción que si usa heparina sobre la antitrombina. Desde hace poco sabemos que heparina, actuando sobre un sitio diferente que PZ en ZPI, puede incrementar la acción de ZPI en 20-100 veces, tanto sobre el complejo PZ/ZPI contra factor Xa, como ZPI sola en su actividad inhibidora de factor XIa [40]

Una vez formado el complejo PZ/ZPI/Factor Xa sobre la membrana fosfolipídica plaquetar se produce el efecto anticoagulante al impedirse y retrasarse la incorporación del factor Xa al complejo protrombinasa [25]. Posteriormente se liberara la ZPI por dos motivos; primero por la disminución de la afinidad de su unión con PZ, mecanismo aun desconocido [41, 31] y por que la unión ZPI-Xa es inestable. Esta ZPI liberada o “cleaved” al no estar unida a la PZ posee escasa afinidad y actividad frente al factor Xa (Figura 7).

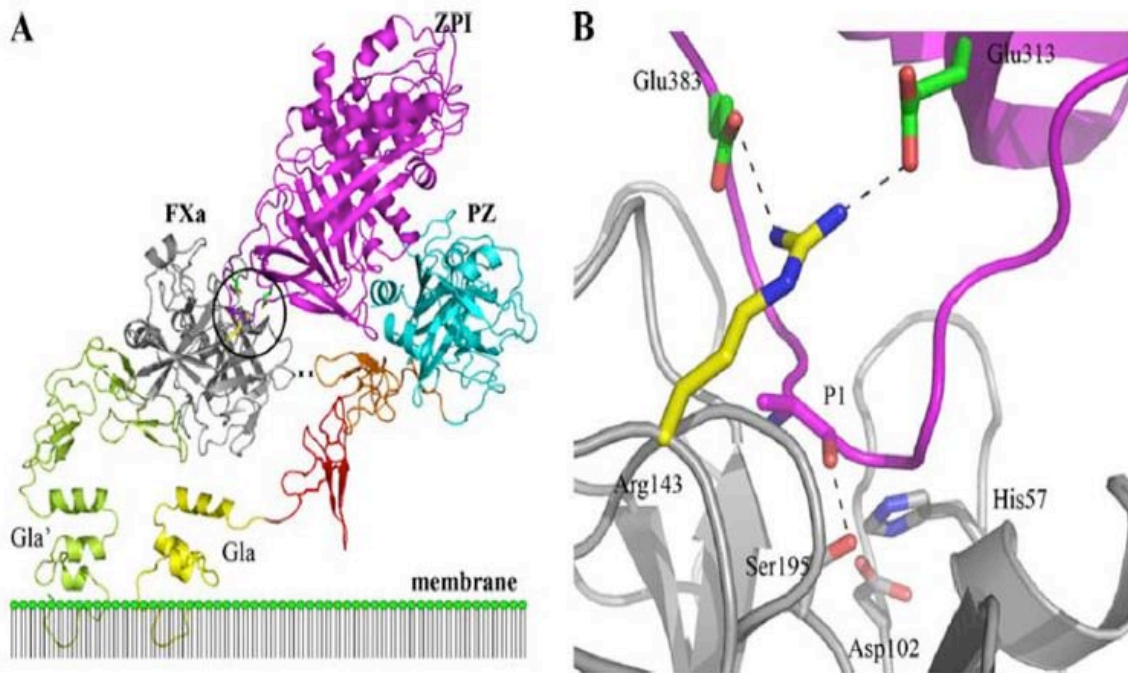


Figura 6. Complejo PZ-ZPI-Xa. Estructura terciaria (A) con dominios de interacción ZPI-Xa (círculo en A, detalle en B) e interacción PZ-Xa (puntos)

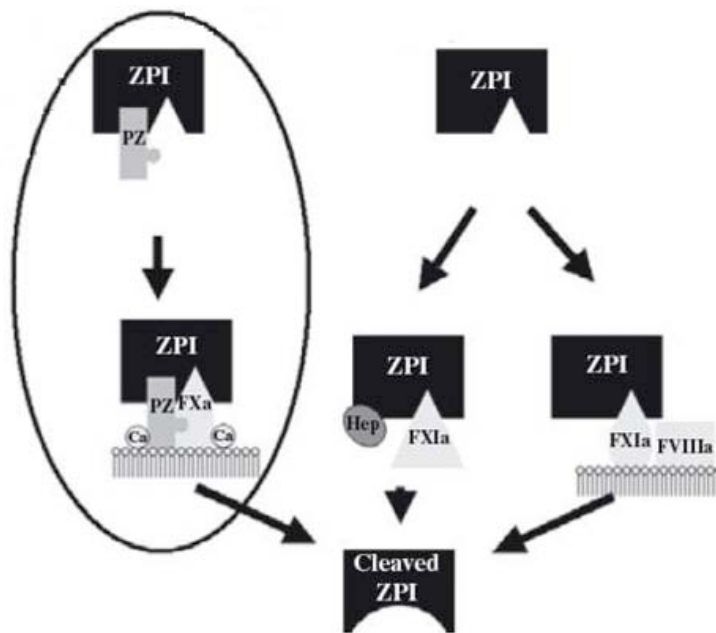


Figura 7. Función anticoagulante del complejo PZ-ZPI y ZPI sola

2.1.3 Niveles plasmáticos de PZ.

2.1.3.1 *Determinantes genéticos (polimorfismos) y adquiridos de su variabilidad.*

Los niveles plasmáticos de PZ se incrementan progresivamente desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en el que alcanzan el nivel de adulto [10,42]. En la población general sana adulta la concentración de PZ no parece variar con la edad [10] ni con el género, aunque algún estudio sugiere que los hombres presentarían niveles más elevados [18,43]. Los estudios en población general sana demuestran una gran variabilidad interindividual en el rango plasmático de PZ (Tabla 2) [44-47], llegando desde el 32 al 168% de la media [10] para una misma población. La determinación de la concentración plasmática de PZ se realiza mediante ELISA con anticuerpos anti-PZ y en el mercado existen dos test aprobados para fines de investigación; Asserachrom Protein Z (Diagnostica Stago Inc, USA) y Zymutest Protein Z (HYPHEN BioMed, France). La variabilidad en población sana no puede ser explicada por el uso de distintos métodos de determinación plasmática de PZ, ya que casi todos los estudios han usado el mismo. Además del amplio rango normal en una misma población, encontramos diferencias significativas entre distintos países [48-50], como por ejemplo un estudio en población de Australia versus otro en Uruguay (media concentración plasmática PZ 1,16 versus 2,71 microg/ml respectivamente) mientras que otros estudios han encontrado diferencias entre afroamericanos y blancos americanos [51]. Estos datos han hecho plantear un factor étnico-genético como causa de la variabilidad.

Tabla 2. Concentración plasmática de PZ en sujetos sanos.

Number of subjects	Mean \pm SD (range), $\mu\text{g/mL}$	Assay	Reference
88	2.29 \pm 0.64 (1.01–3.57)	Asserachrom Protein Z, Diagnostica Stago, USA	Vasse et al (15)
125	1.77 \pm 0.61 (ND)	Asserachrom Protein Z	van Goor et al (16)
443	1.79 \pm ND (0.25–7.82)	Asserachrom Protein Z	Martinelli et al (17)
197	1.44 \pm 0.64 (0.21–3.44)	Asserachrom Protein Z	Santacroce et al (18)

ND No data

El gen de la PZ, localizado en el cromosoma 13, región q34, consiste en 9 exones. El control de la expresión génica depende del factor nuclear hepatocítico 4 alfa (HNF-4a) y Sp1 [52]. Se conocen un elevado número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen de la PZ en la población normal, habiéndose descrito hasta ahora más de 100. En un estudio de 95 donantes sanos se identificaron recientemente 14 SNP y se definieron hasta 10 haplotipos [53]. Los estudios han identificado a varios SNP que influyen en los niveles plasmáticos de PZ. Los más frecuentes son en la región promotora de transcripción -13 A>G y en intrón F 79 G>A, siendo los portadores de los infrecuentes genotipos -13 GG y 79 AA los asociados una más baja concentración de PZ [43,47, 54, 55]. Otro SNP menos frecuente, el del intrón C -42 G>A también se ha asociado a un descenso de niveles de PZ [47]. Finalmente se han descrito casos puntuales de mutaciones en el dominio GLA de la PZ (substitución de GLA por lisina), que comportan un déficit severo de su secreción [56,57].

Uno de los factores adquiridos que más frecuentemente influirá en el nivel plasmático de PZ será el uso de anticoagulantes orales anti vitamina-K, disminuyéndolo entre un 1-16% de la media poblacional [10]. La hepatopatía cirrótica por un mecanismo similar se asociara a disminución de PZ [58]. En la Tabla 3 se listan otras situaciones patológicas en las que se ha constatado un descenso en la concentración plasmática de PZ [5, 59-62]. En la mayoría de estas otras patologías se desconoce el mecanismo fisiopatológico que provoca este descenso.

El proceso inflamatorio se ha intentado relacionar en algunos casos, aunque existen resultados contradictorios respecto a su influencia en el nivel de PZ. Estudios clínicos iniciales en tumores hematológicos y fase aguda de isquemia coronaria sugerían que la PZ era un reactante de fase aguda negativo al descender con el incremento de la IL-6 [63] y del fibrinógeno [64]. Estudios clínicos en fase aguda de evento isquémico coronario [65] y cerebral [48] objetivaron resultados contrapuestos con un incremento de los niveles de PZ, a modo de reactante de fase aguda positivo, pero sin poder corroborar esta hipótesis al no encontrar relación con IL-6. El primer estudio in vitro que analizó la síntesis (proteica y expresión RNAm) de PZ tras la estimulación con citoquinas (IL-1, TNF-alfa, IL-6, IL-4, TGF-Beta) no demostró relación positiva ni negativa [66]. En un estudio posterior por el mismo equipo [7] únicamente se demostró un discreto incremento de la síntesis de PZ en endotelio, no a nivel hepático, por una citoquina de la familia de la IL-6. En un reciente estudio en modelo murino se ha demostrado que PZ no es un reactante de fase aguda [67]. De momento el proceso inflamatorio no se cree sea uno de los motivos que explique el amplio rango de normalidad en sus niveles en la población general.

Pocos son los factores conocidos que incrementan los niveles de PZ, entre los más prevalentes los anticonceptivos orales [68] e hipertrigliceridemia [69]. Respecto a la gestación aunque algún estudio había establecido un incremento gradual de la concentración de PZ plasmática [70] con normalización en el puerperio, otros dos estudios no corroboran este comportamiento [71,72].

Tabla 3. Factores adquiridos que influyen en la concentración plasmática de PZ.

<i>Disminuida</i>	<i>Incrementada</i>
Antagonistas vitamina K	Anticonceptivos orales
Hepatopatía	Hipertrigliceridemia
Colitis isquémica	
Síndrome nefrótico	
Insuficiencia renal avanzada	
Talasemia	
Neoplasia avanzada	
CID	
Pre-eclampsia	
SAF/Sneddon	

2.1.3.2 Correlación con niveles plasmáticos y actividad de ZPI

Aunque son pocos los estudios que han evaluado la concentración plasmática de ZPI en situaciones patológicas y de normalidad [26,68,51,73], estos han proporcionado importante información respecto a su relación con PZ. Los niveles plasmáticos de ZPI en los estudios publicados se realizaron mediante un home made-ELISA policlonal-monoclonal descrito por Tabatai et al [26], existiendo actualmente varios kit ELISA

comercializados. Por otra parte, solo en uno de los estudios se determinó la actividad de ZPI (mediante estudio coagulométrico anti-XI) [73].

La primera conclusión es que los niveles plasmáticos de PZ y ZPI están interrelacionados, hallazgo fácilmente explicable al ser un complejo dimérico PZ-ZPI en plasma, con solo una parte de ZPI libre. Podemos ver como los niveles de ambos disminuyen con dicumarínicos y se incrementan con anticonceptivos orales en la misma proporción [68]. Además, modelos murinos de delección génica de PZ y ZPI, también corroboran este hecho, observando como por ejemplo en ratones con déficit homocigoto de PZ la ZPI disminuye hasta el 70% del valor respecto a ratones normales [74,75]. En segundo lugar, se constata como la concentración y la actividad anticoagulante de ZPI presentan una correlación completamente lineal (Figura 8) [73].

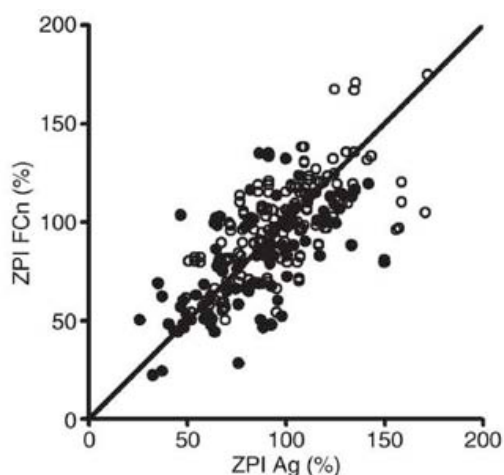


Figura 8. Análisis de correlación entre concentración (ZPI Ag) y actividad ZPI (ZPI FCn)

Estos datos apoyarían la idea de que únicamente determinando la concentración plasmática de PZ podríamos evaluar de manera fiable la capacidad anticoagulante del sistema PZ-ZPI, ya que además como sabemos, la molécula ZPI sola esta en baja concentración en plasma y posee escasa actividad anticoagulante contra factor Xa.

2.2 Fisiopatología de la proteína Z de la coagulación.

2.2.1 Modelos animales.

El primer modelo animal que estudio el fenotipo asociado a un déficit de PZ fue publicado en el año 2000 [74]. Los autores produjeron cepas murinas con deleciones génicas para PZ, combinándolas también con ratones con Factor V Leyden. Objetivaron que los ratones con deleción homocigota para PZ sin otro factor trombofílico añadido tenían un fenotipo normal, a diferencia de lo que pasa con el déficit de proteína C donde se presenta una CID. Pero cuando se estudiaron ratones con Factor V Leiden homocigotos que además poseían diferentes genotipos para déficit de PZ, homo (-/-), hetero (+/-) y normales (+/+), se incremento la mortalidad de los mismos sobretodo con el déficit homocigoto (Figura 9).

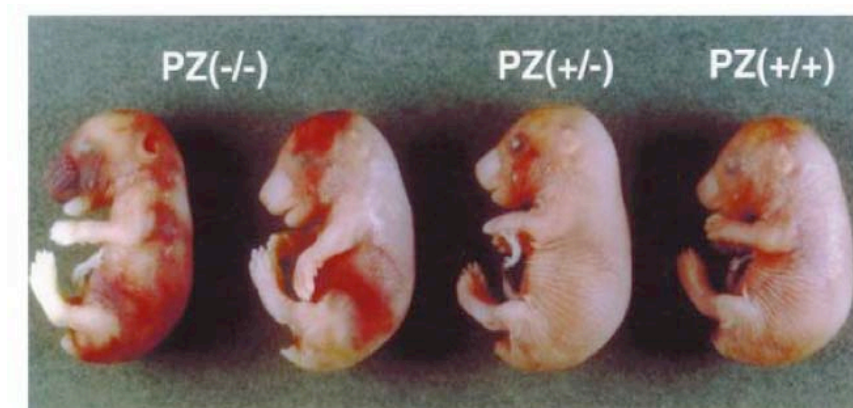


Figura 9. Fenotipos murinos en modelos con Factor V Leiden y diferentes genotipos de PZ.

En un segundo estudio publicado en 2008 se determinaron y compararon los fenotipos de modelos murinos con déficit de PZ y ZPI [75]. Se produjeron cepas con déficit heterocigoto (Het) y homocigoto (Knock-out o KO) para ambas proteínas y se compararon con cepas de ratones normales (Wild-type o WT) en dos modelos de

trombosis venosa y arterial. Se objetivó como las cepas PZ KO y ZPI KO presentaban mayor grado de mortalidad por tromboembolismo pulmonar (TEP) y mayor grado de oclusión trombótica arterial en dos modelos de trombosis inducida, respecto ratones con niveles normales de ambas proteínas, y, sin diferencias entre PZ y ZPI (Figura 10).

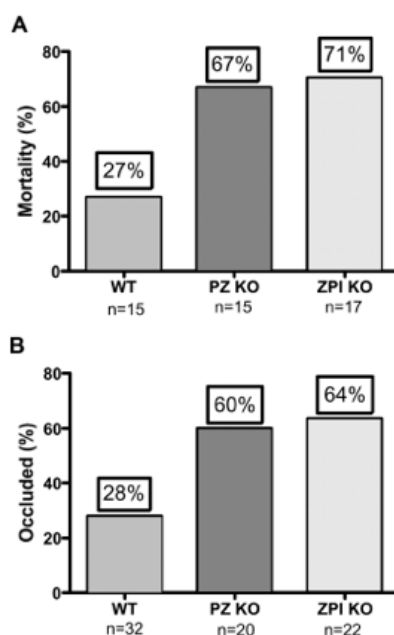


Figura 10. Mortalidad por TEP (A) y grado de oclusión trombótica arterial (B) para fenotipos Knock-out murinos PZ y ZPI.

En este mismo estudio se comprobó que, en combinación con un genotipo homocigoto de Factor V Leiden, tanto el déficit de PZ como el ZPI incrementaban significativamente la mortalidad de estos ratones dentro de las primeras 6 semanas de vida (Tabla 4, en rojo). A diferencia del déficit de PZ que se ha constatado que produce un incremento de la mortalidad que parece exclusivamente perinatal, en el caso de los ratones con déficit ZPI también se incrementa la mortalidad durante la gestación (Tabla 4, en verde). Este hecho, junto a la constatación de que los ratones con genotipo heterocigoto

Factor V Leiden incrementan mortalidad en casos de asociarse a déficit de ZPI pero no de PZ (Tabla 4, en azul), ha hecho que algunos autores consideren que el genotipo homocigoto de déficit de ZPI producirá un fenotipo más grave trombótico que el déficit de PZ. Un reciente estudio ha corroborado este hecho en un modelo murino de sepsis [76].

Tabla 4. Supervivencia de los ratones con deleciones génicas de ZPI y PZ.

Table 1. Survival of ZPI and PZ gene-deleted mice

Mating pairs	ZPI, N (%)	PZ, N (%)	ZPI vs PZ
Het × Het			
6 weeks			
WT	116 (30)	157 (27)	
Het	194 (50)	309 (52)	
KO	75 (20)	126 (21)	
<i>P</i>	.013	.111	.448
FV(ΔΔ)/Het × FV(ΔΔ)/Het			
6 weeks			
FV(ΔΔ)/WT	23 (77)	24 (67)	
FV(ΔΔ)/Het	7 (23)	12 (33)	
FV(ΔΔ)/KO	0 (0)	0 (0)	
<i>P</i>	< .001	< .001	.372
E18.5			
FV(ΔΔ)/WT	13 (57)	7 (21)	
FV(ΔΔ)/Het	9 (39)	18 (53)	
FV(ΔΔ)/KO	1 (4)	9 (26)	
<i>P</i>	.001	.838	.009
E13.5			
FV(ΔΔ)/WT	4 (24)		
FV(ΔΔ)/Het	8 (47)	ND	
FV(ΔΔ)/KO	5 (29)		
<i>P</i>	.916		
FV(ΔΔ)/Het × FV(+/-)/Het			
6 weeks			
FV(ΔΔ)/WT	39 (40)	40 (26)	
FV(ΔΔ)/Het	41 (42)	86 (55)	
FV(ΔΔ)/KO	17 (18)	30 (19)	
<i>P</i>	.002	.232	.047

Numbers in italics are derived from Yin et al.¹²
E indicates embryonic day, and ND, not determined.

2.2.2 Estudios clínicos.

Describiré a continuación cuales eran los conocimientos clínicos en el campo de la trombosis y la patología gestacional en relación al sistema PZ/ZPI en el momento de plantear esta tesis y que motivaron e inspiraron la realización de la misma. En el apartado Discusión de esta tesis, y junto a nuestros resultados, se abordaran de manera conjunta el resto de estudios publicados que conforman el conocimiento actual.

2.2.2.1 *Trombosis arterial.*

Los primeros estudios que evaluaron la relación entre PZ y trombosis se realizaron en patología arterial, en concreto en ictus (Tabla 5) [44,77]. Estos dos primeros estudios controlados ya demostraron resultados contrapuestos, observándose por Vasse et al [44] como un 20% de los pacientes respecto un 5% de los controles presentaban déficit plasmático de PZ (<1 mcg/ml o <5% de la PZ en controles) incrementando el riesgo de ictus 4 veces, mientras que Kobelt et al [77] encontraron que valores elevados de PZ (>160%) incrementaban 4,3 veces el riesgo de ictus. En años posteriores se sucedió la publicación de estudios que, tanto en ictus como en cardiopatía coronaria, tampoco aclararon la situación. Algunos grupos objetivaron que el déficit de PZ era más prevalente en los pacientes con trombosis [65,69,78,79], mientras que otros estudios no encontraron tal relación [48, 51,80,81].

Los polimorfismos de PZ más frecuentemente encontrados en la población general (-13 A>G e intrón F 79 G>A) se evaluaron en trombosis arterial. De manera similar los resultados son contradictorios. En ictus dos estudios objetivaron que el intrón F 79 G>A y no el -13 A>G, se asociaba con una menor prevalencia del mismo [54,55], por lo que se consideró protector, mientras que otro estudio no demostró relación ninguna [82]. En cardiopatía coronaria isquémica un solo estudio no encontró ninguna relación con los SNP F 79 G>A y -13 A>G [83].

La relación de la proteasa ZPI con trombosis arterial fue evaluada en un estudio [51] sin encontrar diferencias de concentración plasmática entre pacientes con trombosis arterial (ictus y cardiopatía isquémica) y controles.

Tabla 5. Estudios clínicos evaluando PZ y ZPI en patología trombótica arterial.

Disease	ZPI		PZ		Patients/ controls (n)	Results	Reference
	Levels	SNPs	Levels	SNPs			
CHD	Yes	No	Yes	No	382/375	Similar ZPI and PZ levels in patients and controls	Refaai <i>et al</i> (2006)
	No	No	Yes	No	223/265	Low PZ levels increase the risk of CHD 3-3-fold	Fedi <i>et al</i> (2003)
						Low PZ levels increase the risk of adverse outcome	Sofi <i>et al</i> (2006)
	No	No	Yes	No	297/593	Similar PZ in patients and controls	Morange & Juhan-Vague (2004)
	No	No	No	-13 A>G; I F 79G>A	244/352	SNPs are not genetic risk factors for CHD	Cesari <i>et al</i> (2006b))
Stroke	Yes	No	No	No	101/399	Similar ZPI in patients and controls	Refaai <i>et al</i> (2006)
	No	No	Yes	No	168/88	Low PZ levels increase the risk of stroke 4-fold	Vasse <i>et al</i> (2001)
	No	No	Yes	No	154/206	Low PZ levels increase the risk of stroke 2-6-fold	Heeb <i>et al</i> (2002)
	No	No	Yes	No	26/78	PZ deficiency increases the risk of stroke	Ayoub <i>et al</i> (2004)
	No	No	Yes	No	152/100	PZ deficiency does not increase the risk of stroke	Lopaciuk <i>et al</i> (2002)
	No	No	Yes	No	157/192	High levels of PZ increase the risk of stroke	Kobelt <i>et al</i> (2001)
	No	No	Yes	No	173/186	High levels of PZ increase the risk of stroke	McQuillan <i>et al</i> (2003)
	No	No	No	-13 A>G; I F 79G>A	200/199	I F A allele (low PZ levels) protects against stroke	Lichy <i>et al</i> (2004)
	No	No	No	-13 A>G; I F 79G>A	151/164	I F A allele may protect against stroke	Staton <i>et al</i> (2005)
No	No	No	I F 79G>A	390/147	I F A allele does not protect against stroke	Obach <i>et al</i> (2006)	

CHD, coronary heart disease; I, intron.

2.2.2.2 Trombosis venosa.

La mayoría de estudios clínicos que evaluaron la relación entre trombosis venosa y nivel plasmático de PZ no encontraron una relación significativa (Tabla 6) [44,46,47,68], únicamente un estudio que evidenció un riesgo moderado de trombosis venosa asociado a niveles de PZ muy disminuidos (<5% de los controles) [47]. Tampoco se evidenció una relación entre diferentes polimorfismos del gen de la PZ y la trombosis venosa [47,53].

En contraposición a estos resultados encontramos los estudios realizados en población con otras trombofilias (hiperhomocisteinemia, mutación gen protrombina 20210A o Factor V Leiden), en los que se objetivó que cuando estos pacientes asociaban niveles disminuidos de PZ si que se incrementaba el riesgo de trombosis venosa, siendo esta más prevalente y de presentación más precoz [46,84]. En esta línea se realizó un estudio que demostró que pacientes con Factor V Leiden que asociaban una mutación en el gen de la PZ (substitución R255H en exón VIII), descrita en un 4%

de la población general [53,85], desarrollaban más frecuentemente trombosis venosas que aquellos con Factor V Leiden sin la mutación R255H de PZ [86]. De todos modos, la substitución genómica de PZ R255H no se asoció a niveles disminuidos de PZ, por lo que no se conoce el mecanismo por el que este polimorfismo actuaría.

La relación de proteasa ZPI con trombosis venosa ha sido escasamente evaluada en estudios clínicos. Los resultados no demuestran que el déficit de ZPI incremente el riesgo de trombosis venosa [68]. Resultados más contradictorios se vieron al evaluar diferentes SNP en regiones codificantes de ZPI. En un estudio inicial se determinaron 16 SNP de ZPI, de los que sólo dos, causantes de las mutaciones Arg67 y Trp303 y a su vez estas de los codones stop R67X y W303X respectivamente, se observaron más prevalentes en pacientes con trombosis venosa respecto controles [87]. Un estudio controlado posterior en una amplia muestra confirmó que R67X incrementaba el riesgo de trombosis venosa a un ratio similar a otras trombofilias como Factor V Leiden aunque siendo mucho menos prevalente, y que, aún sin evaluarlo en el estudio, el déficit de ZPI sería trombofílico [88]. A pesar de estos resultados, también se publicaron estudios que no encontraron relación entre trombosis venosa y ambas mutaciones W303X y R67X [89,90].

Tabla 6. Estudios clínicos evaluando PZ y ZPI en patología trombotica venosa.

Disease	ZPI		PZ		Patients/ controls (n)	Results	Reference
	Levels	SNPs	Levels	SNPs			
VT	No	W303X; R67X	No	No	250/250	Stop codons increase the risk of VT 5-7-fold	Water <i>et al</i> (2004)
	No	W303X; R67X	No	No	1018/1018	R67X increases the risk of VT 3-3-fold	Corral <i>et al</i> (2006)
	No	W303X; R67X	No	No	365/416	No thrombotic role for these SNPs	Razzari <i>et al</i> (2006)
	Yes	No	Yes	No	426/471	Similar ZPI & PZ in patients and controls	Al-Shanqeeti <i>et al</i> (2005)
	No	No	Yes	No	56/88	Similar PZ in patients and controls	Vasse <i>et al</i> (2001)
	No	No	Yes	No	443/394	Similar PZ in patients and controls	Martinelli <i>et al</i> (2005)
	No	No	Yes	I F 79G>A	197/197	Low PZ and FVL, PT or Hcys increase VT Similar PZ in patients and controls PZ<5% of controls increase VT	Santacroce <i>et al</i> (2006)
	No	No	Yes	No	46/46	SNP is not a genetic risk factor PZ deficiency and FVL increases VT	Kemkes-Matthes <i>et al</i> (2002)
	No	No	No	I F 79G>A	564/492	SNP is not a genetic risk factor	Rice <i>et al</i> (2001)

2.2.2.3 Patología gestacional. Anticuerpos anti-proteína Z.

El primer estudio que evaluó una posible relación entre concentración plasmática de PZ y patología gestacional se publicó en 2002 (Tabla 7) [91]. Éste evidenció como el déficit de PZ (<1 mcg/ml o <5% de la PZ en controles) se asociaba a un incremento significativo de riesgo de aborto antes de la semana 15 de gestación. Los pocos estudios posteriores no decantaron la situación, ya que mientras dos describieron asociación del déficit de PZ con abortos, muerte fetal, retraso de crecimiento intrauterino y preeclampsia [92,93,94] , otros no [94,95].

La primera y única descripción de anticuerpos anti-proteína Z (anti-PZ) que existía en la literatura en el momento de plantear nuestra tesis se hizo por un equipo médico francés en el estudio de pacientes con patología gestacional [96]. Este grupo objetivó que la existencia de anti-PZ IgG e IgM incrementa, en correlación con su concentración, el riesgo de abortos y muertes fetales. El subtipo IgM se asoció también con pre-eclampsia grave. Este incremento del riesgo era independiente de los niveles de PZ (no se correlacionaban con la presencia de anti-PZ), las gestaciones previas (no incrementaban presencia anti-PZ) y otros anticuerpos aCL, Beta2GPI (ausentes en los pacientes) [97].

Tabla 7. Estudios clínicos evaluando PZ y anti-PZ en patología gestacional.

Disease	ZPI		PZ		Patients/ controls (n)	Results	Reference
	Levels	SNPs	Levels	SNPs			
PC	No	No	Yes	No	160/0	Low PZ and/or anti-PZ antibodies are risk factors for poor pregnancy outcome	Gris <i>et al</i> (2004)
	No	No	Yes	No	61/34		Bretelle <i>et al</i> (2005)
	No	No	Yes	No	106/103		Paidas <i>et al</i> (2005)
FL	No	No	Yes	No	450/200	PZ deficiency associated with fetal loss	Gris <i>et al</i> (2002)
	No	No	Yes	No	124/60	PZ deficiency is not relevant for fetal loss	Grandone <i>et al</i> (2004)

VT, venous thromboembolism; PC, pregnancy complications; FL, fetal loss; FVL, factor V Leiden; PT, prothrombin 20210A; Hcys, hyperhomocysteinemia; I, intron.

3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. HIPÓTESIS.

En el momento de plantear esta tesis, año 2004, el déficit de la PZ de la coagulación se había demostrado como un factor de riesgo trombótico experimental con modelos animales [74], pero los escasos estudios clínicos realizados hasta ese momento, tanto en patología trombótica arterial como venosa, no evidenciaban claramente este hecho. Los estudios hasta ese momento tampoco habían investigado si existía influencia de los factores de riesgo clásicos tanto para trombosis venosa como arterial, en concreto con la enfermedad ateromatosa arterial, en la concentración plasmática de PZ y por tanto creímos importante evaluarlas, de la manera más objetiva posible, en orden a eliminar factores de confusión en el probable papel de factor de riesgo trombótico de la PZ. Finalmente, y llevados por los resultados en patología gestacional, quisimos estudiar la presencia de anticuerpos anti-PZ en pacientes con trombosis vasculares arteriales y venosas. Estos motivos justificaron el diseño de la primera fase del estudio motivo de esta tesis.

Al observar la amplia variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos de PZ en la población general, consideramos interesante y necesario evaluar la estabilidad individual de su concentración en el tiempo, nunca antes establecida, importante dato a la hora de darle significación a un posible papel como factor de riesgo trombótico. A su vez, quisimos esclarecer el riesgo a largo plazo de recidiva trombótica asociado tanto al déficit de PZ como en relación a los anticuerpos anti-PZ, hipótesis no estudiadas hasta ese momento. Se diseñó por tanto la segunda fase del estudio, donde se evaluaría a largo plazo y de manera prospectiva el comportamiento de la cohorte de pacientes con un primer evento trombótico incluidos en la fase inicial.

Las hipótesis de estudio fueron:

1. El déficit plasmático de PZ es una variable asociada de manera independiente a un primer evento trombotico vascular arterial y/o venoso.
2. El déficit plasmático de PZ es una variable asociada más frecuentemente a trombosis vascular arterial de etiología aterotrombótica y a una mayor de severidad de la misma.
3. La concentración plasmática de PZ es estable a largo plazo a nivel individual en adultos.
4. El déficit plasmático de PZ es un factor de riesgo independiente de recurrencia trombotica arterial y/o venosa.
5. Los anticuerpos anti-PZ son una variable asociada a trombosis vascular arterial y/o venosa.
6. Los anticuerpos anti-PZ son un factor de riesgo independiente de recurrencia trombotica arterial y/o venosa.

4 OBJETIVOS

1. Determinar e investigar diferencias en la concentración plasmática de PZ en pacientes con un primer evento trombótico arterial y/o venoso respecto a población sana.
2. Investigar si una baja concentración plasmática o déficit de PZ se asocia a un primer evento trombótico arterial y/o venoso, de manera independiente de los factores de riesgo conocidos para estas patologías.
3. Investigar una probable relación entre el déficit de PZ y la enfermedad arteriosclerótica, evaluada a través de los equivalentes: etiología de la trombosis arterial (ateromatosa-ateroembólica vs otra etiología), número de factores de riesgo cardiovascular (0-1 vs 2 o más factores), riesgo cardiovascular calculado (Score Framingham) previo a primer evento trombótico e Índice tobillo-brazo (ITB).
4. Investigar si la concentración plasmática de proteína Z es estable a lo largo del tiempo a nivel intraindividual en pacientes con trombosis arterial y/o venosa.
5. Investigar si una baja concentración plasmática o déficit de PZ incrementa el riesgo de recidiva trombótica arterial y/o venosa de manera independiente a los factores de riesgo de recurrencia reconocidos para estas patologías.

Objetivos

6. Determinar e investigar diferencias en la existencia de anticuerpos anti-PZ en pacientes con trombosis arterial y venosa respecto a población sana.
7. Investigar si existe correlación entre los niveles plasmáticos de PZ y los anticuerpos anti-PZ.
8. Investigar si la existencia de anticuerpos anti-PZ incrementa el riesgo de recidiva trombótica arterial y/o venosa de manera independiente a los factores de riesgo de recurrencia reconocidos para estas patologías.

5 MÉTODOS

5.1 Población y diseño del estudio. Criterios de inclusión.

Durante un periodo de 6 meses de febrero a julio del año 2004 y en colaboración con la Unidad de Hemostasia de nuestro centro (Dra. Nicolau) se realizó el registro consecutivo de todos los pacientes con eventos tromboticos vasculares y patología placentaria-gestacional a los que se les solicitaba un estudio de trombofilia. Se recogieron un total de 190 pacientes. El registro de esta cohorte de pacientes se obtuvo con el fin de realizar diversos estudios en el campo de la patología trombotica y gestacional en relación con PZ y anticuerpos anti-PZ. De estos datos, en concreto ya publicamos un primer estudio [98] con pacientes con trombosis vascular donde se evaluaron concentración plasmática de PZ y anticuerpos anti-PZ. Para la presente tesis, y a diferencia del estudio anterior, seleccionamos de la cohorte inicial de 190 pacientes únicamente aquellos pacientes que se presentaron con su primer evento trombotico vascular (Anexo 1 y 2). Esta selección se debió al propósito principal del estudio, que era evaluar prospectivamente la recidiva trombotica, y creímos esta aproximación sería la mejor. No se incluyeron pacientes con patología gestacional. En todos los casos el evento trombotico vascular estaba documentado correctamente tanto por clínica como por pruebas complementarias. Se excluyeron pacientes con accidente isquémico transitorio (AIT) así como aquellos con angor sin criterios de infarto miocárdico. Se excluyeron los pacientes con factores que afectan el nivel plasmático de PZ (tratamiento con anticonceptivos orales, hepatopatía crónica, insuficiencia renal crónica con cifras creatinina mayores de 1,5mg/dl). Del total de la cohorte, 116 pacientes cumplían todos

estos requisitos. En el mismo periodo temporal se incluyeron 82 controles sanos, que se reclutaron entre donantes habituales en nuestro Banco de Sangre. Tanto pacientes como controles aceptaron mediante consentimiento informado la participación en el estudio. El estudio se aprobó por parte del Comité Ético del hospital.

Los pacientes inicialmente incluidos realizaron en los siguientes años los controles médicos periódicos por el proceso trombótico vascular por parte de sus especialistas tanto en nuestro centro hospitalario como a nivel ambulatorio sin ninguna intervención por nuestra parte. De septiembre a noviembre del 2014, a los 10 años de la primera evaluación, citamos a todos los pacientes para la visita de evaluación de seguimiento final. No se realizó seguimiento del grupo control. En Anexo 3 se representa el diseño del estudio.

5.2 Estudios analíticos y pruebas complementarias.

5.2.1 Proteína Z

En la fase inicial del estudio se realizó la primera determinación de PZ plasmática de los controles y los pacientes. La extracción sanguínea se realizó una media de 2 meses tras el evento trombótico vascular. Una muestra de sangre anticoagulada en citrato fue centrifugada a 3000 G a 4°C. Alícuotas de plasma se guardaron a -80°C para la realización de estudios posteriores. La determinación de la concentración de PZ plasmática se realizó mediante el kit comercial de ELISA (Asserachrom Protein Z, Diagnostica Stago and Serbio, Asnières, France). A 10 años de seguimiento se obtuvo una nueva muestra. La segunda determinación de PZ, en este caso sólo realizada en los pacientes, se llevó a cabo a partir de una muestra sanguínea extraída por venopunción

en la visita de seguimiento final, y procesada de igual manera como se ha descrito anteriormente.

Se clasificaron las distintas concentraciones de PZ de los pacientes en cuartiles tomando como referencia el grupo control; primer cuartil <1685 ng/ml, segundo cuartil 1685-2478 ng/ml, tercer cuartil 2478-3270 ng/ml y cuarto cuartil >3270 ng/ml. Se consideró de manera aleatoria como déficit de PZ el valor por debajo de 1000 ng/ml.

5.2.2 Anticuerpos anti-PZ

La determinación de anticuerpos anti-PZ se realizó una única vez en el estudio (durante la fase inicial del mismo), y tanto a pacientes como controles. Se elaboró un home-made ELISA. Cada pocillo fue recubierto de 62,5 ng de PZ humana (Hyphen BioMed., Neuville sur Oise, France) diluido en solución salina tamponada de fosfato PBS. Otros pocillos se recubrieron sólo con PBS para determinar la unión inespecífica. Se usó como tampón de bloqueo seroalbúmina bovina al 1% diluida en PBS-Tween20 1%. Las muestras de plasma (50ul diluido 1:50) fueron añadidas por duplicado a los pocillos e incubadas 1,5h a temperatura ambiente. Tras seis lavados, las placas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con anti inmuglobulina humana (IgG o IgM) de cabra marcada con fosfatasa alcalina (1:1000 en la solución bloqueante) (Sigma, Madrid, Spain). Tras lavar, el color fue desarrollado añadiendo P-nitrofenilfosfatasa (Sigma) en su correspondiente tampón (1M dietanolamina, 0.05mM MgCl₂, 0.22 M NaCl, pH 9,5) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica (DO) de cada pocillo fue leída a 405 nm en espectrofotómetro (Labsystem iEMS reader MF, Barcelona, Spain). La DO de unión no específica (pocillos sin antígeno) de cada muestra fue substraído de cada uno de las muestras testadas (pocillos con antígeno). Inicialmente testamos un panel de individuos control (n=50) a diferentes diluciones;

el valor de absorbancia media de los controles sanos más 2 desviaciones estándar se estableció que correspondería a 1 unidad arbitraria (UA) de anti-proteína Z IgG o IgM. Este fue también el valor límite o cut-off para definir su positividad. Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron menores del 1,5%.

5.2.3 Estudio de trombofilia

Se realizó a todos los pacientes y controles en la fase inicial del estudio. Las determinaciones se cursaron en el Laboratorio de Hemostasia de nuestro centro por vía rutinaria. Se descartó la Resistencia a la Proteína C activada-Mutación Factor V Leiden, el déficit proteína C y S, el déficit de antitrombina III, la mutación del gen de la Protrombina, la hiperhomocisteinemia, la mutación del gen metilentetrahidrofolato reductasa (C677T MTHFR) y el anticoagulante lúpico/ anticuerpos anticardiolipina.

5.3. Evaluación clínica y de factores de riesgo trombótico.

En la primera visita del estudio se evaluaron los factores de riesgo de primer evento trombótico vascular arterial y venoso tanto en pacientes como controles. Se consideraron factores de riesgo de trombosis arterial la edad mayor de 50 años, sexo masculino, hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, obesidad y tabaquismo. La hipertensión arterial se definió según las Guías de la Sociedad Europea de Hipertensión [99] y/o si los pacientes tomaban medicación antihipertensiva. La diabetes se considero según las guías de la Asociación Americana de Diabetes [100] o si el paciente estaba bajo medicación o documentada en historial clínico. La hipercolesterolemia se definió según los parámetros del NCEP-III (National Cholesterol Education Program) [101].

La obesidad se definió tras el cálculo del Índice de Masa Corporal si $> 30 \text{ Kg m}^{-2}$. Se investigaron los factores de riesgo de trombosis venosa como cirugía reciente (< 6 meses), inmovilización, neoplasia y uso de anticonceptivos previos a la trombosis. Se clasificaron a todos los pacientes en subgrupos de factores riesgo trombotico según el número de estos en la primera visita del estudio; bajo nivel de riesgo (0-1), alto nivel de riesgo (2 o más) y subgrupo con trombofilia. Se consideraron pacientes con trombofilia congénita aquellos con mutación de Factor V Leyden homo/heterocigoto, mutación del gen de la Protrombina homo/heterocigoto, déficit de proteína S o C, hiperhomocisteinemia con o sin mutación del gen C677T MTHFR.

Se cuantificó el riesgo cardiovascular en todos los pacientes antes del primer evento trombotico mediante el score de Framingham [102] clasificando los pacientes en bajo ($< 10\%$), medio (10-17%) y alto riesgo (18%), basándose en los factores de riesgo recogidos en la primera visita del estudio.

Se realizó el índice tobillo-brazo (ITB) en todos los pacientes que completaron el seguimiento clínico al final del estudio. La técnica fue realizada por la misma persona y mediante el mismo método. Se usó una sonda doppler continuo portátil de 8 MHz y un esfigmomanómetro manual. El paciente reposaba en decúbito supino 5 minutos en reposo antes de las mediciones. Se medía la presión arterial sistólica (PAS) de ambas extremidades superiores; la sonda doppler se colocaba a 45° de inclinación sobre la arteria radial y mediante la descompresión progresiva del esfigmomanómetro se obtenía esta como aquella a la que se captaba la primera señal doppler. Se tomó como referencia la máxima PAS de las extremidades superiores. El mismo proceso se realizaba en las extremidades inferiores, esta vez la sonda doppler sobre arteria pedia y el esfigmomanómetro en zona de pantorrilla. De las dos mediciones de extremidades inferiores se tomaba la mínima PAS, ya que de esta manera se aumentaba la sensibilidad

de detección de enfermedad arterial periférica [103]. Se obtuvo el ITB mediante la división de las PAS de extremidad inferior por la de extremidad superior. Se consideró ITB patológico y por tanto indicador de presencia de enfermedad arterial periférica ateromatosa un ITB menor de 0,9 o mayor de 1,3. Se realizó una gradación clasificando la enfermedad arterial periférica según ITB: 0,9-0,7 leve, 0,7-0,4 moderada, <0,4 grave y >1,3 calcificación arterial.

Al final del periodo de seguimiento de los pacientes se investigó la ocurrencia de recidiva trombótica, que se definió como la aparición en el seguimiento de un evento tromboembólico en el mismo territorio vascular, arterial o venoso, que el inicial, independientemente del órgano afecto. No se consideró recidiva la detección de arteriopatía periférica por ITB en paciente con trombosis arterial inicial al considerarse un equivalente ateromatoso. Finalmente se valoró la ocurrencia de nuevos eventos trombóticos, definidos por afectar al territorio vascular contrario al de la trombosis inicial. En este caso la detección de arteriopatía periférica por ITB en pacientes con trombosis venosa inicial y sin antecedentes de trombosis arterial sí que se consideró como un nuevo evento trombótico. Se obtuvieron los datos a través de entrevista médica y revisión de datos de seguimiento de sus especialistas a través de la historia clínica. Se investigó el tipo de tratamiento anticoagulante/antiagregante realizado. Se determinó la existencia de variables de riesgo de recidiva trombótica a lo largo de la evolución. Las variables de recurrencia de trombosis venosa que se consideraron fueron: la obesidad, cáncer activo, paraparesia, antecedente de trombosis venosa idiopática y presencia de factores permanentes (trombofilia, SAF) [104].

Finalmente todos los pacientes que tuvieran algún evento tromboembólico arterial al final del seguimiento se clasificaron para fines de estudio en aquellos con datos objetivos de enfermedad ateromatosa (en pruebas de imagen- angioTC,

angioRMN, doppler vascular arterial, ecocardiografía o ITB patológico) como causa de la trombosis (aterotrombosis, ateroembolismo) respecto aquellas trombosis arteriales de otra etiología (cardioembólica, disección vascular, trombosis paraneoplásica, trombosis con trombofilia congénita, trombosis idiopática).

5.4 Estadística.

Se valoró la normalidad en la distribución de PZ y anti-PZ mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La variable anti-PZ requirió el uso de test no paramétricos como Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. La variable PZ presentó una distribución normal por lo que se usaron los test paramétricos T de Student y ANOVA. Las variables cuantitativas se representan como medias \pm desviación estándar. Las variables cualitativas se representan como número (%). La variabilidad intraindividual de la concentración plasmática de PZ se evaluó mediante el test de T de Student pareado. La correlación entre el título de anti-PZ y la concentración plasmática de PZ se evaluó mediante los test de Pearson y Spearman. La comparación entre variables cualitativas se realizó mediante chi-cuadrado. El riesgo de primer evento trombótico respecto al déficit de PZ se representó mediante Odds Ratio (OR) con intervalo de confianza del 95%, calculado a través de chi-cuadrado y regresión lineal univariante y multivariantes. El riesgo de recidiva trombótica asociado al déficit de PZ se representó mediante OR con IC 95%, calculado a través de la regresión de Kaplan (estudio univariante) y la de Cox (multivariante). La significación estadística se consideró si $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Evaluación inicial.

6.1.1 Relación PZ y primer evento trombótico.

Se incluyeron en el estudio 116 pacientes y 82 controles, sin objetivarse diferencias en las características demográficas de género y edad entre ambos grupos (Tabla 8). De los 116 pacientes, 44 (37,9%) debutaron con trombosis arterial y 72 (62,1%) con un primer evento trombótico venoso. Las principales patologías arteriales de debut en 34 pacientes ictus isquémico, en 3 IAM, en 2 trombosis arterial periférica, en 3 trombosis de arteria retiniana y en 2 trombosis arterial mesentérica. En el territorio venoso 30 pacientes debutaron con tromboembolismo pulmonar (TEP), 27 con trombosis venosa profunda (TVP) sin TEP, 6 con trombosis porto-mesentéricas y 8 con trombosis venosa retiniana. La media de edad de los pacientes en el momento del debut trombótico fue de 50 (16) años. Los factores de riesgo para trombosis arterial y venosa fueron en general más prevalentes en los pacientes respecto el grupo control (Tabla 8).

No se encontró correlación entre la concentración plasmática de PZ y la edad en pacientes y controles, ni con el intervalo temporal desde el debut trombótico hasta la determinación de PZ en pacientes ($P=0,92$ y $0,55$, respectivamente). Tampoco se vieron diferencias en la concentración plasmática de PZ según el sexo de pacientes y controles ($P=0,31$).

Resultados

La concentración plasmática de PZ fue significativamente menor en pacientes respecto al grupo control (1703 +-736 ng/ml versus 2437+-964 ng/ml, P=0,001). Entre el grupo de pacientes con trombosis arterial (1611 +-766 ng/ml) y venosa (1759+-718 ng/ml) no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de PZ y en ambos esta fue menor que en el grupo control (P=0,001; Figura 11).

Tabla 8. Características de pacientes y controles.

	<i>Pacientes</i>		<i>Controles</i>	<i>p</i>
	<i>Tr Arterial</i>	<i>Tr Venosa</i>		
N (%)	44 (37,9%)	72 (62,1%)	82 (100%)	
Sexo masculino (n)	20	32	34	0,89
Edad (años) ¹	51	49	45	0,08
Mayor 50 años	27	–	22	0,001
Hipertensión	19	–	3	0,001
Fumador	19	–	5	0,001
Hipercolesterolemia	15	–	6	0,001
Diabetes	7	–	0	0,002
Obesidad	1	8	1	0,013
FA	2	3	0	0,04
Valvulopatía	6	0	0	0,001
Inmovilidad	–	23	0	0,001
Cirugía reciente	–	9	0	0,001
Neoplasia	–	5	0	0,05
Anticonceptivos orales	–	6	10	0,26

¹ Edad media en el momento del debut trombótico en pacientes y de inclusión en el estudio de controles. No se han representado los valores que están como –.

Realizamos entonces un subanálisis analizando la concentración plasmática de PZ en función de las diferentes manifestaciones arteriales y venosas de debut (Figura 12). De esta manera pudimos constatar en primer lugar como no existían diferencias significativas en la concentración plasmática de PZ ($P=0,59$) entre todas ellas, aunque destacaba la arteriopatía periférica como la forma de trombosis con menor concentración de la misma (828 ng/ml). Al comparar cada una de las patologías trombóticas con el grupo control objetivamos, en el grupo de trombosis arteriales, como la concentración plasmática de PZ era menor en ictus (1629 ± 764 ng/ml $P=0,0001$), arteriopatía periférica (828 ± 344 ng/ml $P=0,008$) y trombosis arterial mesentérica (1306 ± 959 ng/ml $P=0,05$), mientras que no existían diferencias con grupo control en trombosis de arteria retiniana (2024 ± 1190 ng/ml, $P=0,40$) e IAM (1728 ± 174 ng/ml, $P=0,15$). En el grupo de trombosis venosas, todas las patologías presentaron niveles plasmáticos de PZ inferiores al grupo control (Figura 12).

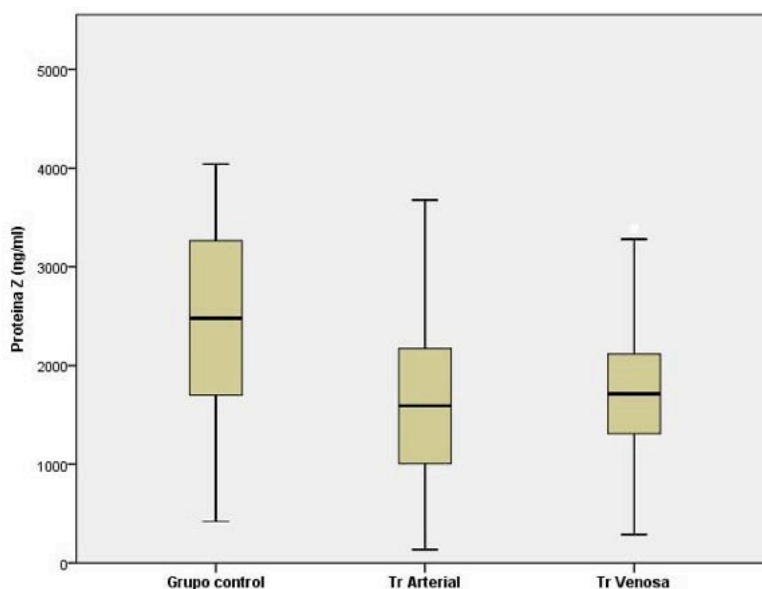


Figura 11. Concentración plasmática de PZ en pacientes según territorio vascular y grupo control.

Resultados

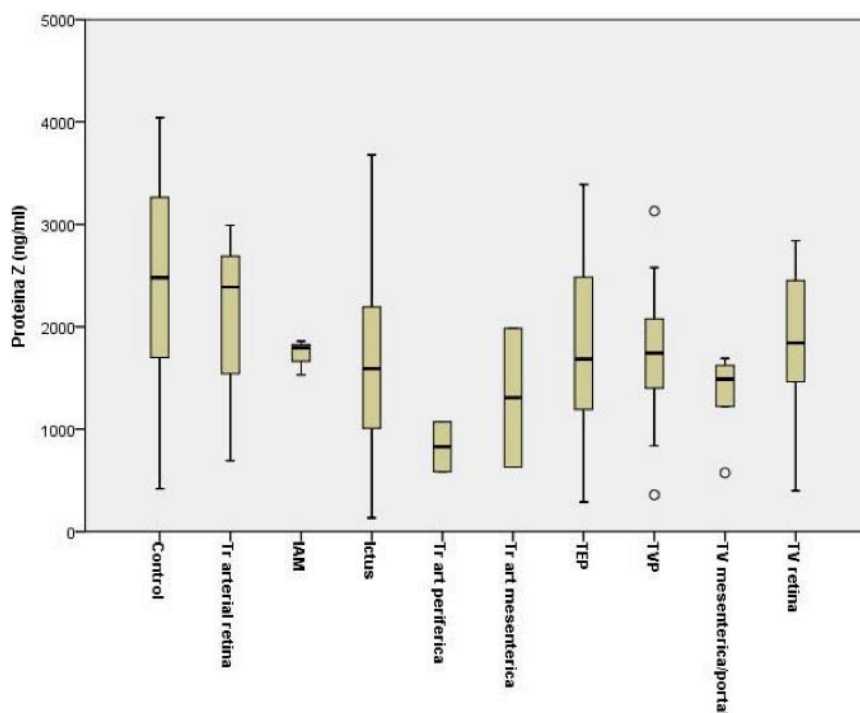


Figura 12. Concentración plasmática de PZ en distintos procesos trombóticos y grupo control.

Calculamos posteriormente el riesgo de ocurrencia de un primer evento trombótico en relación a niveles decrecientes de PZ. El análisis multivariante se ajustó según los factores de riesgo que actualmente se consideran para cada tipo de trombosis arterial y venosa (Tabla 9). Se pudo objetivar en el análisis univariante o no corregido un incremento del riesgo de trombosis arterial y venosa asociado a los dos cuartiles de menor concentración de PZ plasmática (primer cuartil <1685 ng/ml, segundo cuartil 1685-2478 ng/ml), relación independiente del resto de factores de riesgo al mantenerse la significación en el análisis multivariante.

Tabla 9. Riesgo de primer evento trombótico arterial y venoso en relación a concentración plasmática decreciente de PZ clasificada en cuartiles.

	<i>Pacientes (n)</i>	<i>Univariante</i>			<i>Multivariante ¹</i>		
		<i>OR</i>	<i>95% IC</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	<i>95% IC</i>	<i>P</i>
TR. ARTERIAL							
Cuarto cuartil	1	Referencia					
Referencia							
Tercer cuartil	4	3,6	0,37-35	0,26	4,3	0,1-183	0,44
Segundo cuartil	13	13	1,5-108	0,01	28	2-900	0,01
Primer cuartil	26	26	3,2-210	0,002	58	3,2-1220	0,01
TR VENOSA							
Cuarto cuartil	2	Referencia			Referencia		
Tercer cuartil	11	5	0,9-25	0,05	4,5	0,4-42	0,18
Segundo cuartil	25	12	2,6-59	0,002	12	1,4-101	0,02
Primer cuartil	34	17	3,5-80	0,001	11	1,4-101	0,02

¹ Trombosis arterial ajustada por edad mayor de 50 años, sexo masculino, hipertensión arterial, fumador, dislipemia, diabetes, obesidad, fibrilación auricular, valvulopatía y presencia de anticoagulante lúpico/anticardiolipina.

Trombosis venosa ajustada por inmovilidad, cirugía reciente, neoplasia, uso de anticonceptivos previos a trombosis, obesidad y presencia de trombofilia congénita o anticoagulante lúpico/anticardiolipina.

6.1.2 Relación anticuerpos anti-PZ y primer evento trombótico

En el total de controles y pacientes 25 (12,6%) casos resultaron positivos para anticuerpos anti-PZ con una distribución entre controles, pacientes con trombosis arterial y venosa que no evidencio diferencias para subtipo IgM (3,7%, 4,5%, 4,2% respectivamente, $P=0,5$) pero si para IgG (4,9%, 18%, 7% respectivamente, $P=0,01$), donde en trombosis arterial presento mayor porcentaje de anti-PZ positivos que en controles y trombosis venosa (Figura 13 representado a través del título de anti-PZ IgG en UA). No se evidenciaron diferencias en el porcentaje de positividad de anti-PZ IgG entre las diferentes patologías trombóticas arteriales.

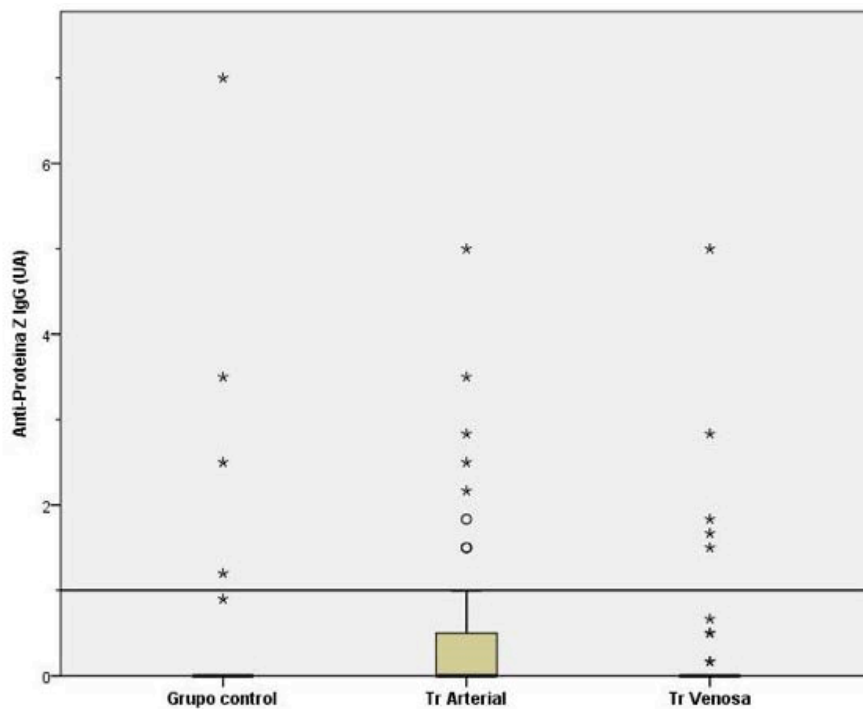


Figura 13. Anticuerpos anti-PZ IgG en pacientes según territorio vascular y grupo control. Los asteriscos son casos individuales.

La línea horizontal representa el cutoff para positividad de 1 UA.

El riesgo de primer evento trombótico arterial asociado a la positividad de anticuerpo anti-PZ del subtipo IgG sería de 3,5 (IC 1,2-9,9 , P=0,01). No hallamos correlación entre edad y positividad o título de anti-PZ tanto IgG como IgM (P=0,96)

6.1.3 Correlación anticuerpos anti-PZ y concentración plasmática de PZ.

En el caso de los anticuerpos anti-PZ del subtipo IgM no se encontró correlación con el título de PZ plasmática (P=0,96). Por lo contrario cuando analizamos los pacientes con positividad para anti-PZ del subtipo IgG constatamos como presentaban un título de PZ plasmática significativamente menor respecto aquellos con positividad IgM y controles (1455 ng/ml, 2320 ng/ml, 2047 ng/ml respectivamente P=0,01), además de objetivarse una correlación negativa entre anti-PZ IgG y concentración de PZ plasmática (-0,26, P=0,001).

6.2 Evaluación prospectiva.

En la Figura 14 se pueden ver los datos de seguimiento de los 116 pacientes con trombosis inicial. En 3 (2,6%) casos se perdió contacto con los pacientes por motivo desconocido sin poderse realizarse control clínico, ITB ni analítico de PZ. En 69 (59,5%) casos se consiguió completar el seguimiento tanto clínico, ITB, como analítico. En 25 (21,6%) casos se completo el seguimiento clínico e ITB pero los pacientes no quisieron realizar el control analítico para la determinación de PZ. Durante los 10 años de seguimiento 19 (16,4%) casos fueron exitus por diferentes motivos (Tabla 10), pudiéndose obtener los datos de seguimiento clínico hasta el fallecimiento, pero no pudiendo realizarse ni ITB ni control analítico de PZ.

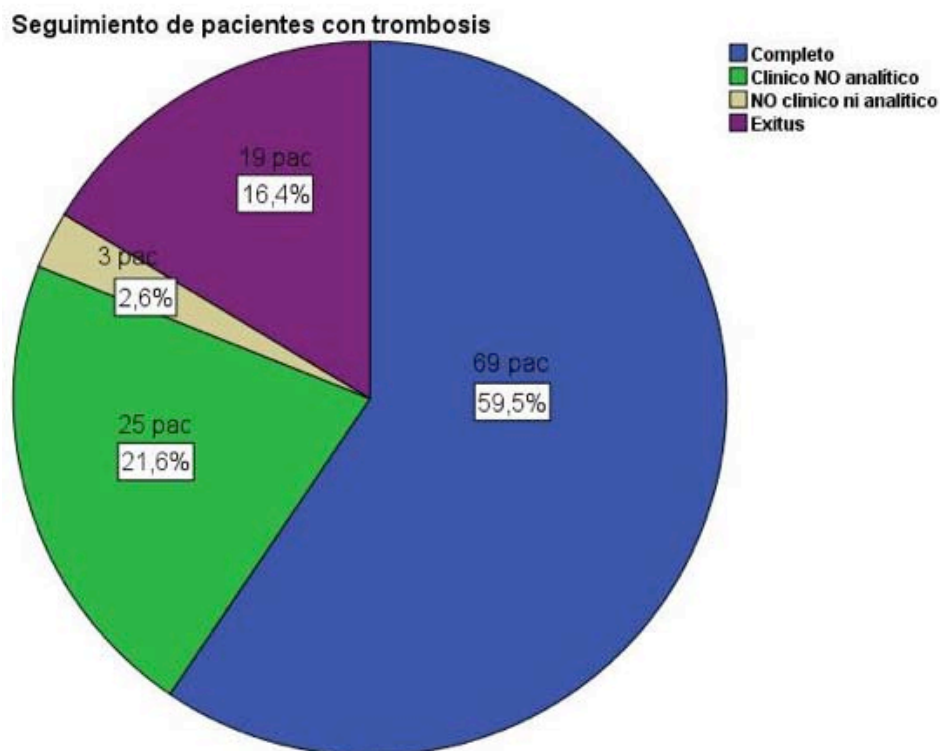


Figura 14. Datos evolutivos en el seguimiento de pacientes con trombosis inicial.

Las causas de exitus se distribuyeron en neoplasias (26,3%), sepsis (26,3%), desconocida (26,3%) y otras (10,5%), mientras que únicamente en 2 casos (10,5%) fue un evento trombótico. Las características de los pacientes que fueron exitus no difirieron de las del resto de la cohorte excepto por ser un grupo con mayor edad (72 vs 58 años respectivamente, $P=0,001$). Tampoco se observaron diferencias en la concentración plasmática de PZ ni la distribución en cuartiles de PZ. La supervivencia global a 5 años de la cohorte de pacientes con trombosis inicial fue del 90%.

Tabla 10. Exitus en el periodo de seguimiento en la cohorte de pacientes con trombosis inicial.

<i>Sexo</i>	<i>Trombosis inicial</i>	<i>Tipo trombosis</i>	<i>Exitus_año_causa</i>	<i>Edad exitus</i>	<i>AntiPZ</i>	<i>PZ (ng/ml)</i>
M	Tr Venosa	TV mesentérica	2010- Neoplasia biliar	74	negativo	1542,4324
M	Tr Venosa	TEP	2014- Demencia senil.	78	negativo	941,5789
M	Tr Venosa	TEP	2008- Linfoma	76	negativo	3278,4211
M	Tr Venosa	TEP	2006- Desconocida (domicilio)	75	positivo IgG	1172,1622
H	Tr Venosa	TVP	2010- Neoplasia próstata M1	71	negativo	358,3400
M	Tr Venosa	TEP	2013- Depresión. Desconocida	37	negativo	287,1930
H	Tr Venosa	TVP	2008- Neoplasia colon	77	negativo	1722,2807
H	Tr Venosa	TEP	2006- Infección respiratoria	80	negativo	3390,7018
H	Tr Venosa	TEP	2012- Sepsis. Paraplejia	53	negativo	2394,2105
H	Tr Venosa	TVP	2013-Neoplasia gástrica.	69	negativo	2056,4103
H	Tr Venosa	TEP	2005- Sepsis	80	negativo	1210,0000
M	Tr Venosa	TV mesentérica	2012-Desconocida (domicilio)	73	negativo	1439,3000
H	Tr Venosa	TEP	2013- EPOC reagudización	94	negativo	2848,6000
M	Tr Venosa	TVP	2005-Complicacion fractura cadera.	77	positivo IgM	1006,8376
M	Tr Arterial	Ictus	2005- Ictus hemorrágico sin aco	80	negativo	1208,9999
H	Tr Arterial	Ictus	2011- Desconocida (domicilio)	63	negativo	899,9999
H	Tr Arterial	Ictus	2010-Ictus isquémico carotideo	52	negativo	3676,9231
M	Tr Arterial	Tr arterial retina	2014-Fractura.Sepsis	86	negativo	2386,1728
H	Tr Venosa	TVP	2010-Desconocida (domicilio)	82	negativo	1778,7000

6.2.1 Estabilidad de la concentración plasmática de PZ a largo plazo.

De los 116 pacientes iniciales solo se pudieron obtener muestras de sangre de control en 69 (59,5%) de ellos (aquellos con seguimiento completo). La concentración plasmática media de PZ en estos pacientes fue de 1593,2 (669) ng/ml, objetivándose

una correlación positiva significativa (0,67, $P=0,0001$) con los valores individuales iniciales de cada paciente, sin demostrarse por tanto diferencias significativas ($P=0,5$) en la concentración plasmática de PZ en un mismo paciente con trombosis inicial en el periodo de seguimiento, manteniéndose este resultado tanto en los pacientes con trombosis arterial como venosa (Figura 15).

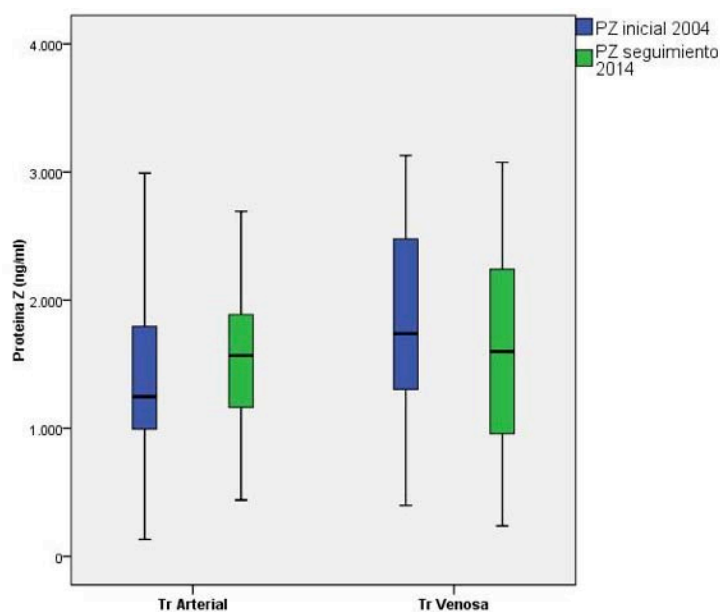


Figura 15. Variación individual de la concentración plasmática de PZ en el seguimiento de pacientes con trombosis inicial, según territorio vascular.

6.2.2 Relación PZ y recidiva trombótica

Los pacientes a los que se les pudo completar el seguimiento clínico fueron 113 (97,4%) (116 iniciales menos 3 perdidos de control clínico y analítico). A los que se les pudo realizar el ITB fueron 96 (116 iniciales menos 3 perdidos y 19 exitus). El tiempo medio de seguimiento clínico en estos pacientes desde el año 2004 fue de 9,2 (2) años. Un 28% y 33% realizaron tratamiento anticoagulante oral o antiagregante respectivamente en algún momento de la evolución.

Un total de 34 (30%) de pacientes presentaron una recidiva tromboembólica (Tabla 10). La incidencia acumulada de recurrencia trombótica fue de un 30% en el periodo de seguimiento, y la tasa de incidencia fue de 3,2% anual. Por territorio vascular (arterial y venoso) no se observaron diferencias entre el porcentaje de pacientes (13% y 17% respectivamente) con recidiva. En la tabla 10 se detallan el número de casos de recidiva por patologías específicas.

Un total de 23 (20%) pacientes presentaron nuevos eventos tromboembólicos en el territorio opuesto al inicial por lo tanto al final del periodo de seguimiento tenían afectación tromboembólica arterial y venosa. En la mayoría de casos se descubrió una arteriopatía periférica silente por ITB patológico (15 pacientes, 13,2%). Menos frecuente fueron la aparición de eventos tromboembólicos clínicos, tanto arterial (6 casos, 5,3%) como venoso (2 casos, 1,7%).

De los 113 pacientes, 19 (16,8%) tenían un déficit de PZ (definición arbitraria por debajo de 1000ng/ml); no existieron diferencias en el porcentaje de pacientes con y sin recidiva tromboembólica con déficit de PZ (20,6% vs 15,2% respectivamente, $P=0,48$). En el cálculo por regresión logística del riesgo de recidiva de evento tromboembólico vascular tanto arterial como venoso asociado a una concentración decreciente de PZ plasmática, se tomaron como referencia los valores de PZ de la evaluación inicial, sin hallarse incremento del riesgo de recidiva de trombosis en territorio arterial ni venoso (Tabla 11) por lo que no se procedió al estudio multivariante.

No se observaron tampoco diferencias en el porcentaje de pacientes con y sin nuevos eventos trombóticos que presentaban déficit de PZ (13% vs 17,8% respectivamente, $P=0,58$), así como tampoco en el análisis de riesgo de regresión logística por cuartiles de PZ.

Tabla 10. Recidiva tromboembólica en pacientes.

Pacientes (n)	113
Tiempo seguimiento (años)	9,2
Pacientes en tto anticoagulante	32 (28%)
Pacientes en tto antiagregante	38 (33%)
Pacientes con recidiva tromboembólica (n)	34 (30%)
Venosa	19 (17%)
Arterial	15 (13%)
Episodios de recidiva tromboembólica (n)	46
Venosos	25
TEP	8
TVP sola	14
Tr v mesentérica	1
Tr v retina	2
Arteriales	21
IAM	5
Ictus	9
Tr art periférica	3
Tr art mesentérica	4
Pacientes con nuevo evento tromboembólico (n)	23 (20%)
Venosa	2 (1,7%)
Arterial clínica	6 (5,3%)
Arterial por ITB patológico	15 (13,2%)

Tabla 11. Riesgo de recidiva tromboembólica en relación a concentración plasmática decreciente de PZ clasificada en cuartiles.

	<i>Pacientes (n)</i>	<i>OR</i>	<i>95% IC</i>	<i>P</i>	<i>Univariante</i>
TR. ARTERIAL					
Cuarto cuartil	1	Referencia			
Tercer cuartil	4	0,002	0,001-3	0,9	
Segundo cuartil	12	0,001	0,001-3	1	
Primer cuartil	25	0,001	0,001-3	1	
TR VENOSA					
Cuarto cuartil	2	Referencia			
Tercer cuartil	11	0.22	0,009-5,2	0,35	
Segundo cuartil	24	0.33	0,01-6,1	0,46	
Primer cuartil	34	0.41	0,02-7,3	0,55	

En el análisis de Kaplan-Meier calculamos la supervivencia libre de recidiva trombótica comparativamente entre los pacientes con y sin déficit de PZ (<1000 ng/dl) (Figura 16), sin observarse diferencias significativas (P log-rank=0.58).

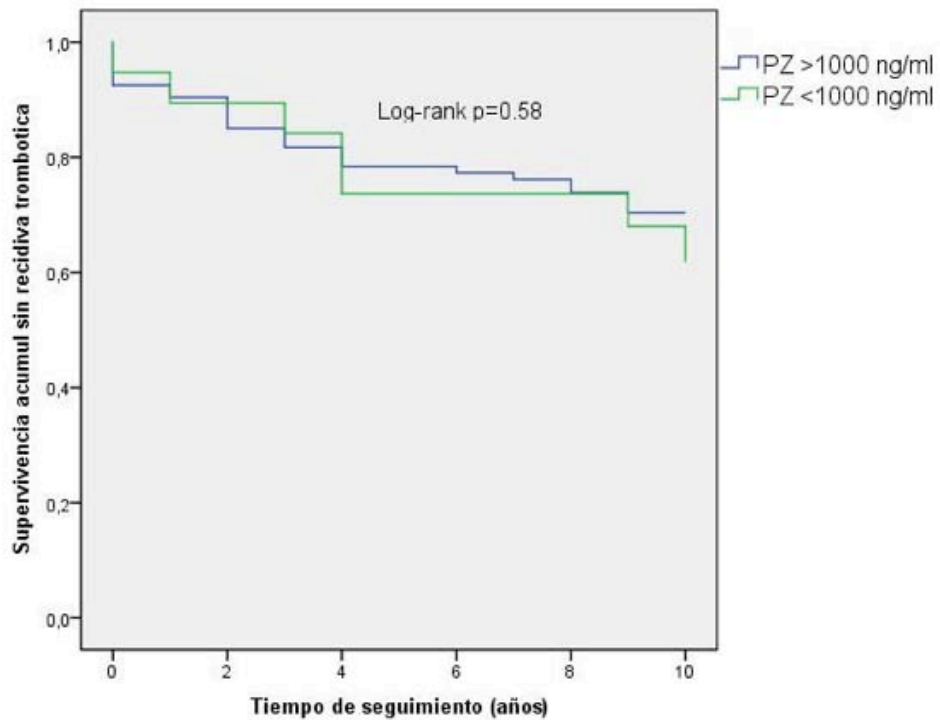


Figura 16. Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de recidiva tromboembólica en relación a déficit de PZ.

En el análisis de Kaplan de supervivencia libre de recidiva tromboembólica por territorios vasculares arterial y venoso en relación al déficit de PZ tampoco se encontraron diferencias significativas (P log-rank=0,46 y 0,98 respectivamente).

6.2.3 Relación PZ y enfermedad arteriosclerótica.

En la tabla 12 se resumen las distintas evaluaciones realizadas en el estudio de relación entre niveles plasmáticos de PZ y enfermedad aterosclerótica. Los pacientes con mas factores de riesgo cardiovascular al inicio del estudio no presentaban niveles significativamente diferentes de PZ respecto a los que no tenían o tenían solo uno (1715 vs 1683 ng/ml respectivamente, $P= 0,82$). Tampoco se observaron diferencias de concentración plasmática de PZ en relación a los distintos scores de

riesgo cardiovascular de Framingham, bajo, medio y alto (1652 vs 1785 vs 1802 ng/ml respectivamente, $P=0,62$).

Se realizó el ITB en 96 pacientes de la cohorte, observando normalidad del mismo en 64 (66%) pacientes, siendo patológico en 32 (34%). En los pacientes con ITB patológico, la afectación leve-moderada fue la más frecuente, seguida por aquellos con ratio ITB >1.3 indicativo de calcificación arterial. Los pacientes con ITB normal respecto al patológico no evidenciaron diferencias en la concentración plasmática de PZ (1517 vs 1860 ng/ml respectivamente, $P=0,11$). Los grados de severidad de la arteriopatía periférica según ITB tampoco se relacionaron con los niveles plasmático de PZ (leve 2018 ng/ml, moderada 1914 ng/ml, calcificación arterial 1533 ng/ml, $P=0,20$).

Al final del estudio un total de 63 (55,8%) pacientes de la cohorte inicial habían presentado o tenían patología tromboembólica en territorio arterial. La concentración plasmática de PZ no varió en aquellos con base ateromatosa causante del proceso tromboembólico arterial respecto de los que tenían otra etiología (1693 vs 1737 ng/ml respectivamente, $P=0,83$).

Tabla 12. Relación PZ con equivalentes de enfermedad ateromatosa arterial.

	<i>Pacientes evaluados (n %)</i>	<i>PZ plasmática (media, ng/ml)</i>	<i>p</i>
Numero de factores de riesgo de trombosis arterial ¹	116		
0-1 factor	44 (38%)	1683	
2 o más factores	72 (62%)	1715	0,82
Riesgo cardiovascular			
Score Framingham ¹	116		
Bajo	73 (63%)	1652	
Medio	29 (25%)	1785	
Alto	14 (12%)	1802	0,62
ITB	96		
Normal (>0.9)	64 (66%)	1517	
Arteriopatía leve (0.9-0.7)	16 (17%)	2018	
Arteriopatía moderada (0.7-0.4)	7 (7%)	1914	
Arteriopatía grave (<0.4)	0		
Calcificación arterial (>1.3)	9 (10%)	1533	0,20
Trombosis arterial ²	63		
Ateromatosa-ateroembólica	38 (60%)	1693	
Otra etiología	25 (40%)	1737	0,83

¹ En evaluación inicial previo a evento trombótico de debut.

² Total de pacientes con algún evento tromboembólico en territorio arterial evaluado al final del seguimiento.

6.2.4 Relación Anti-PZ y recidiva trombótica.

Se realizó el análisis de Kaplan de supervivencia libre de recidiva trombótica tanto arterial como venosa en los pacientes con y sin positividad para anticuerpos anti-PZ, subtipo IgG e IgM (Figura 17) sin encontrarse diferencias significativas (P log-rank=0,54), que tampoco se apreciaron en un subanálisis por territorios vasculares arterial o venoso.

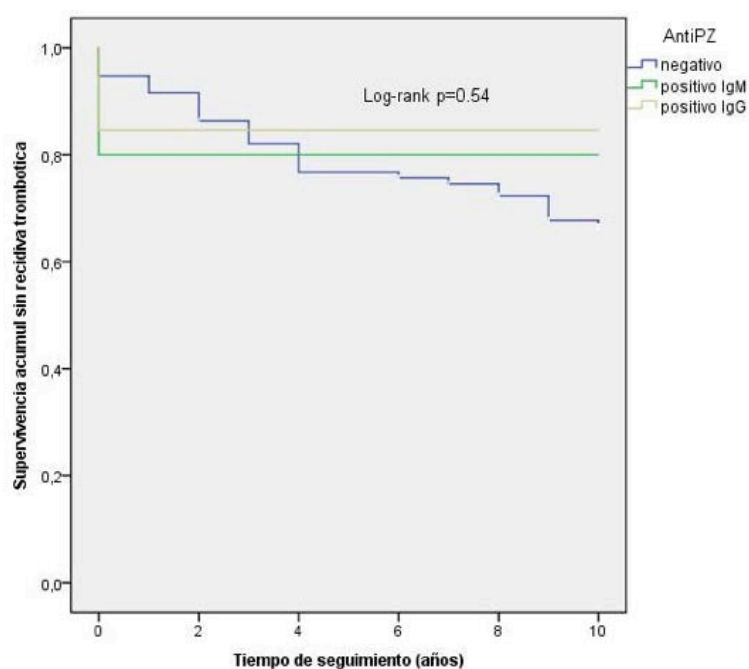


Figura 17. Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de recidiva tromboembólica en relación a positividad para anticuerpos anti-PZ.

7 DISCUSIÓN

Los resultados de nuestra tesis demuestran una asociación entre los niveles plasmáticos decrecientes o déficit de PZ y un primer evento tromboembólico vascular, tanto arterial como venoso. En 2008 ya publicamos resultados similares [98], aunque como comentamos previamente, en una población de pacientes algo diferente en la que se mezclaban aquellos con un primer evento tromboembólico y con antecedentes trombóticos previos. En los últimos años algunos estudios clínicos habían avalado la asociación déficit de PZ y trombosis en consonancia con nuestros resultados, si bien la mayoría no detallaban el número de eventos trombóticos, además de ser estudios de baja calidad, compendio de casos, retrospectivos o transversales no controlados. Entre estos estudios el más relevante, por tratarse del único metaanálisis publicado hasta el momento es el de Sofi et al en 2010 [105]. En este se seleccionaron para el análisis final únicamente aquellos estudios controlados que evaluaban la relación PZ y trombosis vascular y/o patología obstétrica, agrupando finalmente un total de 4218 pacientes y 4778 controles [44-47,61,65,68,69,73,79,81,84,91-95,106-109]; comentar que entre los estudios seleccionados se encuentra nuestro estudio de 2007 [98]. El metaanálisis demuestra que el déficit de PZ incrementa en 2.9 veces el riesgo de asociar un evento trombótico de manera global, sin diferencias entre los territorios vasculares arterial y venoso (Figura 18), siendo por tanto la primera evidencia con cierta solidez estadística de una asociación que, aunque se había constatado en experimentación animal, no se concretaba en los estudios clínicos.

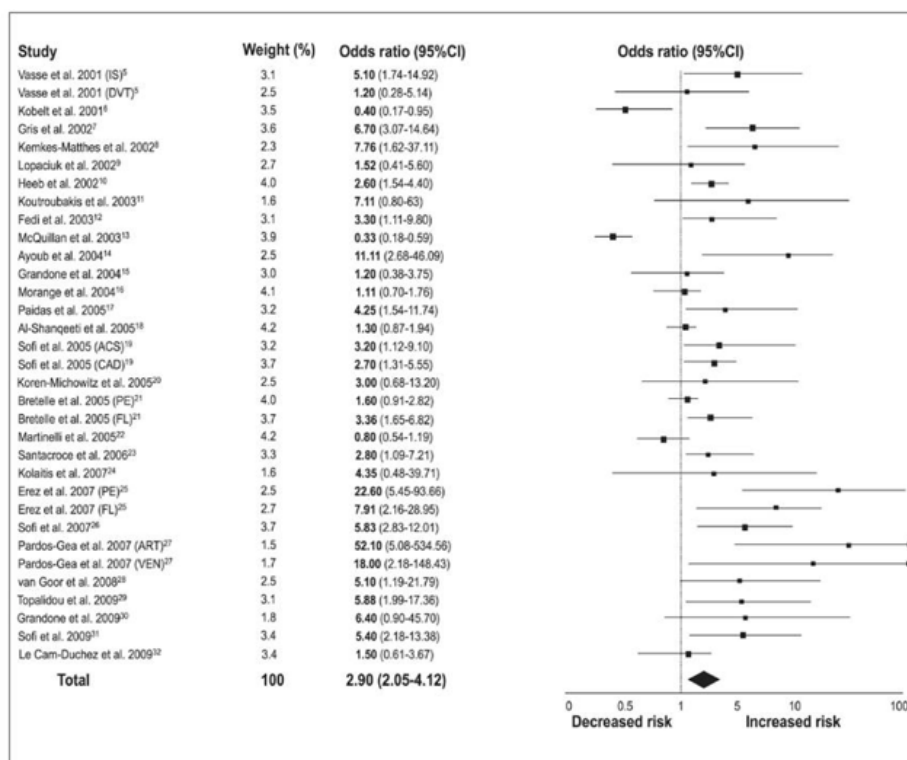


Figura 18. Riesgo de trombosis asociado a déficit de PZ. Metaanálisis (Sofi et al 2010).

IS: ictus isquémico, DVT: trombosis venosa profunda, ACS síndrome coronario agudo, CAD enfermedad arterial coronaria, PE preeclampsia, FL pérdida fetal, ART trombosis arterial vascular, VEN tromboembolia venosa.

7.1 Estableciendo causa y efecto en la asociación déficit de PZ y trombosis.

La evidencia expuesta creemos es de suficiente calidad como para afirmar la existencia de algún tipo de asociación entre el déficit de PZ y la trombosis. A partir de ahora discutiremos las probables relaciones entre ambas. La primera y más lógica relación sería considerar el déficit de PZ como un factor de riesgo protrombótico de tipo congénito. Aunque son muchos los datos indirectos que avalarían este hecho, la ausencia de estudios prospectivos en población sana impide una constatación

clínica definitiva. Otra hipótesis implicaría que el proceso trombótico per se, por un mecanismo desconocido, disminuiría la concentración plasmática de PZ, y esta sería únicamente un marcador de trombosis. Una tercera vía de relación implicaría que, si bien al inicio el proceso trombótico provocaría un descenso en la concentración de PZ plasmática, este déficit a su vez de manera retrograda actuaría como un factor de riesgo adquirido que intensificaría la trombosis. Situaremos los hallazgos de nuestra tesis en cada una de las hipotéticas direcciones en la relación déficit de PZ y trombosis vascular a medida que se expongan (Figura 19).

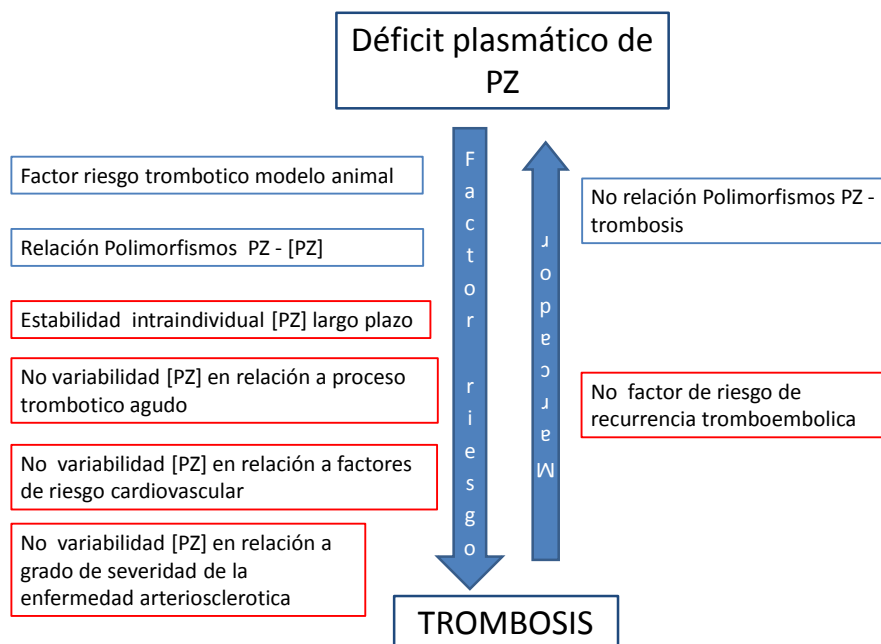


Figura 19. Relación déficit de PZ y trombosis vascular.

Evidencias hasta la actualidad en recuadros azules y hallazgos de nuestra tesis en rojo.

En los últimos años han aparecido estudios que demuestran claramente la existencia de polimorfismos del gen de la PZ (PZ A-13G, PZ G-103A, PZG79A) que determinan su concentración plasmática en la población general. En particular, se ha

observado como los alelos, haplotipos y genotipos más raros de estos polimorfismos (aquellos presentes en <3% de la población) se relacionan significativamente con los menores niveles plasmáticos de PZ [110].

Los resultados de nuestra tesis demuestran que la concentración plasmática de PZ se mantiene de manera individual sin cambios significativos muy a largo plazo, dato nunca antes publicado. Debido al prolongado periodo de tiempo de seguimiento nos atrevemos a inferir por tanto que en un mismo individuo la concentración plasmática de PZ de manera fisiológica se mantendrá de por vida en un valor similar, aunque habrá que certificar este hecho en un prospectivo en población sana ya que el grupo de seguimiento era el de los pacientes con trombosis. Esta estabilidad o constante en la concentración plasmática de PZ apoyaría sin duda la explicación previa por lo que la heterogeneidad manifiesta en los valores de PZ poblacional sería de exclusivo control génico y también el hecho de que en la supuesta relación PZ y trombosis, el déficit sea primario y se comporte como un factor de riesgo trombotico congénito (Figura 19). A pesar de todo, la mayoría de estudios en polimorfismos del gen de la PZ de momento no se han demostrado como factores de riesgo tromboticos, y los pocos en los que se ha encontrado relación [111-114], son de baja calidad y no en todos ellos el riesgo trombotico del polimorfismo es secundario a un déficit de PZ [111,113]. Comentaremos aquí que en el caso de la proteasa ZPI, sí que se han evidenciado de una manera más clara una serie de polimorfismos como factores de riesgo trombotico, en especial el que produce la mutación sin sentido Arg67Stop, que el grupo español de Corral et al publicó en 2006, encontrando un prevalencia algo menor que la de otros factores tromboticos como FV Leiden o mutación gen de la protrombina 20210 pero con un incremento del riesgo trombosis venosa similar cercano a un OR de 3,4 [88]. Esta mutación sin sentido provocaría a nivel teórico un déficit plasmático de ZPI real,

pero de nuevo como ocurre en los polimorfismos de PZ, existen otros estudios que no han detectado relación entre déficit de ZPI y trombosis venosa [68].

Los resultados de nuestra tesis, así como los de nuestro estudio previo [98] demuestran que no existe correlación entre la concentración de PZ y el intervalo temporal desde el debut trombotico agudo. Están por lo tanto en línea con otros estudios como el de Staton et al [55] que no encontró diferencias en el nivel de PZ determinado a los 7 días respecto de 3-6 meses posteriores al ictus o el de Sofi et al [106] el que no se evidenciaron diferencias en la concentración plasmática de PZ entre pacientes con enfermedad coronaria crónica estable respecto de aquellos con inestabilización o IAM. Como comentamos en la introducción, tampoco existe evidencia de que moléculas asociadas al proceso inflamatorio agudo influyan en la síntesis de PZ. Es cierto que en condiciones de gran consumo de factores de la coagulación (CID) se han demostrado déficits de PZ asociados [115], pero como ocurre con el resto de moléculas implicadas en la cascada coagulatoria, siendo un ejemplo no válido para los mecanismos de trombosis que llevan a procesos vasculares tromboembólicos habitualmente. Creemos por tanto que la concentración plasmática de PZ no varía de manera significativa de manera secundaria a los mecanismos de trombosis aguda, dato a favor de que el déficit de PZ fuera un factor de riesgo primario (Figura 19).

Los resultados de nuestra tesis demuestran que el déficit de PZ no se asocia más frecuentemente con trombosis de origen ateromatoso así como tampoco con mayor severidad de la enfermedad arteriosclerótica. Los estudios que inicialmente evaluaron probables interacciones entre arteriosclerosis y déficit de PZ fueron realizados en cardiopatía isquémica [65,106]; no se encontró relación con el número de factores de riesgo y tampoco con el número de vasos coronarios afectados, en este caso evaluados de manera objetiva por coronariografía. Sin embargo los estudios realizados en

arteriopatía periférica demostraron resultados contrarios a estos. De hecho, en nuestro primer estudio publicado en 2007 [98] objetivamos que la población con mayor número de factores de riesgo cardiovascular y con arteriopatía periférica clínica presentaban el menor nivel plasmático de PZ respecto a todas las demás entidades tromboembólicas tanto arteriales como venosas. No evaluamos el grado de afectación arterial periférico (ni por estadios clínicos de claudicación ni por ITB). Supusimos que la arteriopatía periférica al ser un equivalente de afectación vascular de grandes vasos aorto-iliaco-femoral y por lo tanto, al menos en extensión, afectar a una mayor superficie del territorio arterial, podría comprometer la conocida síntesis de PZ por parte del endotelio [7] que, aunque minoritaria respecto a la síntesis hepática podría influir negativamente en la concentración plasmática de la misma. Además se había demostrado la presencia de PZ en las lesiones vasculares de pacientes con ateromatosis [116], por lo que, bien por secuestro o uso en proceso trombótico ateromatoso, se podría disminuir su concentración plasmática. En ese momento planteamos que, o bien la concentración de PZ disminuiría secundariamente al proceso trombótico vascular aterosclerótico siendo simplemente un marcador de la severidad del mismo, o bien un déficit primario de PZ podría, de manera desconocida, provocar más frecuentemente trombosis ateromatosa respecto de trombosis arterial de otra etiología. Poco tiempo después aparecieron dos estudios en trombosis arterial periférica [73,108], que a diferencia del nuestro si evaluaba el grado de enfermedad, aunque exclusivamente por estadios clínicos de claudicación (estadios de Fontaine). Estos estudios objetivaron asociación entre descenso de concentración plasmática de PZ y mayor grado de arteriopatía periférica clínica. Los resultados de nuestra tesis a este respecto parten del propósito de aclarar estas discrepancias, basándonos en una prueba complementaria objetiva como el ITB a la hora de evaluar tanto el grado de enfermedad arterial

periférica así como el riesgo cardiovascular global y la magnitud de la enfermedad ateromatosa ya que son muchas las evidencias que este índice vascular es un marcador objetivo de riesgo de muerte cardiovascular, ictus, cardiopatía isquémica [103,117,118] y un equivalente arteriosclerótico de primer orden. Tanto la realización del ITB como el hecho de que evaluamos de manera objetiva el riesgo trombótico arterial a través de los scores aceptados en todos los protocolos, incrementan la veracidad de los hallazgos internacionales y nunca antes se habían realizado en otros estudios. Nuestros resultados avalan de manera objetiva la no existencia de una relación específica del déficit de PZ con la enfermedad arteriosclerótica. Descartamos por tanto que los cambios en la concentración de PZ actúen como un marcador de ateromatosis. El déficit de PZ por tanto podría ser un factor de riesgo primario para trombosis en territorio arterial pero sin mayor frecuencia de enfermedad ateromatosa (Figura 19). Podría por tanto actuar como estado protrombótico en las fases finales de la enfermedad ateromatosa incrementando las complicaciones trombóticas de la superficie de una lesión vascular ya establecida. De todos modos tenemos que comentar que en general las trombofilias primarias congénitas han evidenciado mayor riesgo de trombosis venosa y existen muchas dudas en los estudios sobre el papel real en la trombosis arterial [119,120], por lo que un déficit de PZ que como comentamos tendría una base predominantemente congénita, no parecería tener muchas probabilidades de ser específicamente un factor de riesgo de trombosis arterial, aunque esto habrá que descartarlo en futuros estudios prospectivos.

Los resultados de nuestra tesis indican que el déficit de PZ no es un factor de riesgo de recidiva trombótica vascular arterial ni venosa. Tampoco demostramos que el déficit de PZ incrementara las posibilidades de nuevos episodios tromboembólicos en el territorio vascular opuesto al de debut, dicho en otros términos, no se relaciono con mayor riesgo de trombosis concomitante venosa y arterial. Existen únicamente

dos estudios prospectivos previos al nuestro (Tabla 13). El primero fue el de Morange et al [81], basado en los resultados del estudio PRIME. Este fue un estudio prospectivo diseñado para encontrar una explicación a la diferencia de eventos isquémicos coronarios objetivada entre población francesa e irlandesa de mediana edad no explicable por los factores de riesgo clásicos e identificar nuevas variables de riesgo de trombosis dentro de las que se evaluó la PZ. Entre una amplia cohorte de pacientes (más de 10.000) entre 55 y 59 años de edad seleccionados en Francia e Irlanda, a los que durante 5 años se les evaluó el riesgo de evento isquémico coronario o muerte origen cardiaco, se seleccionaron 890 para evaluar la PZ. El déficit de PZ considerado (<10% grupo control, < 930 ng/ml) no se comportó como un factor de riesgo de nueva trombosis arterial coronaria o muerte cardiaca. Los puntos fuertes de este estudio son la amplia muestra poblacional y el hecho de evaluar debut trombótico y no recidiva. El estudio de Sofi [78] es el único que ha demostrado hasta el momento que el déficit de PZ sea un factor de riesgo trombótico. En concreto observaron que una concentración de PZ menor del 5% de su grupo control (<609ng/ml), aunque no el descenso por cuartiles de PZ, incrementaba el riesgo de recidiva de cardiopatía isquémica postrevascularización. Podría por lo tanto pensarse que el riesgo trombótico solo se incrementaría por debajo de un umbral concreto de concentración de PZ, y que en nuestra tesis y el estudio de Morange no habíamos alcanzado. Revaloramos entonces nuestros datos y calculamos que el déficit de PZ <5% del grupo control correspondía a <708 ng/ml; con este nuevo valor definiendo el déficit de PZ no cambiaron nuestros resultados previos y no objetivamos mayor asociación con recidiva trombótica. Creemos además que el estudio de Sofi es el de menor calidad de los tres si tenemos en cuenta que como prospectivo solo tiene un seguimiento temporal limitado (<1 año), además de evaluar únicamente complicaciones isquémicas post revascularización coronaria.

Tabla 13. Estudios prospectivos evaluando déficit de PZ como factor de riesgo trombótico.

	<i>Morange [81]</i>	<i>Sofi [78]</i>	<i>Tesis</i>
N	890	193	113
Periodo	1991-1994	2003	2004-2014
Seguimiento medio	5 años	10 meses	9.2 años
Nacionalidad población	Francia/Irlanda	Italia	España
Edad media (años)	55	66	50
Definición de déficit PZ (concentración plasm.)	<10% (930 ng/ml)	<5% (609 ng/ml)	<1000 ng/ml
Evaluación prospectiva	Nueva trombosis	Recidiva tr	Recidiva tr
End points	IAM/angor de debut Muerte causa cardiaca	IAM post-revascularización	Tr arterial Tr venosa
Déficit PZ factor de riesgo (s/n)	NO	SI	NO

A este respecto los resultados de nuestra tesis apoyarían la evidencia del estudio de Morange, pero ampliando al doble el tiempo de seguimiento hasta casi 10 años y a otros tipos de trombosis arterial a parte de cardiopatía isquémica así como trombosis venosas.

De todos modos hay que sopesar con cautela las conclusiones extraídas de nuestro trabajo ya que sabemos que los factores de riesgo de recidiva trombótica no son siempre exactamente los mismos que los asociados a un primer evento trombótico [104,121]. Por ejemplo los datos demuestran la llamada “paradoja” de la recurrencia tanto en trombosis arterial como venosa. La hipertensión arterial incrementa 4 veces el riesgo de un primer ictus pero solo levemente (1-1,5 veces) su recurrencia. La edad, el factor de riesgo más potente para primera trombosis venosa no ejerce ningún efecto en la recurrencia. Asimismo las consideradas trombofilias congénitas ejercen un papel importante en primera trombosis y mucho menor, casi la mitad, en incremento del riesgo de recidiva tromboembolismo venoso (Factor V Leiden OR 3,4 versus 1,5). Son preferibles por tanto la realización de futuros estudios basados en evaluar el riesgo de primer evento trombótico asociado a déficit de PZ mas que evaluar recidivas.

Brevemente comentaremos la evidencia en trombosis sobre otras moléculas similares a la PZ, cofactores de proteasas anticoagulantes, el principal y más reconocido seria la Proteína S, así como el EPCR (endothelial protein C receptor) y la trombomodulina (Tabla 1). El déficit de proteína S está claramente demostrado y aceptado como factor de riesgo trombofílico creemos debido a dos factores diferenciales con la PZ; no solo hace de cofactor activador de la proteína C sino que posee una actividad anticoagulante independiente de esta muy importante (anti factor Va y Xa) [122], cosa que de momento se desconoce para la PZ independiente de su proteasa ZPI, y en segundo término, el déficit congénito de proteína S es bastante común y prevalente. No pasa lo mismo con las dos moléculas EPCR y trombomodulina, al igual que la PZ, no aceptadas de momento como factores establecidos trombofílicos. Esto es debido a la falta de estudios de calidad y sobre todo a resultados dispares no concluyentes de asociación de trombosis. En el caso del EPCR, un receptor transmembrana y cofactor

situado en el endotelio vascular que ancla la Proteína C a las paredes de los vasos para que ejerza su función final anticoagulante, se han evaluado varias mutaciones; 23-bp inserción en exón 3 que se asoció a trombosis venosa y arterial [123], polimorfismo 4600A/G (Ser219Gly) que según estudios no se asociaría o solo débilmente a trombosis venosa y tampoco a cardiopatía isquémica [124,125,126]. La trombosmodulina es una molécula transmembrana expresada en el endotelio vascular con varias funciones anticoagulantes, favoreciendo el anclaje de la trombosina y que podrá ser inhibida por parte de la Proteína C. Los estudios de diversos polimorfismos (Ala455Val, Ala25Thr) de trombosmodulina no han demostrado relación con trombosis venosa [127,128,129], pero parecería existir cierta relación con trombosis arterial, específicamente trombosis coronaria.

La evidencia actual no demuestra que el déficit de PZ sea un factor de riesgo trombotico independiente, aunque la calidad de las pruebas es insuficiente para descartar definitivamente esta hipótesis siendo necesarios más estudios. De todos modos, y en comparación con otros sistemas anticoagulantes como el de antitrombosina en el que existe una clara evidencia de su papel como factor de riesgo en trombofilia, el déficit del sistema PZ/ZPI prevemos que en caso de demostrarse como un factor de riesgo este será más bien modesto (similar al aceptado para otro sistema anticoagulante como el de heparin cofactor II) y sólo sería apreciable combinada con otros factores protromboticos.

En conclusión, a pesar de haber corroborado la existencia de una relación entre el fenómeno trombotico arterial y venoso con el déficit de PZ, nuestros resultados no han aclarado definitivamente las causas de esta asociación, con datos a favor de considerar el déficit de PZ como un probable factor de riesgo protrombotico primario congénito más que un simple marcador de trombosis (estabilidad concentración

plasmática de PZ a largo plazo, no variabilidad concentración plasmática de PZ en relación con proceso trombótico agudo, así como tampoco en relación a enfermedad arteriosclerosa), pero sin confirmación de este hecho en el estudio prospectivo en el que no se objetivo el déficit de PZ incrementara el numero de recidivas trombóticas ni en territorio arterial ni venoso. Creemos sin embargo mandatorio acabar de discernir la incógnita del papel como factor de riesgo trombótico del déficit de PZ mediante la realización de un estudio prospectivo y controlado amplio en población sana.

7.2 Anticuerpos anti-PZ. Algún papel real en trombosis vascular?

Los resultados de nuestra tesis objetivan una asociación inicial entre la trombosis arterial de debut y presencia de anticuerpos anti-PZ del subtipo IgG, manteniéndose esta para todos los tipos de eventos trombóticos arteriales evaluados. En nuestro estudio previo [98] ya evidenciamos la existencia de anticuerpos anti-PZ en trombosis vascular no gestacional, aunque la población de estudio incluyera pacientes con trombosis arterial tanto de debut como recidivante. Los otros estudios que han publicado resultados respecto a anticuerpos anti-PZ en trombosis vascular se han realizado en pacientes con síndrome antifosfolipídico/AL [130,131]. En un estudio en el año 2001 [132], y otro en 2003 [59] se publicaron una serie de enfermos con AL y/o aCL, algunos con criterios de SAF por trombosis vascular o patología gestacional y otros asintomáticos; se comprobó que la concentración plasmática media de PZ en todos estos pacientes era menor respecto a población control y pacientes con trombosis venosa de otra etiología. En otro estudio con una muestra más amplia de pacientes, se constato de nuevo una asociación con déficit de PZ, pero en este caso únicamente en pacientes con SAF establecido y no en portadores asintomáticos

de AL/aCL [131]. Este mismo estudio demostró in vitro como AL/aCL en presencia de Beta2GPI impedían el efecto anticoagulante del complejo PZ/ZPI, teorizándose que estos anticuerpos antifosfolípidos actuarían a través de competir/impedir la unión a membrana fosfolipídica de PZ y por lo tanto esto podría ser otro mecanismo trombofílico en SAF. A falta de mas estudios a este respecto, no quedaba claro si el déficit de PZ en SAF estaba únicamente en relación al proceso trombótico o si AL/aCL pudieran influir en su concentración plasmática a través de unión directa y aclaramiento del complejo PZ/ZPI. Este fue el motivo de que se buscaran otras causas de déficit de PZ en SAF, como los anticuerpos anti-PZ. Fue en los mismos estudios referidos donde se determinaron anti-PZ, en ambos mediante ELISA comercial. En el primer estudio no se encontraron anti-PZ [131] y el segundo se obtuvo un mayor titulo anti-PZ subtipo IgM en pacientes con AL respecto controles, aunque no se evidenció relación con trombosis [130]. En nuestro laboratorio de Investigación (Dr Ordi) en 2004 se determinó los anticuerpos anti-PZ mediante un home-made ELISA en 20 pacientes con SAF, sin que se evidenciara positividad en ningún caso (datos no publicados). Comentar que en el síndrome de Sneddon y en la enfermedad de Behçet, ambas asociadas a eventos trombóticos de mecanismo fisiopatológico desconocido, se han objetivado concentraciones plasmáticas de PZ menores respecto población sana [133,134] que según autores podrían ser consecuencia y para otros causa coadyuvante trombótica. En todo caso, no se ha encontrado el motivo de esta asociación ya que los polimorfismos de PZ tampoco han explicado el déficit de PZ en el caso del Behçet [135,136]. Creemos que sería justificable por tanto en estas entidades de base autoinmune con trombofilia manifiesta, determinar los anticuerpos anti-PZ tanto para explicar el déficit de PZ como un mecanismo trombótico que no dependiera de la concentración plasmática de este cofactor.

A pesar de que hemos objetivado una asociación entre anticuerpos anti-PZ IgG y trombosis arterial de debut, nuestro estudio prospectivo ha descartado que estos sean un factor de riesgo de recidiva trombotica arterial ni venosa, dato relevante y nunca antes publicado ya que la nuestra es la primera evaluación prospectiva de estos anticuerpos como factores de riesgo trombotico realizada en cualquier tipo de trombosis, vascular o gestacional-placentaria. Nuestros resultados irían por tanto en contra de que estos anticuerpos tuvieran un papel real como factor de riesgo trombotico vascular. Además se ha demostrado positividad para anticuerpos anti-PZ tanto IgG como IgM en un 5-25% de población sana, confirmada también en nuestros controles [130,137] y disminución de su titulo en la gestación fisiológica no complicada, hechos que apoyarían la existencia de anticuerpos anti-PZ naturales con funciones en sistema inmune aun no definidas. Aunque no podemos discernir si los detectados en nuestros pacientes con trombosis son autoanticuerpos anti-PZ con o sin poder patogénico, los datos, al menos en trombosis vascular no parecen apoyar un patogenicidad independiente. En el caso de la patología gestacional existe también un gran debate, y se acepta que en algún subgrupo de pacientes con muy elevados títulos de anti-PZ se asociarían complicaciones obstétricas [137,138].

En conclusión, a pesar de haber detectado una discreta asociación entre la presencia de anticuerpos anti-PZ y la trombosis vascular en territorio arterial, con una probable influencia de los mismos en la concentración plasmática de PZ, no se ha corroborado su papel como factor de riesgo de recurrencia trombotica arterial en el estudio prospectivo, dato que, junto a la escasa tasa de positividad y titulo de anticuerpos, y el conocimiento de la existencia de anticuerpos anti-PZ naturales no patogénicos, creemos hace poco probable se llegue a demostrar en el futuro un papel patogénico real en trombosis arterial por lo que no creemos se deban realizar más

estudios en este sentido en población general. De otro modo creemos que si se podría plantear la realización de estudios que determinaran anticuerpos anti-PZ en pacientes con trombosis vascular en contexto de entidades autoinmunitarias para las que no exista una explicación fisiopatológica conocida del mecanismo trombótico, como en enfermedad de Behçet, LES sin SAF, Sneddon y otros.

7.3 Limitaciones o sesgos potenciales del estudio

Idealmente, el número de pacientes y controles incluidos debería haber sido mayor en orden a testar el déficit de PZ prospectivamente como factor de riesgo de recidiva trombótica. Esta evidente limitación de nuestro estudio se ha equilibrado parcialmente con un periodo de seguimiento a muy largo plazo. De todos modos, deberá rectificarse en un futuro estudio prospectivo que quiera evaluar definitivamente al déficit de PZ como potencial factor de riesgo de debut trombótico.

Los pacientes fueron incluidos en el estudio si, como consecuencia del episodio trombótico, se solicitaba un estudio de trombofilia. Se decidió que de esta manera habría más probabilidades de estudiar casos de trombosis idiopáticas o poco clásicas y ver si en esta población el déficit de PZ podría ser una explicación a las mismas. En contrapartida entendemos que este hecho supone un potencial sesgo de selección de cuadros trombóticos que por una parte tendrían más frecuentemente trombofilias congénitas como base, así como asociar menos frecuentemente factores de riesgo clásicos que, por ejemplo, podría haber influido negativamente al estudiar la relación PZ con aterotrombosis. A este respecto comentar que efectivamente hemos encontrado más casos de trombofilias que los esperables con una población de trombosis con más factores de riesgo clásicos, pero también es cierto que no hemos objetivado relación

significativa entre la presencia de trombofilia y una influencia real en la concentración de PZ, a diferencia de lo que otros estudios referían.

No existe consenso internacional en la definición de déficit PZ y existe cierta heterogeneidad en los estudios. De todos modos no creemos que el límite escogido en nuestro estudio (<1000 ng/ml) suponga un sesgo para los resultados ya que se aproxima e incluso es igual al usado por otros [44,46,81], correspondiente aproximadamente a valores por debajo del percentil 10% en concentración plasmática de PZ de la población general.

Podría criticarse la no determinación de la concentración de la proteasa ZPI en nuestro estudio. Pero si nos basamos en la evidencia ya comentada previamente creemos que la determinación exclusiva de la concentración plasmática de PZ es correcta en el afán de cuantificar la actividad de todo el complejo PZ/ZPI anticoagulante sobre el proceso trombótico debido a que, en primer lugar, la concentración de ambas moléculas está en correlación directa ya que forman un complejo PZ-ZPI circulante, en segundo lugar la función de la proteasa ZPI es proporcional y lineal a su concentración y finalmente la actividad de la ZPI sin el cofactor PZ es de poca relevancia según lo conocido. Hemos constatado como los polimorfismos de la PZ casi siempre se pondrán de manifiesto con un fenotipo alterado en cuanto a la concentración de la misma, por lo que en la disquisición entre determinar concentración o polimorfismos de PZ en los estudios de asociación con trombosis creeríamos más indicada la determinación de los niveles plasmáticos. Por el contrario, si quisiéramos evaluar el probable papel como factor de riesgo trombótico de la ZPI, creemos que sería más rentable la determinación de sus polimorfismos y no de su nivel plasmático; los polimorfismos de esta proteasa no suelen alterar fenotípicamente su nivel plasmático y si probablemente su conformación y actividad. Lamentablemente no está a disposición de la mayoría de laboratorios la determinación de la actividad de la ZPI.

8 CONCLUSIONES

1. El déficit plasmático de PZ es una variable asociada de manera independiente a un primer evento trombótico vascular tanto arterial como venoso.
2. El déficit plasmático de PZ no se asocia más frecuentemente a trombosis vascular arterial de etiología aterotrombótica ni a la severidad de la enfermedad arteriosclerótica.
3. La concentración plasmática de PZ es estable a largo plazo a nivel individual en adultos.
4. El déficit plasmático de PZ no es un factor de riesgo independiente de recurrencia trombótica arterial ni venosa.
5. Los anticuerpos anti-PZ son una variable asociada a trombosis vascular arterial pero no a trombosis venosa.
6. La concentración plasmática de PZ se correlacionó inversamente con el título de anticuerpos anti-PZ en pacientes con trombosis arterial pero no venosa.
7. Los anticuerpos anti-PZ no son un factor de riesgo independiente de recurrencia trombótica arterial ni venosa.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, et al. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 102–115.
2. Broze GJ Jr, Miletich JP. Human protein Z. *J Clin Invest* 1984; 73: 933–938.
3. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9250–9255.
4. Prowse CV, Esnouf MP. The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. *Biochem Soc Trans* 1977; 5: 255–256.
5. Broze GJ Jr. Protein Z-dependent regulation of coagulation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 8–13.
6. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. *Haemostasis* 1995; 25: 312–316.
7. Vasse M, Denoyelle C, Corbière C, et al. Human endothelial cells synthesize protein Z, but not the protein Z dependent inhibitor. *Thromb Haemost* 2006; 95:519–523.
8. Cesari, F., Sofi, F., Evangelisti, L., Franco Gensini, G., Abbate, R. & Fedi, S. Protein Z is not synthesized by human umbilical vein endothelial cells. *Thromb Res*, 2006; 118, 545–546.
9. Fujimaki K, Yamazaki T, Taniwaki M, et al. The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon. *Biochemistry* 1998; 37:6838–6846.
10. Miletich JP, Broze GJ Jr. Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and effect of warfarine therapy. *Blood* 1987; 69: 1580–1586.
11. McDonald JF, Shah AM, Schwalbe RA, et al. Comparison of naturally occurring vitamin K-dependent proteins: correlation of amino acid sequences and membrane binding properties suggests a membrane contact site. *Biochemistry* 1997; 36: 5120–5127.

12. Højrup P, Jensen MS, Petersen TE. Amino acid sequence of bovine protein Z: a vitamin K-dependent serine protease homolog. *FEBS Lett* 1985; 184: 333–338.
13. Persson E, Stenflo J. Comparison of the Ca²⁺ binding properties of the gamma-carboxyglutamic acid-containing module of protein Z in the intact protein and in N-terminal fragments. *FEBS Lett* 1992; 314: 5–9.
14. Sejima H, Hayashi T, Deyashiki Y, et al. Primary structure of vitamin K-dependent human protein Z. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 661–668.
15. Ichinose A, Takeya H, Espling E, et al. Amino acid sequence of human protein Z, a vitamin K-dependent plasma glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172: 1139–1144.
16. Hogg PJ, Stenflo J. Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombin. Consequences for the amidolytic activity of thrombin and the interaction of thrombin with phospholipids vesicles. *J Biol Chem* 1991; 266: 10953–10958.
17. Kemkes-Matthes, B. & Matthes, K.J. Protein Z deficiency: a new cause of bleeding tendency. *Thromb Res*, 1995; 79, 49–55.
18. Ravi, S., Mauron, T., Lammle, B. & Wuillemin, W.A. Protein Z in healthy human individuals and in patients with a bleeding tendency. *Br J Haematol* 1998, 102, 1219–1223.
19. Rohl K, Jager D, Barth J. Protein-Z-deficiency as a rare case of unexpected perioperative bleeding in a patient with spinal cord injury. *Spinal Cord* 2006.
20. Greten, J., Kemkes-Matthes, B. & Nawroth, P.P. Prothrombin complex concentrate contains protein Z and prevents bleeding in a patient with protein Z deficiency. *Thromb Haemost*, 1995; 74, 992–993.
21. Hogg, P.J. & Stenflo, J. Interaction of human protein Z with thrombin: evaluation of the species difference in the interaction between bovine and human protein Z and thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 178, 801–807.
22. Gamba, G., Bertolino, G., Montani, N., Spedini, P. & Balduini, C.L. Bleeding tendency of unknown origin and protein Z levels. *Thromb Res*, 1998; 90, 291–295.

23. Han X, Huang ZF, Fiehler R, et al. The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. *Biochemistry* 1999; 38: 11073–11078.
24. Zhang, J. & Broze, Jr G.J. (2001) Mouse protein Z-dependent protease inhibitor cDNA. *Thromb Haemost*, 85, 861–865.
25. Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor. *Blood* 2000; 96: 3049–3055.
26. Tabatabai A, Fiehler R, Broze GJ Jr . Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 85:655–660.
27. A.R. Rezaie, J.S.J.S. Bae, C. Manithody, S.H. Qureshi, L. Yang, Protein Z-dependent protease inhibitor binds to the C-terminal domain of protein Z, *J. Biol. Chem.* 2008; 283:19922–19926.
28. Wei Z, Yan Y, Carrell RW, Zhou A. Crystal structure of protein Z-dependent inhibitor complex shows how protein Z functions as a cofactor in the membrane inhibition of factor X. *Blood*. 2009 Oct 22; 114(17):3662-7.
29. Huang X, Yan Y, Tu Y, Gatti J, Broze GJ Jr, Zhou A, Olson ST. Structural basis for catalytic activation of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) by protein Z. *Blood*. 2012 Aug 23; 120(8):1726-33.
30. Qureshi SH, Lu Q, Manithody C, Yang L, Rezaie AR. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor interactive-sites of protein Z. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Sep; 1844(9):1631-7.
31. Huang X, Dementiev A, Olson ST, Gettins PG. Basis for the specificity and activation of the serpin protein Z-dependent proteinase inhibitor (ZPI) as an inhibitor of membrane-associated factor Xa. *J Biol Chem*. 2010 Jun 25; 285(26):20399-20409.
32. Rezaie, A.R. Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism. Evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa. *J Biol Chem* 1998; 273: 16824–16827.

33. Heeb MJ, Cabral KM, Ruan L. Down-regulation of factor IXa in the factor Xase complex by protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem* 2005 Oct 7; 280(40):33819-25.
34. Gacka MA, Małeckı R, Adamiec R. Participation of protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z system in the pathomechanism of thrombotic complications. *Int J Angiol*. 2010 Winter; 19(4):e120-5.
35. Corral J, Gonzales-Conejero R, Hernandez-Espinosa D, Vicente V. Protein Z/Z-dependent protease inhibitor (PZ/ZPI) anticoagulant system and thrombosis. *Br J Haematol* 2007; 137:99-108.
36. Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2007; 5(Suppl 1):102-15.
37. Becker R. The importance of factor Xa regulatory pathways in vascular thromboresistance: Focus on protein Z. *J Thromb Thrombolysis* 2005; 19:135-7.
38. Broze GJ. Protein-Z and thrombosis. *Lancet* 2001; 357:600-1.
39. Konstantinides, S., Schafer, K., Thinnis, T. & Loskutoff, D.J. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation*; 2001; 103: 576–583.
40. Huang X, Rezaie AR, Broze GJ Jr, Olson ST. Heparin is a major activator of the anticoagulant serpin, protein Z-dependent protease inhibitor. *J Biol Chem*. 2011 Mar 18;286(11):8740-51.
41. Huang X, Swanson R, Broze GJ Jr, Olson ST. Kinetic characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor reaction with blood coagulation factor Xa. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31; 283(44):29770-83.
42. Yurdakök M, Gürakan B, Ozbag E, et al. Plasma protein Z levels in healthy newborn infants. *Am J Hematol* 1995; 48: 206–207.
43. Santacroce R, Cappucci F, Di Perna P, et al. Protein Z gene polymorphisms are associated with protein Z plasma levels. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1197–1199.
44. Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001;357:933-4.

45. Van Goor MP, Dippel DW, Jie KS, de Maat MP, Koudstaal PJ, Leebeek FW. Low protein Z levels but not the protein Z gene G79A polymorphism are a risk factor for ischemic stroke. *Thromb Res* 2008;123:213-8.
46. Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM. Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost* 2005;3:2817-9.
47. Santacrose R, Sarno M, Cappucci F, et al. Low protein Z levels and risk of occurrence of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2417–2422.
48. McQuillan AM, Eikelboom JW, Hankey GJ, et al. Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke* 2003; 34: 2415–2419.
49. Steffano B, Forastiero R, Martinuzzo M, et al. Low plasma protein Z levels in patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:411–412.
50. Vasse M. Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb Haemost.* 2008 Oct;100(4):548-56.
51. Refaai MA, Ahn C, Lu L, et al. Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1628–1629.
52. Sugawara H, Iwata H, Souri M, et al. Regulation of human protein Z gene expression by liver-enriched transcription factor HNF-4alpha and ubiquitous factor Sp1. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2250–2258.
53. Rice GI, Futers TS, Grant PJ. Identification of novel polymorphisms within the protein Z gene, haplotype distribution and linkage analysis. *Thromb Haemost* 2001; 85: 1123–1124.
54. Lichy C, Kropp S, Dong-Si T, et al. A common polymorphism of the protein Z gene is associated with protein Z plasma levels and with risk of cerebral ischemia in the young. *Stroke* 2004; 35: 40–45.
55. Staton J, Sayer M, Hankey GJ, et al. Protein Z gene polymorphisms, protein Z concentrations, and ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36: 1123–1127.
56. Souri M, Koseki-Kuno S, Iwata H, et al. A naturally occurring E30Q mutation

- in the Gla domain of protein Z causes its impaired secretion and subsequent deficiency. *Blood* 2005; 105: 3149–3154.
57. Iwata H, Souri M, Kemkes-Matthes B, et al. An additional Glu30Lys substitution in the Gla domain of the protein Z gene is not a common polymorphism but a rare mutation, which would cause its deficiency. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2360–2361.
 58. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ. Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. *Haemostasis* 1995; 25: 312–316.
 59. McColl MD, Deans A, Maclean P, Tait RC, Greer IA, Walker ID. Plasma protein Z deficiency is common in women with antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol.* 2003 Mar;120(5):913-4.
 60. Malyszko J, Skrzydlewska E, Malyszko JS, et al. Protein Z, a vitamin K-dependent protein in patients with renal failure. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 195–196.
 61. Koutroubakis IE, Theodoropoulou A, Sfridaki A, Kouroumalis EA. Low plasma protein Z levels in patients with ischemic colitis. *Dig Dis Sci* 2003;48:1673-6.
 62. Del Vecchio GC, Nigro A, Giordano P, et al. Plasma protein Z and protein C inhibitors and their role in hypercoagulability of thalassemia. *Acta Haematol* 2007; 118: 136–140.
 63. Undar L, Karadogan I, Oztürk F. Plasma protein Z levels inversely correlate with plasma interleukin-6 levels in patients with acute leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Thromb Res* 1999; 94: 131–134.
 64. Fedi S, Sofi F, Brogi D, et al. Low protein Z plasma levels are independently associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2003; 90: 1173–1178.
 65. Cesari F, Gori AM, Fedi S, et al. Modifications of protein Z and interleukin-6 during the acute phase of coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 85–86.
 66. Vasse M, Denoyelle C, Legrand E, et al. Weak regulation of protein Z biosynthesis by inflammatory cytokines. *Thromb Haemost* 2002; 87: 350–351.

67. Girard TJ, Lasky NM, Tuley EA, Broze GJ Jr Protein Z, protein Z-dependent protease inhibitor (serpinA10), and the acute-phase response. *J Thromb Haemost*. 2013 Feb;11(2):375-8.
68. Al-Shanqeeti A, van Hylekama Vlieg A, Berntorp E, et al. Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2005; 93: 411–413.
69. Heeb MJ, Paganini-Hill A, Griffin JH, et al. Low protein Z levels and risk of ischemic stroke: differences by diabetic status and gender. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 29: 139–144.
70. Quack Loetscher KC, Stiller R, Roos M, et al. Protein Z in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 2005; 93:706–709.
71. Paidas MJ, Ku DH, Lee MJ, et al. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 497–501.
72. Bretelle F, Arnoux D, Shojai R, et al. Protein Z in patients with pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1698–1702.
73. Sofi F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R, Fedi S, Broze GJ Jr. Protein Z dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease. *J Thromb Haemost*. 2009 May;7(5):731-5.
74. Yin, Z.F., Huang, Z.F., Cui, J., Fiehler, R., Lasky, N., Ginsburg, D. & Broze, Jr, G.J. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:6734–6738.
75. Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ Jr. Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. *Blood*. 2008;111(10):4973-4978.
76. Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ Jr, Vollmar B. Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction. *Crit Care Med*. 2013 Dec;41(12):447-56.
77. Kobelt K, Biasiutti FD, Mattle HP, et al. Protein Z in ischaemic stroke. *Br J Haematol* 2001; 114: 169–173.

78. Sofi F, Cesari F, Marcucci R, et al. Protein Z levels and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1098–1102.
79. Ayoub, N., Esposito, G., Barete, S., Soria, C., Piette, J.C. & Frances, C. Protein Z deficiency in antiphospholipid-negative Sneddon's syndrome. *Stroke* 2004; 35: 1329–1332.
80. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, et al. Protein Z in young survivors of ischemic stroke. *Thromb Haemost* 2002; 88: 536.
81. Morange PE, Juhan-Vague I; PRIME Study Group. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of coronary heart disease: the PRIME Study. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2050–2051.
82. Obach V, Muñoz X, Sala N, et al. Intronic c.573 + 79G>A polymorphism of protein Z gene in haemorrhagic and ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 2006; 95: 1040–1041.
83. Cesari F, Fatini C, Sticchi E, et al. Protein Z gene polymorphisms (intron F 79 G>A; –13 A>G) are not associated with acute coronary syndromes. *Thromb Haemost* 2006; 96: 98–99.
84. Kemkes-Matthes, B., Nees, M., Kuhnel, G., Matzdorff, A. & Matthes, K.J. Protein Z influences the prothrombotic phenotype in factor V Leiden patients. *Thrombosis Research*, 2002; 106: 183–185.
85. Ichinose, A., Souri, M., Okumura, T., Fijimaki, K., Yamazaki, T., Taniwaki, M. & Kemkes-Matthes, B. Characterization of the gene for human protein Z. *Annals of Hematology*, 2000; 79(I), A14.
86. Kemkes-Matthes B, Matthes KJ, Souri M, et al. R255h amino acid substitution of protein Z identified in patients with factor V Leiden mutation. *Br J Haematol* 2005; 128: 248–252.
87. Water, N, Tan, T, Ashton, F, O'Grady, A, Day, T, Browett, P, Ockelford, P & Harper, P. Mutations within the protein Z dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br J Haematol*. 2004; 127: 190–194.

88. Corral, J., Gonzalez-Conejero, R., Soria, J.M., Gonzalez-Porrás, J.R., Perez-Ceballos, E., Lecumberri, R., Roldan, V., Souto, J.C., Minano, A., Hernandez-Espinosa, D., Alberca, I., Fontcuberta, J. & Vicente, V. A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood*. 2006; 108: 177–183.
89. Gonzalez-Conejero, R., Perez-Ceballos, E., Vicente, V. & Corral, J. Protein Z-dependent protease inhibitor W303X mutation in venous thrombosis. *Br J Haematol*. 2005; 129: 561–562.
90. Razzari, C., Martinelli, I., Bucciarelli, P., Viscardi, Y. & Biguzzi, E. Polymorphisms of the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) gene and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 2006; 95: 909–910.
91. Gris, J.C., Quere, I., Dechaud, H., Mercier, E., Pincon, C., Hoffet, M., Vasse, M. & Mares, P. High frequency of protein Z deficiency in patients with unexplained early fetal loss. *Blood*. 2002; 99: 2606–2608.
92. Bretelle, F., Arnoux, D., Shojai, R., D'Ercole, C., Sampol, J., Dignat, F. & Camoin-Jau, L. Protein Z in patients with pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 1698–1702.
93. Paidas, M.J., Ku, D.H., Lee, M.J., Manish, S., Thurston, A., Lockwood, C.J. & Arkel, Y.S. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 497–501.
94. Erez O, Hoppensteadt D, Romero R, Espinoza J, Goncalves L, Nien JK, Kusanovic JP, Fareed J, Gotsch F, Pineles B, Chaiworapongsa T. Preeclampsia is associated with low concentrations of protein Z. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007 Sep;20(9):661-7.
95. Grandone, E., Colaizzo, D., Cappucci, F., Cocomazzi, N. & Margaglione, M. Protein Z levels and unexplained fetal losses. *Fertility and Sterility*. 2004; 82: 982–983.
96. Gris, J.C., Amadio, C., Mercier, E., Lavigne-Lissalde, G., Dechaud, H., Hoffet, M., Quere, I., Amiral, J., Dauzat, M. & Mares, P. Anti-protein Z antibodies in

- women with pathologic pregnancies. *Blood*. 2003; 101: 4850–4852.
97. Dörner T, Hoppe B, Salama A, Pruss A, Kiesewetter H. Antibodies against protein Z and fetal loss: current perspectives. *Clin Exp Med*. 2005 Jul;5(2):50-4.
 98. Pardos-Gea J, Ordi-Ros J, Serrano S, Balada E, Nicolau I, Vilardell M. Protein Z levels and anti-protein Z antibodies in patients with arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 2008;121(6):727-34.
 99. Cifkova R, Erdine S, Fagard R, Farsang C, Heagerty AM, Kiowski W, Kjeldsen S, Lüscher T, Mallion JM, Mancia G, Poulter N, Rahn KH, Rodicio JL, Ruilope LM, van Zwieten P, Waeber B, Williams B, Zanchetti A. Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. ESH/ESC Hypertension Guidelines Committee. *J Hypertens*. 2003 Oct;21(10):1779-86.
 100. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
 101. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation*. 2002 Dec 17;106(25):3143-421
 102. PW. Wilson, D'Agostino, R.B., Levy, D., Belanger, A.M., Silbershatz, H., Kannel, WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1997 (18): 1837–1847.
 103. Khan TH, Farooqui FA, Niazi K. Critical review of the ankle Brachial Index. *Current Cardiology Reviews* 2008, 4: 101-106.
 104. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol* 2012 May; 87 (Suppl 1): S63-S67.
 105. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Broze Jr G, Fedi S. A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb Haemost* 2010 April; 103(4):749-756.

106. Sofi F, Cesari F, Vigiani S, et al. Protein Z levels in different phases of activity of coronary atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:2254–2258.
107. Koren-Michowitz M, Eting E, Rahimi-Levene N, et al. Protein Z levels and central retinal vein or artery occlusion. *Eur J Haematol* 2005; 75: 401–405.
108. Sofi F, Cesari F, Pratesi G, et al. Low protein Z levels in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Haemost.* 2007; 89:1114–1117.
109. Grandone E, Favuzzi G, De Stefano V, et al. Protein Z g-42a variant and the risk of pregnancy related venous thromboembolism in a cohort of Italian patients. *Thromb Res.* 2009; 123:848–850.
110. Le Cam-Duchez V, Barbay V, Bal dit Sollier C, Drouet L, Coudert M, Soria C, Borg JY. Haplotypic or genotypic combinations of three protein Z polymorphisms influence protein Z plasma level. *Thromb Haemost* 2009; 101:212-214.
111. Le Cam-Duchez V, Soria C, Dit Sollier CB, Borg JY, Coudert M, Montalescot G, Esposito G, Drouet L, Collet P. Rare genotypes of protein Z gene area a risk factor for premature myocardial infarction but not protein Z plasma level. *Thromb Haemost* 2009 Jul; 102(1):131-6.
112. Le Cam-Duchez V, Bagan-Triquet A, Barbay V, Mihout b, Borg JY. The G79A polymorphism of protein Z gene is an independent risk factor for cerebral venous thrombosis. *J Neurol* 2008 Oct;255 (10):1521-5.
113. Nowak-Gottl U, Frohlich B, thedieck S, huge A, Stoll M. Association of the protein Z ATG haplotype with symptomatic nonvascular stroke or thromboembolism in white children: a family-based cohort study. *Blood* 2009 Mar 5; 113 (10):2336-41.
114. Mahdi N, Abu-Hijleh TM, Abu-Hijleh FM, Sater MS, Al-Ola K, Almawi WY. Protein Z polymorphisms associated with vaso-occlusive crisis in young sickle cell disease patients. *Ann Hematol* 2012 Aug; 91(8):1215-20.
115. Choi Q, Hong KH, Kim JE, Kim HK. Changes in plasma levels of natural anticoagulants in disseminated intravascular coagulation: high prognostic value of antithrombin and protein C in patients with underlying sepsis or severe infection. *Ann Lab Med.* 2014 Mar;34(2):85-91.

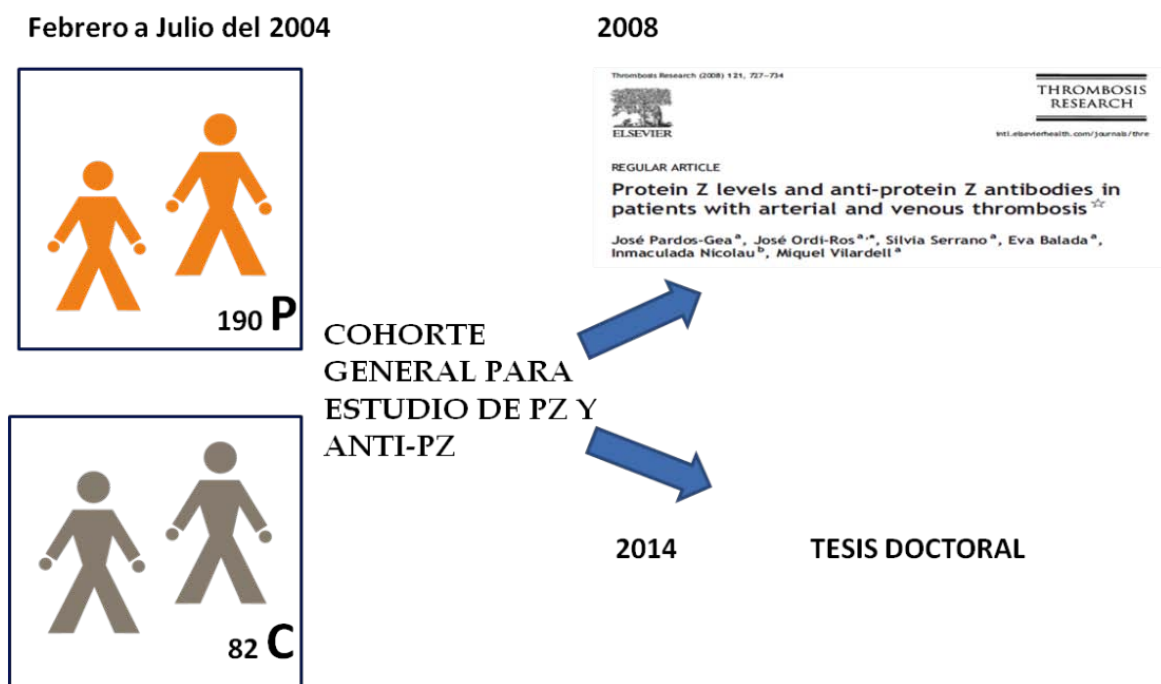
116. Greten J, Kreis I, Liliensiek B, Allenberg J, Amiral J, Ziegler R et al. Localisation of protein Z in vascular lesions of patients with atherosclerosis *Vasa* 1998; 27(3): 144-8.
117. Newmann AB, Shemanski L, Manolio TA et al. Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 1999; 19:538-45.
118. Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE et al. Association of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* 1997; 131:115-25.
119. Spronk HMH, Van der Voort D, ten Cate H. Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. *Thromb J* 2004 Dic 1; 2(1):12.
120. Boekholdt SM, Kramer MH. Arterial thrombosis and the role of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Sep;33(6):588-96.
121. Cannegieter SC, Van Hylckama Vlieg A. Venous thrombosis: understanding the paradoxes of recurrence. *J Thromb Haemost* 2013; 11 (Suppl. 1): 161-9.
122. Hackeng TM, Vant Veer C, Meijers JC, Bouma BN. Human protein S inhibits prothrombinase complex activity on endothelial cells and platelets via direct interactions with factors Va and Xa. *J Biol Chem* 1994; 269:21051.
123. Merati G, Biguzzi F, Oganessian N, et al. A 23 bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene in patients with myocardial infarction and deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 507.
124. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Woodhams B, Mira Y, Villa P, Migaud-Fressart M, Ferrando F, Aznar J, Bertina RM, España F. Contribution of polymorphisms in endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost.* 2004 May; 91(5):905-11.
125. Dennis J, Johnson CY, Adediran AS, de Andrade M, Heit JA, Morange PE, Trégouët DA, Gagnon F. The endothelial protein C receptor (PROCR) Ser219Gly variant

- and risk of common thrombotic disorders: a HuGE review and meta-analysis of evidence from observational studies. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2392-400.
126. Anastasiou G, Politou M, Rallidis L, Grouzi E, Karakitsos P, Merkouri E, Travlou A, Gialeraki A. Endothelial Protein C Receptor Gene Variants and Risk of Thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2014 Aug: 13.
127. Van der Velden PA, Krommenhoek-Van Es T, Allaart CF, Bertina RM, Reistma PH. A frequent thrombomodulin amino acid diamorphism is not associated with thrombophilia. *Thromb Haemost* 1991; 65:511.
128. Heit JA, Petterson TM, Owen WG, Burke JP, DE Andrade M, Melton LJ 3rd. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study *J Thromb Haemost*. 2005 Apr;3(4):710-7.
129. Anastasiou G, Gialeraki A, Merkouri E, Politou M, Travlou A. Thrombomodulin as a regulator of the anticoagulant pathway: implication in the development of thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012 Jan;23(1):1-10.
130. Sailer T, Vormittag R, Koder S, Quehenberger P, Kaider A, Pabinger I. Clinical significance of anti-protein Z antibodies in patients with lupus anticoagulant. *Thromb Res*. 2008;122(2):153-60.
131. Forastiero RR, Martinuzzo ME, Lu L, Broze GJ. Autoimmune antiphospholipid antibodies impair the inhibition of activated factor X by protein Z/protein Z-dependent protease inhibitor. *J Thromb Haemost*. 2003 Aug;1(8):1764-70.
132. Steffano B, Forastiero R, Martinuzzo M, Kordich L. Low plasma protein Z levels in patients with antiphospholipid antibodies.. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001 Jul;12(5):411-2.
133. Ayoub N, Esposito G, Barete S, Soria C, Piette JC, Francès C. Protein Z deficiency in antiphospholipid-negative Sneddon's syndrome. *Stroke*. 2004 Jun;35(6):1329-32.
134. Oztürk MA, Ozbalkan Z, Onat AM, Ertenli I, Kiraz S, Aytemir K, Ureten K, Abali G, Calgüneri M, Kirazli S, Haznedaroglu IC. Decreased protein Z concentrations complicating the hypercoagulable state of Behçet's disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2003 Jul;9(3):259-63.

135. Ghinoi A, Boiardi L, Atzeni F, Casali B, Farnetti E, Nicoli D, Pipitone N, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, La Corte R, Triolo G, Filippini D, Paolazzi G, Salvarani C.. Protein Z G79A and A-13G gene polymorphisms in Italian patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2009 Mar-Apr;27(2 Suppl 53):S23-8
136. Demir HD, Yalçındağ FN, Oztürk A, Akar N Intron F G79A polymorphism of the protein Z gene in Turkish Behçet patients. *Curr Eye Res*. 2012 Jul; 37(7):630-2.
137. Erez O, Romero R, Vaisbuch E, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Than NG, Gotsch F, Kim CJ, Mittal P, Edwin S, Pacora P, Kim SK, Yeo L, Mazor M, Hassan SS. Maternal anti-protein Z antibodies in pregnancies complicated by pre-eclampsia, SGA and fetal death. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009 Aug;22(8):662-71.
138. Sater MS, Finan RR, Al-Hammad SA, Mohammed FA, Issa AA, Almawi WY. High Frequency of anti-protein Z IgM and IgG autoantibodies in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2011 May;65(5):526-31.

ANEXO 1.

Trabajos derivados de la cohorte de estudio general para PZ y Anti-PZ.

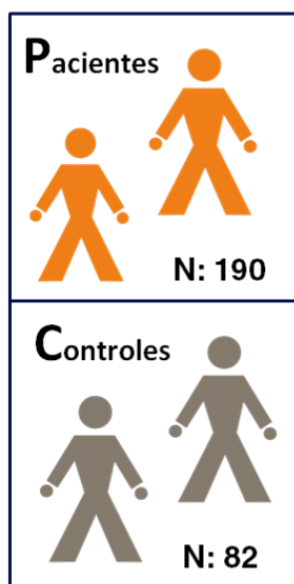


ANEXO 2.

Esquema de selección de pacientes para la tesis.

Febrero a Julio del 2004

COHORTE GENERAL



▪ Incluyeron pacientes con TROMBOSIS VASCULAR DE DEBUT arterial o venosa documentada o 1er episodio

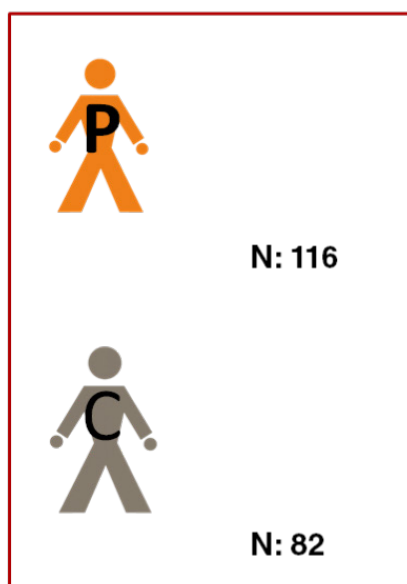


▪ Excluyeron AIT, ángor o trombosis no objetivable.

▪ Excluyeron patología obstétrica-gestacional

▪ Excluyeron anticonceptivos orales, hepatopatía crónica, IRrenalCronica

TESIS



ANEXO 3.

Esquema de diseño del estudio de tesis.

