

Trombofilia y Trombosis Arterial

Dr. Jaime Pereira G.

*Departamento de Hematología - Oncología
Escuela de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile*

Recibido el 21 de marzo de 2007, aceptado el 31 de marzo de 2007

Rev Chil Cardiol 2007; 26: 97-103

El término trombofilia define condiciones hereditarias o adquiridas del sistema de la hemostasia que predisponen a la trombosis¹. Ambas condiciones (hereditarias y adquiridas) pueden coexistir en un mismo paciente. Causas establecidas de trombofilia incluyen deficiencias de antitrombina III, proteína C y proteína S; mutación G20210A del gen de la protrombina (factor II) y la resistencia a la proteína C activada, principalmente causada por la mutación Leiden del factor V, anticuerpos antifosfolípidos e hiperhomocisteinemia. Estos defectos han sido mejor caracterizados en el contexto de la trombosis venosa y su contribución al desarrollo de trombosis arterial es aún motivo de investigación. En este sentido, variaciones genéticas de otros factores hemostáticos, tales como fibrinógeno, factor VII, factor XIII, componentes del sistema fibrinolítico y polimorfismo de glicoproteínas plaquetarias, han sido investigados como factores de riesgo de trombosis arterial².

La patogenia de la trombosis arterial es compleja y comprende la interacción de múltiples factores genéticos y adquiridos, los que en conjunto determinan el fenotipo. Clásicamente la trombosis arterial es el resultado final del daño vascular aterosclerótico en el sitio de ruptura de la placa rica en lípidos, que puede resultar en infarto agudo del miocardio, accidente cerebrovascular isquémico o en oclusión arterial periférica. Los trombos arteriales están formados principalmente por plaquetas y se localizan en zonas de alto flujo. Los trombos venosos están constituidos fundamentalmente por fibrina y glóbulos rojos y se forman en áreas de éstasis sanguíneo.

La participación de alteraciones del sistema hemostático como factor de riesgo de trombosis venosa está bien establecida y existe evidencia fisiopatológica que une las alteraciones asociadas a hiperactividad del sistema hemostático con tromboembolismo venoso. El sistema de la coagulación también ha sido señalado como participante en la producción de eventos trombóticos arteriales. Sin embargo, en trombosis arterial la evidencia no ha demostrado un papel dominante de los estados trombofílicos en su patogenia. En esta revisión se discutirá el papel de los marcadores hemostáticos más relevantes asociados a trombosis arterial y las indicaciones para su estudio.

Factor V Leiden y otras trombofilias hereditarias

La identificación del Factor V Leiden y de la mutación G20210A del gen de la protrombina (PTG20210A) como factores de riesgo importantes para trombosis venosa, motivó su estudio y el de otras variantes genéticas protrombóticas como factores en la predisposición a trombosis arterial. El papel de estas mutaciones en enfermedad arterial trombótica ha sido abordado en numerosos estudios, la mayoría de los cuales han resultado negativos. Los principales estudios que han encontrado una asociación entre estos defectos con enfermedad coronaria, infarto de miocardio (IM) o accidente cerebrovascular isquémico (ACVI), han sido realizados en poblaciones altamente seleccionadas³, en niños⁴ o han considerado relaciones con factores medioambientales.

Correspondencia a: Dr. Jaime Pereira
Banco de Sangre, Hospital Clínico U. de Católica
Marcoleta 345
Teléfono: 56-2 354 3385 - Fax: 56-2 354 3772
Correo electrónico: jpereira@med.puc.cl

Rosendaal y colaboradores reportaron un aumento del riesgo de presentar IM no fatal en mujeres jóvenes portadoras de factor V Leiden⁵, con un aumento significativo del riesgo entre fumadoras. Además, portadores de la mutación PTG20210A tenían un aumento de 4 veces el riesgo de IM, el que se incrementa a > 40 en fumadores⁶. Estas interacciones se confirmaron en dos estudios de caso-control de hombres que presentaron aumento del riesgo de IM asociado a la presencia de FV Leiden o PTG20210A^{7,8}. Un estudio Italiano reciente que incluyó más de 1200 sobrevivientes jóvenes de IM, no encontró evidencia de que el FV Leiden o PTG20210A constituyan factores de riesgo de trombosis arterial⁹. En un meta-análisis que incluyó más de 17.000 pacientes con enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular o eventos arteriales periféricos, se demostró que el factor V Leiden, PTG20210A y mutación C677T de la enzima metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) aumentaban levemente el riesgo de IM y accidente cerebrovascular isquémico, particularmente en mujeres menores de 55 años¹⁰. Otro meta-análisis reciente sobre 66.000 casos de enfermedad coronaria, que analizó 7 polimorfismos de elementos del sistema hemostático, demostró que el factor V Leiden y la PTG20210A aumentaban moderadamente (RR: 1.17 y 1.31, respectivamente) el riesgo de enfermedad coronaria¹¹.

Con respecto a los otros defectos de anticoagulantes naturales que presentan una clara asociación con trombosis venosa tales como las deficiencias hereditarias de antitrombina, proteína C y proteína S, su relación con trombosis arterial es menos clara^{12, 13}. La mayoría de los estudios se han centrado en pacientes portadores de ACVI, un análisis de 8 estudios pequeños mostró deficiencia de proteína S, proteína C y antitrombina en 11.9%, 2.2% y 2.2%, respectivamente¹⁴. Estudios más recientes de pacientes jóvenes no seleccionados con isquemia cerebral aguda mostraron que deficiencias transitorias agudas de anticoagulantes naturales son relativamente comunes, sin embargo deficiencias hereditarias verdaderas son raras^{3,15,16}. El estudio EPCOT (European Prospective Cohort on Trombosis) determinó la incidencia de eventos arteriales (IM y ACVI) en una población de 622 pacientes portadores de trombofilia hereditaria¹⁷. El riesgo de desarrollar IM o ACVI asociado a trombofilia aumentó 12 veces en los hombres y 7 veces en las mujeres. El riesgo relativo fue de 8.8 para los hombres y 4.5 para

las mujeres. La edad de presentación del primer evento arterial fue de 58 años en los controles y de 48 años en los sujetos trombofílicos.

En resumen, la evidencia disponible hasta este momento parece sugerir que la deficiencia de anticoagulantes naturales está probablemente asociada a eventos tromboticos arteriales, especialmente en sujetos jóvenes con isquemia cerebral aguda. Sin embargo, esta asociación es claramente más débil que aquella encontrada entre estos defectos y la trombosis venosa.

Hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido producto intermediario del metabolismo de la metionina. Varios estudios epidemiológicos han demostrado que el aumento de los niveles de homocisteína es un factor de riesgo independiente para aterosclerosis y trombosis arterial^{18,19}. La hiperhomocisteinemia leve (>15 mol/L) no es rara en la población general y está asociada a una variedad de factores genéticos o adquiridos que incluyen la edad, tabaquismo, insuficiencia renal, déficit de folato, vitamina B6 o B12 y deficiencias heterocigotas de enzimas que participan en su metabolismo. Los efectos adversos de la homocisteína comprenden disfunción endotelial, proliferación de células musculares lisas, oxidación de LDL e inducción de un fenotipo protrombótico en la célula endotelial^{20,21}.

La hiperhomocisteinemia leve se asocia a una variante termolábil de la MTHFR debido a una transición C a T en el nucleótido 677. La homocigocidad para la variante C677T de la MTHFR, que está presente en un 5% a 25% de la población caucásica, es la causa genética más común de hiperhomocisteinemia, aunque su presencia no ha sido claramente asociada a enfermedad aterotrombótica. Estudios observacionales han mostrado consistentemente que los niveles elevados de homocisteína están asociados a un mayor riesgo de presentar enfermedad coronaria²². Sin embargo, esta asociación puede estar influida por nivel socioeconómico, tabaquismo o enfermedad aterosclerótica existente, que en si misma puede aumentar los niveles de homocisteína^{23, 24}. Esta última afirmación se basa en que en estudios de cohorte la asociación es más débil que en aquellos caso-control, los cuales están más proclives a estar sesgados por enfermedad preexistente²⁵.

Una asociación entre la variante genética C677T de la MTHFR y enfermedad coronaria ha sido reportada

en dos meta-análisis^{26, 27}, aunque se ha sugerido que en estos estudios existe un sesgo de publicación (no publicación de estudios negativos). Un estudio reciente grande, prospectivo y de caso-control (Copenhagen City Heart Study) no encontró asociación entre enfermedad cardíaca isquémica, ACVI y homocigocidad para la variante C677T de la MTHFR²⁸. Finalmente, un meta-análisis reciente sobre un gran número de estudios (80), que incluyó 26.000 casos y 31.000 controles, estimó en alrededor de un 14% (95% IC 5% a 24%) mayor el riesgo de enfermedad coronaria asociado con el genotipo CC²⁹. Sin embargo, debido a la gran heterogeneidad entre estudios, la inferencia causal de la asociación es muy limitada. De hecho, cuando se estratifica por región geográfica, los estudios de Europa, Estados Unidos y Australia no entregan evidencia para sostener una asociación entre hiperhomocisteinemia y enfermedad cardíaca isquémica.

Estos resultados han sido en parte confirmados por un meta-análisis reciente que evaluó los estudios sobre el efecto de la suplementación ácido fólico y enfermedad cardiovascular³⁰. Este análisis que incluyó 12 trabajos con más de 16.000 sujetos, demostró que la suplementación con ácido fólico no reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Síndrome antifosfolípido

El síndrome antifosfolípido (SAF) y el lupus eritematoso sistémico (LES) son enfermedades autoinmunes fuertemente asociadas a enfermedad vascular aterosclerótica y trombosis arterial. El síndrome antifosfolípido se define de acuerdo a los criterios revisados 2006³¹ por la presencia de al menos uno de 2 criterios clínicos (trombosis vascular o complicaciones de embarazo) combinado con al menos uno de 2 criterios de laboratorio (anticardiolipinas IgG/IgM, anti (β_2 -glicoproteína I o anticoagulante lúpico). La prevalencia de anticuerpos antifosfolípidos (AcAFL) en la población general sana es de entre 1 y 5%, tasa que aumenta con la edad y enfermedades crónicas, alcanzando un 30% en los pacientes con LES. Varios estudios prospectivos han mostrado una relación entre la presencia de AcAFL y aparición de IM o ACVI³². Dos estudios recientes demostraron un aumento de 2 a 3 veces en la prevalencia de placas en la arteria carótida o calcificaciones en las arterias coronarias en pacientes con LES comparados con los controles, independiente de factores de riesgo cardiovascular

clásicos^{33, 34}. Las manifestaciones trombóticas en LES y SAF están fundamentalmente dadas por episodios de trombosis venosa, aunque también puede comprometer la microcirculación o las arterias del cerebro, corazón o tracto gastrointestinal³².

Los AcAFL están dirigidos contra proteínas que se unen a fosfolípidos tales como la (β_2 -glicoproteína I, protrombina y más raramente proteína C o S. En la patogenia de la aterotrombosis asociada a la existencia de AcAFL aparte de las propiedades protrombóticas propias de estos anticuerpos, se ha propuesto una disminución de la actividad de la paraoxonasa (PON1), enzima cuya función es prevenir la oxidación de LDL. Esta relación se ha sugerido a partir de observaciones que muestran que la existencia de anticuerpos anti- (β_2 -glicoproteína I se asocia a una actividad reducida de PON1³⁵.

Recomendaciones para el estudio de trombofilia

¿A quién investigar?

La evidencia que permite sostener una asociación entre trombofilia y enfermedad cardiovascular es relativamente débil. Por otra parte, una investigación de laboratorio está indicada siempre que los resultados tengan alguna influencia sobre el tratamiento o prevención de una condición clínica. Específicamente en el campo de la trombofilia, es muy poco probable que los resultados de la investigación de laboratorio afecten el manejo del episodio agudo de trombosis, el cual en general es independiente de su causa. En este sentido, los resultados de las pruebas de laboratorio pueden ser de utilidad en la decisión de duración e intensidad de tratamiento y eventualmente para profilaxis en familiares de los casos índices.

En el caso de la trombosis arterial se ha sugerido que la investigación de defectos trombofílicos estaría justificada en las siguientes situaciones: 1) eventos tromboembólicos recurrentes; 2) eventos precoces (< 55 años en hombres y < 55 años en mujeres); 3) ausencia de estenosis significativa en la angiografía; 4) <55 años en hombres y < 60 años en las mujeres, si no se encuentra una causa evidente (por ejemplo, ausencia de factores de riesgo clásicos, enfermedad sistémica, cáncer, drogas); o 5) <55 años en hombres y < 60 años en las mujeres y una importante historia familiar. Antes de solicitar un estudio de laboratorio para descartar una trombofilia, es necesario obtener una buena historia familiar, elemento simple y que ha sido

reconocido como clave en la evaluación de enfermedades complejas comunes³⁶.

¿Cuándo investigar?

Los episodios trombóticos agudos con o sin tratamiento concomitante pueden influenciar las pruebas de laboratorio (excepto las pruebas moleculares) o hacen difícil su interpretación. Es frecuente que en etapas precoces de la trombosis se use heparina que provoca una disminución de la antitrombina III, así como los anticoagulantes orales disminuyen los valores de proteínas dependientes de vitamina K (proteína C y S). Por estas razones se recomienda que la investigación de laboratorio de trombofilia se difiera hasta 6 meses después del episodio agudo o al menos 2 semanas después de finalizado un tratamiento anticoagulante oral.

¿Qué pruebas se deben realizar?

Inicialmente el estudio de trombofilia comprendía exclusivamente determinaciones plasmáticas

(fenotipo). Actualmente se han incorporado las pruebas que utilizan ADN (genotipo) las que se pueden usar en forma aislada o en combinación con el fenotipo. Ambos tipos de pruebas tienen ventajas y desventajas. El fenotipo es más fácil de realizar, requiere menos infraestructura de laboratorio pero son más difíciles de estandarizar y los resultados pueden ser muy variables. Por otra parte las pruebas de genotipo entregan resultados inequívocos, pero hay que tener en cuenta que existen discrepancias entre laboratorios y métodos. Otra desventaja de las pruebas de ADN es que para ciertas deficiencias (ATIII, proteína C y S), el defecto genético subyacente comprende un número muy grande de diferentes mutaciones o alteraciones del gen que no hacen factible su estudio rutinario. Además para algunas condiciones como la hiperhomocisteinemia, la asociación de trombosis con el fenotipo es mucho más fuerte que con el genotipo. La serie de marcadores que comprende el estudio de laboratorio de la trombofilia se muestran en la tabla 1 y a continuación se discute las razones para su elección.

Tabla 1. Marcadores y tipos de ensayos recomendados para la investigación de laboratorio de pacientes con trombofilia

Marcador	Tipo de ensayo
Antitrombina	Actividad cofactor heparina contra factor Xa
Proteína C	Ensayo amidolítico usando veneno de serpiente como activador
Proteína S	Determinación del antígeno libre
Resistencia a la PCA	Método basado en TTPA con y sin predilución del plasma con plasma deficiente en factor V Confirmación de los resultados con genotipo del factor V (Leiden)
Hiperprotrombinemia	Genotipo mediante biología molecular
Anticuerpos antifosfolípidos	Pruebas dependientes de fosfolípidos (TTPA, dRVVT, KCT) y anticuerpos anticardiopina
Hiperhomocisteinemia	HPLC, Enzimoimmunoensayos

Antitrombina

La medición del antígeno no es recomendada ya que no detectaría todos aquellos casos de disfunción de la molécula que presentan una concentración normal de antígeno. El ensayo funcional más frecuentemente utilizado se basa en la actividad cofactor heparina de la antitrombina. La prueba determina la capacidad de la antitrombina presente en el plasma de neutralizar el factor Xa; el exceso de factor Xa se mide con un sustrato

cromogénico. El factor Xa se ha demostrado más útil para discriminar portadores de no portadores de la deficiencia y no está afectado por la presencia en el plasma de otros inhibidores de trombina (por ejemplo, cofactor II de heparina).

Proteína C

Al igual que para la antitrombina, no se debe usar la medida del antígeno como prueba de pesquisa,

excepto después de haber identificado la deficiencia con estudios funcionales. La prueba más comúnmente utilizada y más fácil de interpretar y estandarizar, está basada en la actividad amidolítica del plasma del paciente después de activar la proteína C con veneno de serpiente. Aunque esta técnica puede no detectar defectos funcionales leves de la proteína, éstos son extraordinariamente poco frecuentes.

Proteína S

En este caso también se debería usar una prueba funcional para determinar la actividad de la proteína. Sin embargo, es necesario considerar que los ensayos funcionales actualmente disponibles están basados en la actividad cofactor de la proteína C activada, por lo que no son muy específicos. Hasta no disponer de ensayos funcionales específicos, se recomienda la medición del antígeno como prueba de pesquisa de trombofilia. La PS en el plasma se distribuye 60% unida a la proteína de unión de C4b (C4bBP) y 40% libre, que es la que ejerce la función de cofactor de la proteína C. Para la medición de la proteína S libre se debe precipitar primero la que está unida a C4bBP o utilizar ensayos de ELISA con anticuerpos que reconocen sólo la forma libre de la proteína. Se ha discutido la necesidad de medir las dos formas, PS total y PS libre. Un estudio de familias deficientes de proteína S confirmadas por biología molecular demostró que la PS libre discriminaba mucho mejor entre portadores y no portadores de la deficiencia³⁷. Aunque la generalización de estos resultados a otros grupos no es posible, la recomendación actual es determinar PS libre.

Resistencia a la proteína C activada (PCA)

La resistencia a la PCA puede ser determinada en el plasma por pruebas que utilizan el TTPA con o sin la adición de PCA, como fue originalmente descrita por Dahlback³⁸. Este método es simple, rápido y barato de realizar. Además es sensible a la resistencia a la PCA en ausencia de FV Leiden. Es necesario señalar que alrededor del 90% de los casos de resistencia a la PCA son causadas por FV Leiden. Existe otra forma de realizar la prueba utilizando una predilución con plasma deficiente en factor V. Esta modificación es altamente sensible y específica para el factor V Leiden. Una vez identificada la resistencia a la PCA por las pruebas de coagulación, se sugiere confirmar la existencia de la mutación Leiden del FV mediante biología molecular.

Hiperprotrombinemia

La hiperprotrombinemia se ha asociado a una mutación descrita en el gen que codifica para la protrombina (factor II), en la cual existe una transición G→A en la región 3' no traducida del gen. La consecuencia de esta mutación es un aumento de alrededor de 30% en el nivel de factor II en los heterocigotos. Sin embargo, la medición del nivel de protrombina no distingue los portadores de los sujetos sanos, por lo que la única forma de demostrar el defecto es mediante biología molecular.

Hiperhomocisteinemia

Clásicamente la homocisteína se ha medido mediante HPLC con detección electroquímica o fluorimétrica. Recientemente se dispone de pruebas comerciales que utilizan enzima inmunoensayos y ensayos fluorescentes, que son comparables a la HPLC y son fáciles de realizar en laboratorios de química clínica. Actualmente la gran mayoría de los laboratorios realiza la determinación de la homocisteína basal, desestimándose la prueba de sobrecarga con metionina, cuyo aporte es marginal.

Anticuerpos antifosfolípidos

El diagnóstico de laboratorio del síndrome antifosfolípidos está dificultado por la carencia de pruebas específicas y la heterogeneidad de los anticuerpos. Además, los problemas que existen con las diferentes pruebas de laboratorio se acentúan por la falta de estandarización. Para abordar este problema, el Comité Científico y de Estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) ha provisto criterios de consenso para ser utilizados en el diagnóstico de laboratorio del SAF³⁹. De acuerdo con estas guías, el estudio de pesquisa de AcAFL en pacientes trombofílicos debe incluir pruebas para detectar anticoagulante lúpico (ACL) y pruebas de ELISA para anticuerpos anticardiolipinas³⁹. La presencia de ACL se basa en a) prolongación de uno a más tiempos dependientes de fosfolípidos (TTPA, TP etc); b) la prolongación no se corrige al mezclar con plasma normal y c) la prolongación se corrige con un exceso de fosfolípidos. En relación a las pruebas de ELISA, actualmente se acepta dentro de los criterios diagnósticos la positividad para anticuerpos anticardiolipina y/o anti (β₂glicoproteína I. De acuerdo a las consideraciones anteriores, el estudio de laboratorio de los pacientes

trombofílicos debería incluir una prueba de coagulación y una prueba de ELISA. En caso de positividad se sugiere repetir después de 12 semanas para descartar el fenómeno de anticuerpos transitorios.

Conclusión

En un esfuerzo por caracterizar las bases genéticas de la trombosis arterial se han identificado

numerosos polimorfismos de factores hemostáticos, sin embargo su relación con enfermedad es controvertida. A diferencia de la trombosis venosa, donde el papel de los marcadores de trombofilia está claramente establecido, en trombosis arterial esta relación es bastante menos evidente. En este sentido, el estudio de trombofilia debería reservarse sólo para aquellos pacientes seleccionados en los cuales el hallazgo de uno de estos marcadores afecte su manejo o ayude a explicar la aparición de un evento trombótico.

Referencias

1. LANE DA, MANNUCCI PM, BAUER KA, BERTINA RM, BOCHKOV NP, BOULYJENKOV V, et al. Inherited thrombophilias Part 1. *Thromb Haemost* 1996; 76: 651-662.
2. REINER AP, SISCOVICK DS, ROSENDAAL FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost* 2001; 85: 584-595.
3. MARGAGLIONE M, D'ANDREA G, GIULIANI N, BRANCACCIO V, DE LUCIA D, GRANDONE E, et al. Inherited prothrombotic conditions and premature ischemic stroke: sex difference in the association with factor V Leiden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1751-1756.
4. NOWAK-GOTTL U, STRATER R, HEINECKE A, JUNKER R, KOCH HG, et al. Lipoprotein(a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood* 1999; 94: 3678-3682.
5. ROSENDAAL FR, SISCOVICK DS, SCHWARTZ SM, BEVERLY RK, PSATY BM, LONGSTRETH WT, et al. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 89: 2817-2821.
6. ROSENDAAL FR, SISCOVICK DS, SCHWARTZ S, PSATY BM, PSATY BM, VOS HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997; 90: 1747-1750.
7. DOGGEN CJ, CATS VM, BERTINA RM, ROSENDAAL FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin G20210A. *Circulation* 1998; 97: 1037-1041.
8. INBALA, FREIMARK D, MODAN B, CHETRIT A, MATETZKY S, ROSENBERG N, et al. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood* 1999; 93: 2186-2190.
9. Atherosclerosis T, Vascular Biology Italian Study Group. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003; 107: 1117-22.
10. KIM RJ, BECKER RC. Association between factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations and events of the arterial circulatory system: a meta-analysis of published studies. *Am Heart J* 2003; 146: 948-957.
11. YE Z, LIU EHC, HIGGINS JPT, KEAVNEY BD, LOWE GDO, COLLINS R, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66155 case and 91307 controls. *Lancet* 2006; 367: 651-658.
12. DE STEFANO V, LEONE G, MASTRANGELO S, TRIPODI A, RODEGHIERO F, CASTAMAN G, et al. Clinical manifestations and management of inherited thrombophilia: retrospective analysis and follow-up after diagnosis of 238 patients with congenital deficiency of antithrombin III, protein C, protein S. *Thromb Haemost* 1994; 72: 352-358.
13. ZOLLER B, GARCÍA DE FRUTOS P, DAHLBÄCK B. A common 4G polymorphism allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1998; 79: 802-807.
14. BARINAGARREMENTERIA F, CANTÚ-BRITO C, DE LA PEÑA A, IZAGUIRRE R. Prothrombotic states in young people with idiopathic stroke. A prospective study. *Stroke* 1994; 25: 287-290.
15. DOUAY X, LUCAS C, CARON C, GOUEMAND J, LEYS D. Antithrombin, protein C, and protein S levels in 127 consecutive young adults with ischemic stroke. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 124-127.
16. MUNTS AG, VAN GENDEREN PJ, DIPPEL DWJ, VAN KOOTEN F, KOUDSTAAL PJ. Coagulation disorders in young adults with acute cerebral ischemia. *J Neurol* 1998; 245: 21-5.
17. VOSSEN CY, ROSENDAAL FR. On behalf of the EPCOT study group. Risk of arterial thrombosis in carriers of familial thrombophilia. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 916-918.
18. MANGONI AA, JACKSON SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002; 112: 556-565.
19. Homocysteine studies collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288: 2015-2022.
20. MOGHADASIAN MH, MCMANUS BM, FROHLICH JJ.

- Homocyst(e)ine and coronary artery disease. Clinical evidence and genetic and metabolic background. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2299-2308.
21. WELCH GN, LOSCALZO J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1042-4045.
 22. FORD ES, SMITH SJ, STROUP DF, STEINBERG KK, MUELLER PW, THACKER SB. Homocysteine and cardiovascular disease: a systematic review of the evidence with special emphasis on case-control studies and nested case-control studies. *Int J Epidemiol* 2000; 72: 315-325.
 23. BRATTSTRÖM L, WILCKEN DEI. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 315-323.
 24. UELAND PM, REFSUM H, BERESFORD SAA, VOLLSET SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 324-332.
 25. CLARKE R. An updated review of the published studies of homocysteine and cardiovascular disease. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 70-71.
 26. WALD DS, LAW M, MORRIS JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202-1206.
 27. KLERK M, VERHOEF P, CLARKE R, BLOM HJ, SCHOUTEN EG. MTHFR 677C \ddagger T polymorphism and risk of coronary heart disease. *JAMA* 2002; 288: 2023-2031.
 28. FREDERIKSEN J, JUUL K, GRANDE P, JENSEN GB, SCHROEDER TV, TYBJAERG- HANSEN A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T) hiperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from Copenhagen City Heart Study. *Blood* 2004; 104: 3046-3051.
 29. LEWIS SJ, EBRAHIM S, SMITH GD. Meta-analysis of MTHFR 677C \ddagger T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005; 331: 1053-1058.
 30. BAZZANO LA, REYNOLDS K, HOLDER KN, HE J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2006; 296: 2720-2726.
 31. MIYAKIS S, LOCKSHIN MD, ATSUMI T, BRANCH DW, BREY RL, CERVERA R, et al. International consensus statement on update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4: 295-306.
 32. LEVINE JS, BRANCH DW, RAUCH J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 752-763.
 33. ROMAN MJ, SHANKER BA, DAVIS A, LOCKSHIN MD, SAMARITANO L, SIMANTOV R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 2399-2406.
 34. ASANUMA Y, OESER A, SHINTANI AK, TURNER E, OLSEN N, FAZIO S, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 2407-2415.
 35. DELGADO-ALVES J, AMES PR, DONOHUE S, STANYER L, NOUROOZ-ZADEH J, RAVIRAJAN C, et al. Antibodies to high density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2686-2694.
 36. YOON PW, SCHEUNER MT, KHOURY MJ. Research priorities for evaluating family history in the prevention of common chronic diseases. *Am J Prev Med* 2003; 24: 128-135.
 37. SIMMONDS RE, IRELAND H, LANE DA, ZOLLER B, GARCÍA DE FRUTOS P, et al. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998; 128: 8-14.
 38. DAHLBÄCK B, CARLSSON M, SVENSSON PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. Prediction of a cofactor for activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1004-1008.
 39. BRANDT JT, TRIPPLET DA, ALVING B, SCHARRER IM. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update (review). *Thromb Haemost* 1995; 74: 1185-1190.