

Polimorfismos en la región Kozak del FXII y su relación con el infarto agudo de miocardio prematuro

P. Ros^a, J. Corral^b, V. Roldán^c, F. Marín^d, V. Vicente^a y R. González-Conejero^b

^aServicio de Oncohematología. Hospital Morales Meseguer. Murcia. España.

^bCentro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Murcia. España.

^cHospital de San Vicente. Alicante. España.

^dHospital General. Alicante. España.

Introducción/objetivos. El factor XII desempeña un papel fundamental tanto en la coagulación como en la fibrinólisis; sin embargo, se desconoce la relevancia patológica de su deficiencia. El polimorfismo C46T, localizado en la región Kozak de este gen, se asocia con menores valores plasmáticos de factor XII al afectar la traducción del ARNm. Nuestro objetivo fue evaluar el papel de este polimorfismo en alteraciones trombóticas y hemorrágicas.

Pacientes y métodos. Realizamos 3 estudios de casos y controles, que incluyeron a 55 pacientes con hemorragia intracranal espontánea, 206 con trombosis venosa profunda, y 281 con infarto agudo de miocardio prematuro (infarto agudo de miocardio < 45). Los controles (n = 550) fueron sujetos sanos de la misma zona geográfica. La determinación del polimorfismo se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis de conformación de cadenas sencillas. El genotipo se confirmó mediante secuenciación.

Resultados. El polimorfismo C46T no modifica significativamente el riesgo de presentar hemorragia intracranal espontánea o trombosis

venosa profunda. Sin embargo, el alelo 46T aparece como factor de riesgo débil para el desarrollo de infarto agudo de miocardio < 45 (*odds ratio* ajustada = 1,64; intervalo de confianza del 95%, 1,14-2,37; *p* = 0,008). Los portadores del alelo 46T mostraron valores de proteína C reactiva superiores (*p* = 0,002) y peor evolución que los controles. Además, encontramos un sinergismo entre la hipercolesterolemia y este polimorfismo. Finalmente, describimos una nueva variante genética en el gen que codifica el factor XII (*C42T*), infrecuente, cercana a la secuencia Kozak y posiblemente ligada a la variante 46C, pero que no parece afectar a los valores circulantes de factor XII.

Conclusiones. El alelo 46T, asociado con menores valores plasmáticos de factor XII, parece predisponer al desarrollo de infarto agudo de miocardio prematuro, especialmente en pacientes hipercolesterolémicos.

Palabras clave:

Factor XII. Polimorfismo (genética). Trombosis. Infarto de miocardio.

Este artículo ha sido agraciado con una Mención Especial en el XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis.

Correspondencia: Dr. R. González-Conejero.

Centro Regional de Hemodonación.

Ronda de Garay, s/n. 30003 Murcia. España.

Correo electrónico: rocio.gonzalez@carm.es

Recibido el 29 de septiembre de 2004 y aceptado el 13 de enero de 2005.

POLYMORPHISMS IN KOZAK REGION OF FXII AND THEIR RELATIONSHIP WITH PREMATURE ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Introduction/Aim. Factor XII (FXII) plays a key role in both coagulation and fibrinolysis. However, the pathological importance of FXII deficiency remains unknown. The C46T polymorphism in the Kozak region of gene coding FXII is related to lower FXII plasma levels by mRNA translation

alterations. Our aim was to assess the role of this polymorphism in thrombotic and hemorrhagic disease.

Patients and methods. We performed 3 case-control studies including 55 patients with spontaneous intracranial hemorrhage (SIH), 206 with deep venous thrombosis (DVT) and 281 with premature myocardial infarction (AMI < 45). Controls (n = 550) were healthy subjects from the same geographic area. Polymorphism identification was performed by PCR and single-stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis. Genotype was confirmed by sequencing.

Results. The C46T polymorphism modifies neither the risk for SIH nor for DVT. Nevertheless, the 46T allele arises as a weak risk factor for the development of AMI < 45 (adjusted OR = 1.64; 95% CI, 1.14-2.37; p = 0.008). Allele 46T carriers showed higher CRP levels (p = 0.002) and worse outcome than controls. Moreover, we found a synergic interaction between hypercholesterolemia and this polymorphism. Finally, we described a new genetic variant in the gene coding FXII: C42T, found rarely, close to the Kozak sequence and possibly linked to the 46C variant, which, however, does not seem to affect FXII circulating levels.

Conclusions. The 46T allele, related to lower FXII plasma levels, seems to predispose to AMI < 45 development, particularly in hypercholesterolemic patients.

Key words:

Factor XII. Polymorphism (genetics). Thrombosis. Myocardial infarction.

Introducción

El factor XII (FXII) es una β -glucoproteína monocatenaria sintetizada en el hígado, que circula en el plasma como zimógeno. Mediante el contacto con superficies cargadas negativamente (autoactivación), o bien mediante proteólisis enzimática, el FXII se transforma en una proteína bicatenaria con actividad serín-proteasa, el FXII activado (FXIIa). Junto con el cininógeno de alto peso molecular y la calicreína, el FXII se ha incluido clásicamente en el denominado "sistema de contacto", cuyo producto final de su activación es la bradiquinina, un mediador celular. Si bien la función más conocida del FXII, y la descrita en primer lugar, es el inicio de la vía intrínseca de la coagulación me-

diante la activación del factor XI, posteriormente se han descrito otras funciones, entre las que destacan las actividades anticoagulante, profibrinolítica, proinflamatoria, antiadhesiva y antiangiogénica¹.

Los valores plasmáticos de FXII son de alrededor de 30 μ g/ml, pero existe una amplia variabilidad interindividual e interracial (rango, 15-47 μ g/ml). Diversos factores influyen en los valores plasmáticos de FXII, tanto ambientales como genéticos. Entre estos últimos, además de los muy poco frecuentes déficit congénitos, destaca un polimorfismo descrito recientemente², definido por la sustitución de citosina por timina en la posición 46 del gen del factor XII (C46T). El nucleótido 46 se encuentra incluido en la secuencia Kozak, una región reguladora de la traducción del ARNm. El cambio C46T origina un nuevo codón de inicio ATG, integrado en la secuencia Kozak, que altera la eficiencia de la traducción. Como consecuencia, los valores plasmáticos de FXII y FXIIa están disminuidos en los portadores del alelo T², hecho que se ha confirmado en diversos estudios³⁻⁵.

Dada la participación del FXII, tanto en la cascada de la coagulación como en la activación del plasminógeno, la reducción de los valores circulantes de FXII podría estar implicada en diferentes enfermedades hemostáticas, tanto hemorrágicas como trombóticas (en territorio venoso y/o arterial). Sin embargo, los pocos estudios que han evaluado hasta la fecha el papel de la deficiencia de FXII, en general, y de este polimorfismo, en particular, aportan informaciones contradictorias. Los individuos con déficit congénito de FXII no presentan clínica hemorrágica; es más, se ha observado asociación con enfermedad trombótica venosa⁶ y coronariopatía⁷. Sin embargo, se ha encontrado asociación entre los valores elevados de FXIIa y la enfermedad coronaria, tanto con su desarrollo^{5,8,9} como con su extensión³. Tampoco está claro el papel del polimorfismo C46T del FXII en el desarrollo de la enfermedad trombótica venosa o coronariopatía. Entre los estudios publicados, sólo uno confiere papel protector al alelo T en homocigosis respecto al desarrollo de síndrome coronario agudo¹⁰. Algunos estudios encuentran asociación del alelo T con mayor frecuencia de trombosis: enfermedad coronaria¹¹, trombosis venosa profunda^{12,13} e ictus¹⁴; estos 2 últimos realizados en población española. Otros estudios no han encontrado asociación alguna de este polimorfismo con la enfermedad trombótica^{3,15-17}. No hay datos hasta el momento acerca de la relación entre el polimorfismo y la enfermedad hemorrágica.

Ante la versatilidad funcional del FXII, el objetivo de nuestro estudio fue estudiar la asociación del

polimorfismo F12 C46T con la aparición de enfermedades hemostáticas en sus distintas vertientes, concretamente hemorragia intracraneal espontánea (HIC), trombosis venosa profunda (TVP) e infarto agudo de miocardio (IAM) prematuro, acaecido antes de los 45 años de edad (IAM < 45). La selección de pacientes jóvenes en este estudio es relevante, ya que implica una mayor contribución de los factores genéticos respecto a los ambientales en el desarrollo de enfermedad coronaria^{18,19}. Además, se ha descrito que los pacientes jóvenes con IAM presentan menos lesiones coronarias²⁰.

Pacientes y métodos

Se realizaron 3 estudios caso-control. Como controles participaron 550 sujetos caucásicos, sanos, no emparentados, sin antecedentes personales de episodios trombóticos o hemorrágicos ni enfermedad vascular, mayoritariamente donantes de sangre del Centro Regional de Hemodonación de Murcia, y pacientes ingresados en los servicios de Traumatología y Oftalmología del Hospital General Universitario de Alicante y Murcia.

Para el estudio de HIC, se incluyó a 55 pacientes consecutivos, adultos con un primer episodio de hemorragia intracraneal espontánea –no posttraumática– ingresados en el Hospital General Universitario de Murcia y en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, de Murcia. El diagnóstico se realizó mediante TC craneal realizada en las primeras 24 h de evolución. Se excluyó a los pacientes con conversión hemorrágica de un infarto cerebral previo, tumor cerebral primario o metastásico, en tratamiento anticoagulante/antiagregante o con trastorno hemorrágico congénito/adquirido. En todos ellos se registraron los principales factores de riesgo en relación con HIC espontánea (HTA, tabaquismo, ingesta de alcohol).

En el estudio de asociación de TVP con el polimorfismo se incluyó, de forma consecutiva, a 206 pacientes con TVP confirmado mediante ecografía-Doppler o flebografía con contraste. En este grupo de pacientes se estudiaron los principales factores de riesgo genéticos conocidos para el desarrollo de TVP (factor V Leiden y FII 20210A/G).

Para estudiar la relación entre el polimorfismo C46T y el IAM prematuro, se incluyó a 281 pacientes supervivientes de un IAM sufrido antes de los 45 años de edad, reclutados de forma consecutiva en las Consultas Externas de Cardiología del Hospital General de Alicante. Para el diagnóstico de IAM se requirió la presencia de, al menos, 2 de los siguientes criterios: dolor torácico típico de más de 30 min de duración; elevación de la creatincinasa por encima del doble del límite superior de la normalidad, con aumento concomitante de los valores de la isoenzima creatincinasa MB; presencia de ondas Q nuevas o aparición de alteraciones del ST-T no previamente conocidas. A estos pacientes se les realizó un seguimiento en 3 períodos: un primero correspondiente al primer mes post-IAM; un segundo desde el segundo al sexto mes de evolución (ambos inclusive), y un tercero posterior al sexto mes de evolución. Se registró la evolución de los pacientes (buena/mala); se consideró mala evolución la aparición de muerte de causa cardíaca, nuevo IAM, episodio de angina inestable y cualquier episodio que requiriera revascularización urgente. En el tercer mes post-IAM, se midieron los perfiles lipídicos (valores plasmáticos de colesterol total, triglicéridos totales, lipoproteínas de alta y baja densidad [HDL y LDL, respectivamente]), así como los valores plasmáticos de la proteína C reactiva.

Todos los pacientes incluidos eran sujetos de raza caucásica no emparentados entre sí. En los estudios de HIC y TVP se seleccionó a los controles apareados atendiendo a la edad, el sexo y los principales factores de riesgo relacionados con la enfermedad en estudio. Todos los sujetos (o sus representantes legales en caso de inconsciencia/alteraciones cognitivas/minoría de edad) dieron su consentimiento informado para entrar en los estudios, que habían sido aprobados por el comité ético local y se realizaron de acuerdo con la declaración de Helsinki.

Obtención y procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre se extrajeron mediante venopunción atraumática (Vacutainer, Becton Dickinson, Meylon, Francia). Para los estudios bioquímicos sistemáticos se obtuvieron muestras de sangre en tubo seco (Venoject, Terumo Europa, Lovaina, Bélgica). En los pacientes con IAM prematuro, la medida de los valores plasmáticos de colesterol, LDL, HDL y triglicéridos se realizó mediante métodos enzimáticos sistemáticos. Los valores plasmáticos de proteína C reactiva se determinaron por inmunonefelometría (Immage, Beckman[®]). Para llevar a cabo los estudios genéticos del polimorfismo C46T, se extrajo sangre anticoagulada con EDTA. Se purificó el ADN genómico de todos los sujetos mediante procedimientos habituales (Wizard[®], Promega, Innogenetics, Barcelona, España). La amplificación del exón 1 de *F12* se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) genómica, con las condiciones descritas por Kanaji et al². Una vez amplificado el fragmento de interés (369pb), se determinó el genotipo mediante análisis de la conformación de las cadenas sencillas, o SSCP (*single stranded conformational polymorphism*). Brevemente, se mezclan 10 µl de la solución 1 (0,1% SDS + 10 mM de EDTA pH 7,4), 10 µl de la solución 2 (95% de formamida + 20 mM de EDTA pH 7,4 + 0,05% de azul de bromofenol + 0,05% de xilencianol) y 4 µl de la PCR. La mezcla se desnaturiza a 96 °C durante 5 min y se carga en un gel de poliacrilamida al 10%. Tras electroforesis a 20 V durante 16 h, las bandas resultantes se detectan con plata²¹. La confirmación de los genotipos de acuerdo con los patrones obtenidos mediante SSCP se realizó mediante secuenciación automática. Para ello, los productos de la PCR fueron purificados de geles de agarosa al 1,5% (Ultracean Gel Spin, Mobio, Solana Beach, Estados Unidos). La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el kit ABI Prism Big Dye Terminator Cycle, en el secuenciador automático tipo 377 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Washington Chesire, Reino Unido); se usaron los mismos oligonucleótidos empleados en la amplificación. La determinación de la actividad plasmática del FXII se realizó, en controles seleccionados con los distintos genotipos para *F12* C46T, utilizando un coagulómetro automatizado (Instrumentation Laboratory, Milán, Italia) empleando plasma deficiente en FXII.

Análisis estadístico

En cuanto al manejo de las variables continuas, en primer lugar, se comprobó la normalidad de su distribución mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Cuando la distribución de los datos no fue normal, se realizó una transformación logarítmica antes del análisis. Sin embargo, para mostrar los datos de la manera más clara posible, se presentan en formato no logarítmico, como mediana (rango intercuartílico). Los datos con distribución normal se expresan como media ± desviación estándar. Las variables categóricas se expresan como porcentajes. El análisis estadístico univariante se llevó a cabo por medio de la prueba de la χ^2 . La fuerza de asociación de los facto-

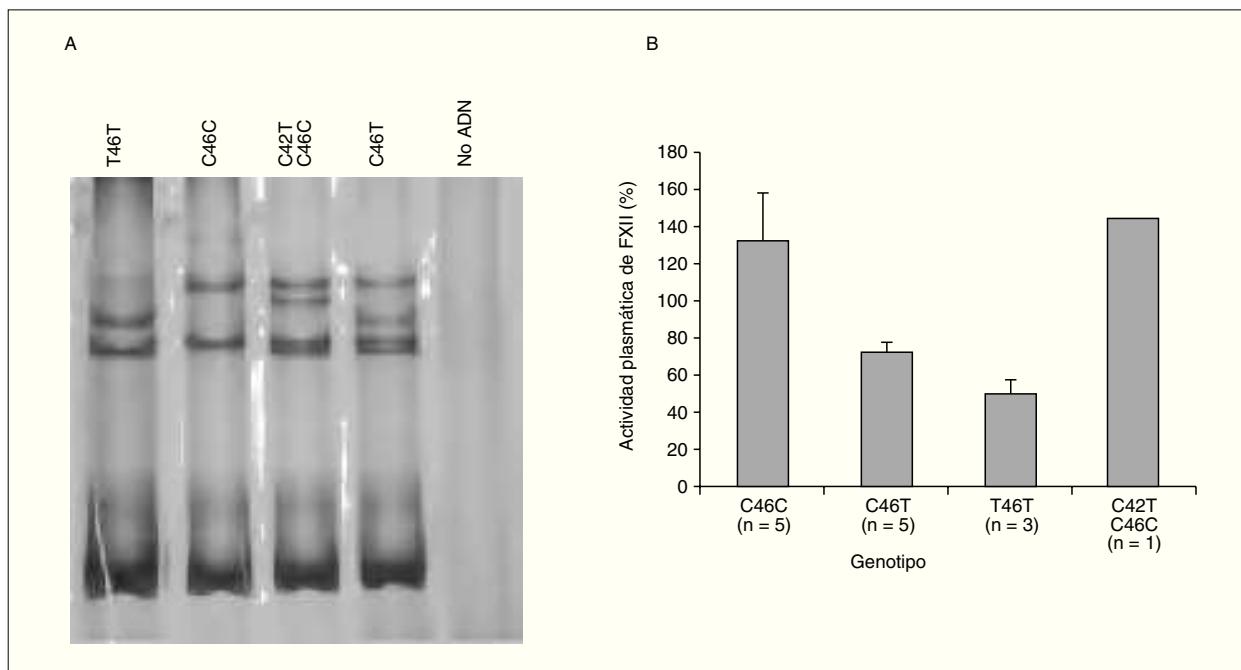


Figura 1. A) Patrones representativos de los posibles genotipos del exón 1 del gen *F12* por SSCP. La confirmación de los genotipos se realizó mediante secuenciación. B) Asociación de los niveles de FXII activado con el genotipo *F12* en controles seleccionados. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad respecto a un conjunto de 100 controles sanos (media \pm DE).

res de riesgo cardiovasculares mayores y el polimorfismo con la presencia de HIC, TVC e IAM se estimó calculando la *odds ratio* (OR) con el software Epi-Info y el método Cornfield para el cálculo del intervalo de confianza (IC) del 95%. El análisis multivariable se llevó a cabo mediante regresión logística y regresión lineal, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows 9,0. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con una *p* bilateral $< 0,05$.

Resultados

Identificación de una nueva variante en el gen *F12*

El análisis de SSCP reveló 3 posibles combinaciones mayoritarias que se correspondían con los posibles genotipos homocigotos y heterocigotos del polimorfismo que afecta la posición 46 del gen *F12* (fig. 1A). Nuestro estudio identificó, además, un patrón diferente en 2 de los 550 controles representativos de la población general (0,36%) (fig. 1A). La secuenciación de estas muestras reveló una nueva variante genética consistente en la sustitución de citosina por timina en el nucleótido 42 del gen *F12*, en ambos casos en heterocigosis y asociada con el genotipo C46C. Esta posición es inmediatamente anterior a la secuencia Kozak. Sin embargo, esta nueva variante no modifica significativamente los valores plasmáticos de FXII esperados en sujetos homocigotos para la posición 46 (C46C) (fig. 1B).

Relevancia del polimorfismo C46T del *F12* en los estudios de casos y controles

El alelo T se identificó en el 32% de los sujetos (frecuencia alélica: 0,180), con una frecuencia ligeramente inferior a la descrita en otras poblaciones caucasianas^{10,18}. Es importante resaltar que la distribución de los genotipos en los controles seguía correctamente las proporciones Hardy-Weinberg esperadas.

La distribución genotípica de los individuos incluidos, así como la distribución de los factores de riesgo considerados según cada enfermedad, se expone en la tabla 1. Como puede comprobarse, no se ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo T y la hemorragia intracranal espontánea en la población estudiada (*odds ratio* [OR] = 0,72; intervalo de confianza [IC] del 95%, 0,3-1,72), siendo los casos y controles comparables respecto a edad, el sexo, la HTA, el tabaquismo y la ingesta de alcohol. Tampoco existen diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia del alelo T del polimorfismo C46T entre nuestro grupo de pacientes con TVP y sus respectivos controles (OR = 1,05; IC del 95%, 0,65-1,55).

Respecto al IAM prematuro, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia alélica respecto a la población general,

Tabla 1. Características clínicas y distribución del polimorfismo en los distintos grupos de estudio

	Hemorragia intracranal		TVP		IAM < 45 años	Población general (n = 550)
	Pacientes (n = 55)	Controles (n = 56)	Pacientes (n = 206)	Controles (n = 206)	Pacientes (n = 281)	
Edad (años)	60,3 ± 16,1	61,4 ± 14,2	53,0 ± 18,6	53,3 ± 17,8	44 ± 6 ^a	49 ± 19
Sexo (% varones)	45,5	33,9	53,9	53,8	90	54
HTA (%)	49,1	48,2	—	—	29	27
DM (%)	—	—	—	—	11	12
HC (%)	—	—	—	—	70	23
Tabaquismo (%)	29,1	25	—	—	82	40
Etilismo (%)	6	5,4	—	—	—	—
FVL (%)	—	—	12,1 ^b	4,8	—	—
FII 20210 A/G (%)	—	—	8,2 ^b	1,9	—	—
Genotipo C46T						
C/C	38 (69,1%)	34 (60,7%)	136 (66,0%)	133 (64,6%)	172 (61%)	373 (68%)
C/T	15 (27,3%)	19 (33,9%)	65 (31,5%)	56 (27,2%)	103 (37%) ^c	156 (28%)
T/T	2 (3,6%)	3 (5,3%)	5 (2,4%)	12 (5,8%)	6 (2%)	21 (4%)
OR (IC del 95%) portadores alelo T		0,72 (0,3-1,72)		1,05 (0,65-1,55)		1,64 (1,14-2,37)
p		0,422		0,9745		0,008
Frecuencia alélica C46T						
C	0,828	0,777	0,818	0,801	0,795	0,820
T	0,172	0,223	0,182	0,199	0,205	0,180
p		0,684		0,538		0,156

HTA: hipertensión arterial, definida como presión arterial sistólica > 140 mmHg o diastólica > 90 mmHg, en repetidas tomas a lo largo de 3 meses, o toma crónica de antihipertensivos; DM: diabetes mellitus, definida como glucemia basal ≥ 126 mg/dl (0,07 mmol/l) en, al menos, 2 determinaciones, o ≥ 200 mg/dl (0,11 mmol/l) en una determinación con clínica compatible; HC: hipercolesterolemia, definida como concentración sérica de colesterol total > 220 mg/dl (5,72 mmol/l); tabaquismo: consumo (actual o pasado) de más de 10 cigarrillos/día; etilismo: consumo de más de 300 g de alcohol/semana; FVL: factor V Leiden, genotipos +/- más +/+. FII 20210 A/G: protrombina 20210 A/G, genotipos A/G más A/A; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

^aLa edad media en el diagnóstico de IAM es de 40 ± 5 años.

^bp < 0,01 (χ^2).

^cp = 0,022 (χ^2).

hay una mayor frecuencia del genotipo C/T en los pacientes (p = 0,022), con una tendencia a la menor prevalencia de T/T que no llega a alcanzar la significación estadística. La estimación de la fuerza de asociación entre las distintas variables consideradas y la aparición de IAM prematuro se recoge en la tabla 2. En el análisis univariante, ser portador del alelo T no alcanza significación estadística como factor de riesgo asociado a la aparición de IAM prematuro. Sin embargo, en el análisis multivariante (ajustando según factores de riesgo) el alelo T aparece como factor de riesgo débil asociado al desarrollo de IAM < 45 (OR = 1,64; IC del 95%, 1,14-2,37; p = 0,008). Además, observamos una relación estadísticamente significativa entre los valores de proteína C reactiva y la presencia del alelo T, siendo mayor la mediana de concentración plasmática en los portadores de éste (0,275 frente a 0,150 mg/dl en sujetos C46C; p = 0,002). No observamos asociación entre la presencia del alelo T y el perfil lipídico. De entre los 236 pacientes a los que se les realizó un seguimiento > 6 meses, la proporción de pacientes con mala evolución (13,05%) fue mayor en los pacientes portadores del alelo T que

en los homocigotos para C (OR = 1,78; IC del 95%, 1,00-3,21; p = 0,040). Finalmente, como hallazgo interesante en este grupo de pacientes, destacamos el sinergismo que identificamos entre hipercolesterolemia y alelo T: entre los pacientes hipercolesterolémicos fue más frecuente el alelo T que en los controles hipercolesterolémicos (p < 0,001). Además, como se muestra en la tabla 3, la combinación de hipercolesterolemia y portador de T se asocia de forma significativa con el desarrollo de IAM < 45 con mucho mayor poder en el análisis multivariante (ajustando según factores de riesgo) (OR = 2,26; IC del 95%, 1,31-3,93; p = 0,003). Igualmente, la evolución a largo plazo es peor en los pacientes portadores del alelo T con hipercolesterolemia (OR = 2,00; IC del 95%, 1,02-3,93; p = 0,029).

Discusión

La investigación en hemostasia identificó diferentes factores cuya relevancia patológica aún no está bien definida. Es el caso del FXII, cuya deficiencia congénita podría teóricamente asociarse con trastornos hemorrágicos por el papel de este factor en la ruta intrínseca de la coagulación, pero

Tabla 2. Asociación de los principales factores de riesgo cardiovascular y del polimorfismo C46T del factor XII con la aparición de infarto agudo de miocardio en menores de 45 años

	OR bruta (IC del 95%); p ^a	OR ajustada (IC del 95%); p ^b
Varones	7,00 (4,49-10,96); < 0,001	3,50 (2,19-5,62); < 0,001
Tabaquismo	6,82 (4,75-9,81); < 0,001	2,43 (1,80-3,28); < 0,001
Diabetes mellitus	0,91 (0,56-1,47); 0,679	0,69 (0,40-1,20); 0,189
Hipercolesterolemia	7,97 (5,69-11,18); < 0,001	6,42 (4,50-9,17); < 0,001
Hipertensión	1,13 (0,80-1,57); 0,454	0,85 (0,58-1,25); 0,415
Portador de 46T de <i>F12</i>	1,34 (0,98-1,82); 0,058	1,64 (1,14-2,37); 0,008

^aPrueba de la χ^2 .^bÁnálisis de regresión múltiple según el método Enter.**Tabla 3. Fuerza de asociación entre los distintos factores de riesgo y la aparición de infarto agudo de miocardio antes de los 45 años en sujetos hipercolesterolemicos**

	OR bruta (IC 95%); p ^a	OR ajustada (IC 95%); p ^b
Varones	3,43 (1,63-7,29); < 0,001	3,30 (1,58-6,91); 0,002
Tabaquismo	4,72 (2,75-8,12); < 0,001	2,35 (1,62-3,41); < 0,001
Diabetes mellitus	0,69 (0,35-1,39); 0,266	0,71 (0,35-1,40); 0,384
Hipertensión	0,79 (0,48-1,29); 0,322	0,88 (0,53-1,47); 0,639
Portador de <i>F12</i> 46T	1,95 (1,15-3,32); 0,009	2,26 (1,31-3,93); 0,003

^aPrueba de la χ^2 .^bÁnálisis de regresión múltiple según el método Enter.

que más bien se ha asociado con trastornos trombóticos. Por otra parte, la búsqueda de alteraciones genéticas asociadas a enfermedades hemostáticas ha pasado de analizar mutaciones raras asociadas a déficit grave de la proteína a evaluar polimorfismos comunes con efecto funcional, especialmente tras el descubrimiento del factor V Leiden y la protrombina 20210. Recientemente, se ha identificado uno de los polimorfismos hemostáticos con mayor importancia funcional. Se trata del cambio C46T del gen *F12*. La modificación de la secuencia Kozak que ocasiona este polimorfismo supone una alteración significativa de la tasa de traducción que se manifiesta en una variación muy significativa de los valores circulantes de FXII dependiendo del genotipo². La importancia funcional y la alta frecuencia en población caucasiana (el 7% homocigotos, el 29% heterocigotos)¹⁰ apoya que su estudio en enfermedades hemostáticas sea de alto interés. Sin embargo, los pocos estudios que evalúan este polimorfismo, se restringen a enfermedad trombótica, y además ofrecen resultados conflictivos. Nosotros intentamos evaluar la importancia de este cambio genético en un trastorno hemorrágico no congénito (HIC) y 2 trombóticos, tanto en territorio venoso (TVP) como arterial (IAM). En este último caso, estudiamos pacientes jóvenes, donde los factores genéticos han demostrado ser más relevantes que los ambientales.

Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo C46T no afecta al riesgo de presentar HIC, aunque el pequeño número de pacientes incluidos aconseja ampliar el tamaño de la muestra para confirmar los resultados. En cualquier caso, se trata de un resultado en concordancia con la nula influencia de este factor (y su deficiencia) en el riesgo hemorrágico^{6,7}. Este resultado confirma el escaso papel de la ruta intrínseca en general en los procesos hemorrágicos. De hecho, cuando existe un déficit de cualquiera de los factores del sistema de contacto, se alarga el TTPA sin que haya clínica hemorrágica asociada.

Más conflictividad observamos al comparar nuestros resultados con el único trabajo publicado en TVP, también en población española¹³. Nuestro estudio no encuentra asociación entre el alelo T y la TVP, en contraste con los resultados encontrados por Tirado et al¹³. Es posible que esta discrepancia se deba a la selección de pacientes, ya que nuestro estudio incluye TVP consecutivas, mientras que el grupo catalán incluye el 52% de TVP espontáneas y, por tanto, seleccionadas. No obstante, la distribución similar de genotipos en los pacientes de ambos grupos nos hace pensar que haya que buscar las diferencias en los controles. En este sentido, llama la atención que la distribución de genotipos del polimorfismo C46T en los controles del estudio catalán se aparta significativamente del equilibrio

Hardy-Weinberg, especialmente los homocigotos 46T y por tanto podrían no estar realmente representando a la población general. Además, Tirado et al¹³ no evidencian riesgo alguno de TVP en los portadores heterocigotos del polimorfismo, en una paradoja que los autores no explican. En cualquier caso, los resultados observados por Tirado et al¹³ se sustentan en un número de casos y controles reducido, lo que, junto a la discrepancia con nuestros resultados observados en una serie similar, sugiere que son necesarios nuevos estudios para aclarar el papel de este polimorfismo en TVP.

Nuestro estudio sí identifica una asociación significativa entre el polimorfismo estudiado y la patología trombótica arterial, concretamente coronaria. Ser portador del alelo 46T de *F12* parece ser un factor de riesgo independiente, aunque débil (OR = 1,64) en relación con el desarrollo de IAM prematuro (< 45 años). Estos resultados son similares a los encontrados por Endler et al¹⁰. Así, observamos que la prevalencia del genotipo homocigoto 46T es menor en los pacientes que en los controles en aparente contradicción con el riesgo asociado al alelo 46T. Estos resultados podrían explicarse por un sesgo de supervivencia, ya que ambos estudios incluyen pacientes que sobrevivieron a un episodio trombótico agudo. Si la homocigosis para 46T implicase una mayor gravedad del IAM, podría asociarse a mayor incidencia de mortalidad temprana y, por tanto, al incluir sólo supervivientes podríamos infraestimar el genotipo T46T. Esta interesante hipótesis debe ser contrastada en estudios futuros.

Datos recientes atribuyen menor importancia al papel del FXII en la coagulación y refuerzan el papel clave que desempeña esta proteína en la fibrinólisis y la inflamación. El FXII es capaz de activar el plasminógeno de forma directa²²⁻²⁴ y de forma indirecta mediante la activación de la precalicreína¹. La calicreína induce la liberación de activador tisular del plasminógeno (t-PA), activa la prourocinasa y el plasminógeno, y da lugar a la bradicinina, que es el inductor más potente conocido de la liberación endotelial de t-PA^{1,25}. Además, el FXII tiene efecto antitrombótico e inhibe la agregación plaquetaria inducida por trombina al unirse al complejo glucoproteico plaquetario Ib-IX-V¹. La fisiopatología de los síndromes coronarios agudos se caracteriza por la interacción, como una estenosis coronaria, de la pared vascular, la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis. Se ha demostrado la importancia de la formación del trombo como mecanismo patogénico de la isquemia miocárdica, así como de la interacción de la placa aterosclerótica y factores protrombóticos²⁶. Por tanto, las propiedades

profibrinolíticas y antitrombóticas del FXII podrían desempeñar un papel importante en el IAM. Así, los sujetos con valores bajos de FXIIa, como los portadores del alelo 46T, tendrán disminuida tanto su actividad fibrinolítica como su capacidad antitrombótica, condiciones que son factores de riesgo para IAM^{27,28}. Además, hemos observado una relación significativa e independiente entre los valores de proteína C reactiva y el genotipo C46T en los pacientes con IAM ($p = 0,001$), lo que relaciona los valores bajos de este factor con posibles respuestas proinflamatorias que deben ser investigadas, y que podrían tener importancia en el desarrollo del IAM.

Nuestros datos, además, apoyan que el efecto protrombótico de este polimorfismo podría ser especialmente relevante en pacientes con hipercolesterolemia, y sugiere una interacción sinérgica entre estos 2 parámetros que requiere más estudios.

El hecho de que no hayamos encontrado asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo y la TVP y sí en el caso del IAM puede explicarse por las distintas características de la circulación venosa y arterial y, por tanto, las diferencias en la fisiopatología de la trombosis en los distintos territorios. En territorios arteriales, el flujo sanguíneo es más rápido y el diámetro del vaso es mucho menor; el endotelio es sometido a mayor estrés y es más necesaria la rapidez de actuación del sistema fibrinolítico para evitar la aparición de infarto distal a la oclusión. Además, sabemos que en la génesis de la trombosis arterial, concretamente la coronaria, es fundamental la formación de la placa de ateroma, lo que implica al metabolismo lipídico. Como hemos visto, existe una importante implicación del FXII en la fibrinólisis y una potencial interacción sinérgica con la hipercolesterolemia, de modo que su relevancia en el IAM puede ser mayor que en la TVP.

Finalmente, hemos descrito una nueva variante genética de *F12*, C42T, muy poco frecuente en la población general, que no parece influir en los valores plasmáticos de FXII y que, por tanto, tampoco parece que pueda tener consecuencias patológicas.

Bibliografía

1. Colman RW. Contact activation pathway: inflammatory, fibrinolytic, anticoagulant, antiadhesive, and antiangiogenic activities. En: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, editores. Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.103-21.
2. Kanaji T, Okamura T, Nio Y, Sugiyama M. A common genetic polymorphism (46C to T substitution) in the 5' untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blo-od*. 1998;91:2010-4.

3. Kohler HP, Carter AM, Stickland MH, Grant PJ. Levels of activated FXII in survivors of myocardial infarction-association with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1998;79:14-8.
4. Ishii K, Oguji S, Murata M, Mitsuyoshi Y, Takeshita E, Ito D, et al. Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coag Fibrinolysis*. 2000;11:277-84.
5. Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, et al. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2000;102:2058-62.
6. Halbmayer WM, Mannhalter C, Feichtinger C, Rubi K, Fischer M. The prevalence of factor XII deficiency in 103 orally anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb Haemost*. 1992;68:285-90.
7. Halbmayer WM, Haushofer A, Radek J, Schon R, Deusch M, Fischer M. Prevalence of factor XII (Hageman factor) deficiency among 426 patients with coronary artery disease awaiting cardiac surgery. *Coron Artery Dis*. 1994;5:451-4.
8. Miller GJ, Snouf MP, Burgss AI, Cooper JA, Mitchell JP. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2103-6.
9. Cooper JA, Miller GJ, Bauer KA, Morrissey JH, Meade TW, Howarth DJ, et al. Comparison of novel hemostatic factors and conventional risk factors for prediction of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;102:2816-22.
10. Endler G, Mannhalter C, Sunder-Plassman H, Lalouschek W, Kaptotis S, Exner M, et al. Homozygosity for the C → T polymorphism at nucleotide 46 in the 5' untranslated region of the factor XII gene protects from development of acute coronary syndrome. *Br J Hematol*. 2001;115:1007-9.
11. Zito F, Lowe G, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Association of the factor XII 46C-T polymorphism with risk of coronary heart disease (CHD) in the WOSCOP study. *Atherosclerosis*. 2002;165:153-8.
12. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A quantitative-trait locus in the human factor XII gene influences both plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:567-74.
13. Tirado I, Soria JM, Mateo J, Oliver A, Souto JC, Santamaría A, et al. Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C → T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 2004;9:899-904.
14. Santamaría A, Mateo J, Tirado I, Oliver A, Belvis R, Martí-Fabregas J, et al. Homozygosity of the T allele of the 46 C → T Polymorphism in the F12 gene is a risk factor for ischemic stroke in the Spanish population. *Stroke*. 2004;35:1795-9.
15. Oguji S, Ito D, Murata M, Yoshida T, Tahabashi N, Fukuuji Y, et al. Genotype distribution of the 46C/T polymorphism of coagulation factor XII in the Japanese population: absence of its association with ischaemic heart disease. *Thromb Haemost*. 2000;83:178-9.
16. Orth M, Westphal S, Dierkers J, Luley C, Schlaterer K. Rapid Factor XII (C46T) genotyping by fluorescence resonance energy transfer in patients with coronary artery disease or thrombophilia. *Clin Chem*. 2001;47:1117-9.
17. Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, et al. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*. 2000;102:2058-62.
18. Ardissono D, Manucci PM, Merlin PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliafue L, et al. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood*. 1999;94:46-51.
19. González-Conejero R, Corral J, Roldán V, Martínez C, Marín F, Rivera J, et al. A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-1C>T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients. *Blood*. 2002;100:2081-6.
20. Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, Ng G. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:654-61.
21. Corral J, Iniesta JA, González-Conejero R, Vicente V. Detection of factor V Leiden from a drop of blood by PCR-SSCP. *Thromb Haemost*. 1996;76:735-7.
22. Hack CE. The role of factor XII in contact system activation [car-ta]. *Blood*. 1998;92:703-4.
23. Braat EAM, Dooijewaard G, Rijken DC. Fibrynlitic properties of activated FXII. *Eur J Biochem*. 1999;263:904-11.
24. Schusboe I, Feddersen K, Rojkjaer R. Factor XIIa in a kinetically favorable plasminogen activator. *Thromb Haemost*. 1999;82:1041-6.
25. Bouma BN, Meijers JCM. Fibrinolysis and the contact system: a role for factor XI in the down-regulation of fibrinolysis. *Thromb Haemost*. 1999;82:243-50.
26. Fuster V, Fayad Z, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet*. 1999;353 Suppl II:5-9.
27. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1993;341:1165-8.
28. Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, Van de Loo JCW. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med*. 1995;332:635-41.