

DEPARTAMENT DE MEDICINA

MANIFESTACIONES TROMBÓTICAS EN LA
ENFERMEDAD DE BEHCET: RELACIÓN CON
ALTERACIONES DE LA VÍA DE LA PROTEÍNA C,
ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS Y DEFECTOS
TROMBOFÍLICOS

JOSÉ MARÍA RICART VAYÁ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 22 de juny de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Jose Cabo Soler
- D. Josep Redon Mas
- D. Juan Ferrando Barbera
- D. Juan Lluís Vives Corrons
- D^a. Esperanza Jordá Cuevas

Va ser dirigida per:

D. Juan José Vilata Corell

D^a. Amparo Vayá Montaña

©Copyright: Servei de Publicacions
José María Ricart Vayá

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7253-1

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Medicina



**MANIFESTACIONES TROMBÓTICAS EN LA
ENFERMEDAD DE BEHCET: RELACIÓN CON
ALTERACIONES DE LA VIA DE LA PROTEINA C,
ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS Y
DEFECTOS TROMBOFÍLICOS**

TESIS DOCTORAL
José María Ricart Vayá
Valencia, 2006

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. ENFERMEDAD DE BEHCET	3
I.1.a. EPIDEMIOLOGÍA	3
I.1.b. ETIOPATOGENIA	4
I.1.c. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	7
I.1.d. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	8
I.1.e. PRONÓSTICO Y MORBIMORTALIDAD	13
I.2. HEMOSTASIA	14
I.2.a. GENERALIDADES	14
I.2.b. LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA	16
I.2.c. LA FIBRINOLISIS	21
I.2.d. EL SISTEMA DE LA PROTEINA C	23
I.2.e. EL ENDOTELIO	28
I.3. TROMBOFILIA	29
I.3.a. CONCEPTO, PREVALENCIA Y TIPOS	29
I.3.b. TROMBOFILIAS HEREDITARIAS	31
I.3.c. TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS	36
I.4. HEMORREOLOGIA	39
I.4.a. VISCOSIDAD SANGUÍNEA	39
I.4.b. VISCOSIDAD PLASMÁTICA	40
I.4.c. DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA	41
I.4.d. AGREGACION ERITROCITARIA	43
I.4.e. FIBRINÓGENO	45
I.4.f. ASOCIACION DE LOS FACTORES REOLÓGICOS CON LA TROMBOSIS ARTERIAL	47
I.4.g. ASOCIACION DE LOS FACTORES REOLÓGICOS CON LA TROMBOSIS VENOSA	49

I.5. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTADO PROTROMBÓTICO EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET.....	50
I.5.a. FACTORES DE RIESGO TROMBOTICO EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET	50
I.5.c. ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET	59
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	61
II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	63
II.2. OBJETIVOS.....	64
III. RESULTADOS	65
PUBLICACIONES CONSTITUTIVAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL	67
III.1. TRABAJOS PUBLICADOS	67
III.2. TRABAJOS ENVIADOS A PUBLICAR.....	97
IV. DISCUSION.....	145
V. CONCLUSIONES.....	165
VI. BIBLIOGRAFIA.....	169

ABREVIATURAS

ACA	anticuerpos anticardiolipina
AE	agregabilidad eritrocitaria
AL	anticoagulante lúpico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AT	antitrombina
ADP	adenosín difosfato
ATP	adenosín trifosfato
C4b-BP	proteína de unión al componente 4b del complemento
C677T MTHFR	polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolatoredutasa
Ca ²⁺	ion calcio
CH II	cofactor II de la heparina
CHCM	concentración de hemoglobina corpuscular media
DE	deformabilidad eritrocitaria
EB	enfermedad de Behcet
EPCR	receptor endotelial de la proteína C
F1+2	fragmento 1+2 de la protrombina
F Va	factor V activado
F V Leiden	factor V Leiden
F VII	factor VII
F VIIIa	factor VIII activado
F IX	factor IX
F X	factor X
F XI	factor XI
F XII	factor XII
FAP	factor activador plaquetario
Fbg	fibrinógeno
FL	fosfolípidos
FT	factor tisular
F vW	factor von Willebrand

HDL	lipoproteínas de alto peso molecular
HMWK	kininógeno de alto peso molecular
IA ₁₀	índice de agregación eritrocitaria a 10 segundos
IFN- γ	interferón γ
Ig	inmunoglobulina
IL-1	interleuquina 1
IL-1b	interleuquina 1b
IL-2	interleuquina 2
IL-6	interleuquina 6
IL-8	interleuquina 8
LDL	lipoproteínas de bajo peso molecular
MTHFR	enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa
ON	óxido nítrico
PAIs	inhibidores del activador del plasminógeno
PAI-1	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (endotelial)
PAI-1ag	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 antigénico
PAI-1fc	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 funcional
PAI-2	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 2 (placentario)
PAI-3	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 3 (= PCI)
PC	proteína C
PCa	proteína C activada
PCI	inhibidor de la proteína C activada (=PAI-3)
PCR	técnica de reacción en cadena de la polimerasa
PDFs	fragmentos de degradación de fibrina
PG20210A	mutación G20210A del gen de la protrombina
PGF _{1α}	6 ceto-prostaglandina F1 α
PGI ₂	prostaciclina
PKK	prekalikreína
PS	proteína S

R-PCa	resistencia a la proteína C activada
SNC	sistema nervioso central
SPECT	tomografía de fotón único
Ta	tiempo de agregación
TAC	tomografía axial computarizada
TAFI	inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
T-AT	complejos trombina antitrombina
TEP	tromboembolismo pulmonar
TEV	tromboembolismo venoso
TFPI	inhibidor de la vía del factor tisular
Th ₁	linfocitos T <i>helper</i>
TM	trombomodulina
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
t-PA	activador tisular del plasminógeno
t-PA ag	activador tisular del plasminógeno antigénico
t-PA fc	activador tisular del plasminógeno funcional
TVP	trombosis venosa profunda
TXB ₂	tromboxano B ₂
u-PA	activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
VCM	volumen corpuscular medio
VLDL	lipoproteínas de muy bajo peso molecular
VP	viscosidad plasmática
VS	viscosidad sanguínea
α_1 AT	α_1 antitripsina
α_2 AP	α_2 antiplasmina
γ D	umbral de desagregación eritrocitaria

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDAD DE BEHCET

La enfermedad de Behcet (EB) es una enfermedad sistémica de naturaleza inflamatoria, caracterizada por la presencia de aftas orales y genitales recurrentes, uveítis y lesiones cutáneas, pudiendo afectar también a otros órganos, tales como articulaciones, sistema nervioso central (SNC) y sistema vascular (1).

I.1.a. EPIDEMIOLOGÍA

La EB aparece a lo largo de la Ruta de la Seda desde el este de Asia hasta la costa mediterránea, con una prevalencia en Turquía muy elevada, de 80 a 370 casos por 100.000 habitantes (2). La prevalencia en Japón, Corea, China, Irán, y Arabia Saudita varía entre 13,5 y 20 casos por 100.000 habitantes (3). Sin embargo, en los países situados al Oeste, la prevalencia es menor: 0,64 por 100.000 habitantes en el Reino Unido, y 0,12 a 0,33 por 100.000 habitantes en Estados Unidos (4). En Alemania, la prevalencia en la población oriunda de Turquía es de 21 casos por 100.000 habitantes, inferior a la de la población turca residente en Turquía, pero muy superior a la de la población nativa alemana, que es de 0,42 por 100.000 habitantes (4).

Epidemiología en España

Los datos epidemiológicos de la EB en España son escasos en la actualidad. Un estudio del año 2.000 ha valorado los rasgos epidemiológicos de la EB en el noroeste de España (Lugo) durante el periodo comprendido entre 1.988 y 1.997. La incidencia anual de EB en el área de Lugo es de 0,66 casos por 100.000 habitantes (5). Otro trabajo publicado por Baixauli y cols recoge los datos epidemiológicos de 26 pacientes con EB pertenecientes al área geográfica correspondiente al Hospital General Universitario de Valencia.

En este trabajo, se concluye que las manifestaciones clínicas de los pacientes con EB son similares a las del resto de pacientes del área Mediterránea (6). Por último, Espinosa y cols ha realizado un estudio retrospectivo donde valoran la frecuencia de las diferentes manifestaciones clínicas en 38 pacientes del Noreste de España (7). No existen datos epidemiológicos acerca de la prevalencia de la enfermedad en el resto de las provincias españolas.

Edad de inicio

Muchos autores consideran como edad de inicio el momento en el que el paciente cumple completamente los criterios diagnósticos de la enfermedad (2; 8). La edad media de inicio de la enfermedad varía en función del área geográfica. En Alemania, es de 25 años (rango de 5 a 55 años), aunque difiere en función del sexo, siendo de 27 años para el sexo masculino y de 24,5 para el sexo femenino. En un estudio realizado en Turquía, la edad media de inicio fue de 25,6 años (9), y en otro realizado en Corea fue de 33 años (10).

Incidencia familiar

La EB afecta en ocasiones a varios miembros de una familia. Artículos recientes encuentran una frecuencia de formas familiares del 11% (11-13).

I.1.b. ETIOPATOGENIA

La causa de la EB aún se desconoce. Se han estudiado agentes infecciosos, mecanismos inmunes y factores genéticos.

Agentes infecciosos

Tanto la incidencia familiar como otros datos epidemiológicos favorecen la hipótesis de una causa infecciosa, sin embargo no se ha logrado

aislar de forma definitiva microorganismos específicos en las lesiones de pacientes con EB. En las úlceras genitales de algunos pacientes se ha aislado el virus herpes simple tipo 1 mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Algunos estudios han sugerido una relación causal con el virus de la hepatitis C, pero estos datos no se han confirmado.

Mecanismos inmunes

Se ha encontrado la participación de mecanismos autoinmunes en la patogenia de la enfermedad, sin embargo existe desacuerdo en clasificar la EB como una enfermedad autoinmune. Las principales diferencias entre la EB y las enfermedades autoinmunes son el predominio en el sexo masculino (principalmente en las formas graves), la ausencia de autoanticuerpos específicos y de hiperactividad de células B, y la hipofunción de células T.

El principal hallazgo microscópico en muchas lesiones de enfermedad activa es una vasculitis oclusiva inmune. A nivel celular, se han encontrado células T CD₄₊ en exudados perivascuales, y células T_{h1} que responden a varios estímulos con producción de interleuquina 2 (IL-2), interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral β (TNF- β). Además, se han encontrado niveles de interleuquina 8 (IL-8) elevados en pacientes con enfermedad activa. Ésta tiene un potente efecto sobre los neutrófilos y participa en la respuesta inflamatoria. También se han encontrado niveles elevados de interleuquina 1b (IL-1b) y de factor de crecimiento fibroblástico en ciertos casos de enfermedad grave. En un estudio reciente, se observó que los niveles de IL-2 y de receptor soluble de TNF- β se correlacionaban con la actividad de la enfermedad; los autores sugerían que estas citoquinas podían servir como marcador biológico de dicha actividad. Se ha descrito asimismo un incremento de la expresión de CD₁₁ y CD₁₈, que podría explicar la acumulación de neutrófilos en las lesiones inflamatorias. La activación de los monocitos podría explicar la producción de citoquinas responsables de la cronicidad de la inflamación (14)-(15; 16).

Factores genéticos

El rol del polimorfismo HLA-B5 ha sido estudiado ampliamente. Un estudio reciente encontró la presencia del alelo HLA-B*5101 en 72% de los pacientes, y demostró que predispone, sobre todo en pacientes varones, a formas graves de la enfermedad, como uveítis y eritema nodoso. Algunos investigadores han propuesto que el gen de la EB está localizado cerca del gen HLA-B, pero no se trata del HLA-B51. Se ha propuesto un modelo que explicaría la etiopatogenia de la EB: un factor exógeno (virus, bacteria) es presentado por los macrófagos y reconocido por las células T CD4+ en el contexto del complejo de histocompatibilidad de clase II. Las células T_{h1} activadas producen citoquinas (IL-2, IFN- γ , TNF- β) e inducen la proliferación de las células B. El IFN- γ activa a los macrófagos, que liberan factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina 1 (IL-1) e IL-8, que a su vez inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales. La IL-8 también induce quimiotaxis y activación de neutrófilos. Ambos eventos son responsables del paso de neutrófilos y linfocitos T activados a través del endotelio al área de inflamación. Determinados factores genéticos podrían contribuir a la expresión y perpetuación de la enfermedad (11).

Se ha estudiado si dentro de los diferentes tipos de HLA que presentan los pacientes con EB, existe alguno que se asocie con un tipo de manifestaciones clínicas (17), observándose que los pacientes que sufrieron tromboflebitis presentaban una frecuencia elevada HLA-B51 y baja de HLA-B35. Por el contrario, los pacientes con afectación ocular presentaron una frecuencia elevada de HLA-A29 y baja de HLA-Bw6, los pacientes con eritema nodoso, una baja frecuencia de HLA-Cw2, y los pacientes con aftas genitales, una baja frecuencia de HLA-Cw7. La presencia de HLA-B51 y la ausencia de HLA-B35 supusieron un factor de riesgo para el desarrollo de trombosis venosa profunda (TVP) en pacientes con EB.

I.1.c. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Fueron propuestos por primera vez en 1969, y actualmente se consideran los propuestos por el Grupo Internacional de Estudio de los Criterios para el Diagnóstico de Enfermedad de Behcet (Tabla 1) (18).

Tabla 1: Criterios del Grupo Internacional de Estudio de los Criterios para el Diagnóstico de Enfermedad de Behcet

Úlceras orales recurrentes	Aftas leves, lesiones aftosas mayores, o úlceras herpetiformes observadas por el médico o el paciente, que han recurrido al menos 3 veces en 12 meses.
Más de dos de:	
Úlceras genitales recurrentes	Úlceras aftosas o costrosas, observadas por el médico o el paciente.
Lesiones oculares	Uveítis anterior, uveítis posterior o células en el vítreo observadas con lámpara de hendidura, o vasculitis retiniana observada por un oftalmólogo.
Lesiones cutáneas	Eritema nodoso observado por el médico o el paciente, pseudofoliculitis, o lesiones pápulo-pustulosas, nódulos acneiiformes observados por el médico en pacientes post-adolescentes sin tratamiento corticoesteroideo.
Test de patergia positivo	Leído por el médico a las 24-48 horas.

Test de patergia

La positividad de este test indica una hiperreactividad cutánea inespecífica inducida por punción intradérmica. Se realizan 2 punciones subcutáneas con aguja estéril despuntada en un brazo y dos punciones subcutáneas con aguja puntiaguda en el otro brazo simultáneamente. El test se considera positivo si 48 horas después se forma una pápula eritematosa estéril

mayor de 2 mm. Histológicamente, se observan células mononucleares y queratinocitos alrededor de los vasos que se extienden dentro de la dermis profunda. Por su elevada sensibilidad y especificidad, el resultado positivo a este test es uno de los criterios internacionales de diagnóstico de EB. También puede ser positivo en otras enfermedades, como espondiloartropatías y leucemia mieloide crónica tratada con IFN- γ .

I.1.d. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Aftas

Úlceras orales: Las úlceras o aftas orales son con frecuencia el primer síntoma de la enfermedad y constituyen la piedra angular del diagnóstico. Las úlceras orales se desarrollan en las membranas mucosas de los labios, encías, mucosa oral, y lengua. Son dolorosas, únicas o agrupadas, con una duración que oscila entre algunos días y dos semanas, y suelen recurrir, especialmente durante los primeros años de la enfermedad. Al inicio son pápulas rojizas, y pronto se convierten en úlceras de 2 a 10 mm, de bordes eritematosos y necróticos. Su superficie está cubierta por una pseudomembrana amarilla. Al desaparecer no dejan cicatriz. La presencia de úlceras orales no es patognomónica de la EB, sino que también pueden observarse en el síndrome de Reiter, el pénfigo vulgar, la colitis ulcerosa, ciertas infecciones virales, etc.

Úlceras genitales: Se localizan en escroto, pene y área perianal en hombres, y en vulva y vagina en mujeres. Las úlceras genitales son similares a las orales, pero más profundas, grandes y dolorosas, y raramente se presentan al inicio de la enfermedad. Recurren con menos frecuencia que las úlceras orales y suelen dejar cicatriz. En las mujeres, estas úlceras pueden relacionarse cronológicamente con el ciclo menstrual. Las úlceras orales y genitales recurrentes pueden ser la única manifestación de la enfermedad en mujeres jóvenes (2; 13).

Manifestaciones cutáneas

Las manifestaciones cutáneas más frecuentes son la pseudofoliculitis, que predomina en el sexo masculino, y las lesiones eritema nodoso-*like*, dolorosas y más frecuentes en mujeres. Ambas manifestaciones duran algunas semanas y pueden recurrir múltiples veces en el curso de la enfermedad. Están localizadas principalmente en las extremidades inferiores. La pseudofoliculitis y los nódulos acneiformes pueden aparecer además en la cara, el cuello, el pecho y la espalda. Menos frecuentemente, se observan púrpura, ampollas y vasculitis (2; 19). También se han descrito erupciones máculo-papulosas y dermatografismo. La histopatología de las lesiones de eritema nodoso muestra un infiltrado neutrofílico perivascular, o bien una vasculitis neutrofílica en dermis y tejido celular subcutáneo (20).

Tanto el Grupo Internacional de Estudio de los Criterios para el Diagnóstico de Enfermedad de Behcet como el Comité de Investigación Japonés para la Enfermedad de Behcet incluyen en sus criterios diagnósticos de la EB la presencia cutánea de lesiones foliculares (9; 21). Bajo las lesiones pustulosas subyace histológicamente una reacción vascular mediada por neutrófilos a modo de vasculitis necrotizante de pequeños vasos.

Manifestaciones oculares

Las lesiones oculares incluyen: iridociclitis anterior, cataratas, glaucoma, afectación del segmento posterior con vasculitis, vitritis, retinitis, panuveítis, edema retiniano, degeneración macular, oclusión venosa o arterial y desprendimiento de retina. Las uveítis se clasifican según la localización anatómica de la inflamación en anteriores (iris y cuerpo ciliar), posteriores (coroides y retina), intermedias (retina periférica y *pars plana* del cuerpo ciliar) y panuveítis (inflamación generalizada de la úvea). La afectación ocular ocurre en el 43% a 72% de los pacientes. En hombres, es más frecuente y grave, apareciendo enfermedad ocular bilateral en el 80% de los pacientes. La

afectación ocular como primera manifestación de enfermedad es poco común. La uveítis anterior puede resolverse espontáneamente, pero es recurrente. La dilatación de los vasos retinianos observada mediante angiografía con fluoresceína es una importante herramienta diagnóstica. Al examinar histológicamente la lesión ocular en la fase inflamatoria aguda, se aprecia vasculitis neutrofílica del iris, cuerpo ciliar y vasos coroideos, con infiltrado perivascular y difuso de neutrófilos. En la fase final, se observa fibrosis y oclusión vascular (22-24).

Manifestaciones articulares

Artritis y artralgia: En algunos estudios, artralgia y artritis periférica son consideradas manifestaciones de la EB. La artritis periférica puede ser monoarticular, oligoarticular o poliarticular, simétrica o asimétrica, no es deformante y no suelen existir lesiones destructivas. Principalmente, afecta a las articulaciones de las extremidades inferiores, recurre ocasionalmente y raramente es crónica. La prevalencia varía, según la población estudiada, entre 40% y 60%. La afectación monoarticular es más común, con predilección por las rodillas, muñecas, tobillos y codos. La osteonecrosis es una complicación rara. Además, se han descrito entesitis (13; 25).

Sacroileitis: Se ha descrito que el 10% de los pacientes con EB padece espondilitis anquilosante y el 34% sacroileitis, y por ello se ha sugerido la EB se incluya en el grupo de artritis seronegativas.

Manifestaciones vasculares

Se cree que el sustrato patológico de las lesiones que presenta la EB es una vasculitis que afecta a vasos grandes, medianos o de pequeño calibre. Las complicaciones tromboticas están presentes aproximadamente en el 25% de los pacientes, afectando tanto al área venosa como arterial (26). La prevalencia de afectación vascular en la EB varía del 2% al 46% (9; 27-29). Las

manifestaciones vasculares aparecen en los primeros diez años de evolución de la enfermedad, siendo el momento crítico los dos primeros años, y son la primera manifestación de la enfermedad en el 38,8% de los pacientes (30).

En la mayoría de casos, la afectación vascular más frecuente es la TVP de miembros inferiores y la flebitis superficial, aunque los pacientes también pueden desarrollar trombosis de la vena cava inferior o superior, vena hepática (31), senos venosos cerebrales (32), venas renales (33), venas mesentéricas, venas ilíacas, venas pulmonares (34) y trombosis intracardiaca (35).

Las trombosis arteriales se desarrollan en grandes troncos como la arteria subclavia o la arteria pulmonar. Se han descrito trombosis de arterias de menor calibre de las extremidades superiores e inferiores. La oclusión de las arteriolas retinianas produce infarto retiniano y atrofia del nervio óptico (36). La oclusión vascular recurrente por vasculitis retiniana obliterante puede llevar al enfermo a una ceguera total, siendo ésta una de las manifestaciones clínicas más características de la EB. Es infrecuente que los pacientes con EB desarrollen infartos de miocardio a raíz de su enfermedad de base; sin embargo, han sido descritos en la literatura algunos casos, por lo que en pacientes jóvenes con EB que desarrollen infarto de miocardio debe ser valorada la presencia de una arteritis coronaria (37). Es extraordinariamente infrecuente que los pacientes con EB desarrollen una vasculitis cerebral que desemboque en un accidente cerebrovascular (38).

Los diferentes estudios muestran resultados divergentes respecto a la frecuencia de manifestaciones arteriales y venosas en los pacientes con EB. Mientras algunos autores han encontrado un claro predominio de las manifestaciones venosas frente a las arteriales (26; 27; 30), otros encuentran mayor frecuencia de las arteriales sobre las venosas (34; 39). Diferentes estudios han intentado encontrar una relación entre las manifestaciones vasculares y las manifestaciones cutáneas, habiéndose descrito una asociación entre lesiones como eritema nodoso y pseudofoliculitis, y el desarrollo de

trombosis (40). Se ha sugerido que la presencia de trombosis en los pacientes con EB predispone al desarrollo lesiones oculares (41).

Las lesiones arteriales tienen una frecuencia inferior al 4% (29), aunque otros autores han encontrado cifras superiores. Lakhanpal y cols (34) encuentran lesiones arteriales en 29,4% de las necropsias realizadas a una serie de 170 cadáveres con antecedentes de EB. Las manifestaciones arteriales más frecuentes son los aneurismas (65%), siendo menos frecuentes (35%) las oclusiones arteriales (30). Una de las causas de muerte en la EB es la ruptura de aneurismas; se ha calculado que 60 % de los mismos sufre una ruptura (42).

Manifestaciones en el sistema nervioso central

La afectación del SNC se denomina enfermedad de neuro-Behcet. Aparece en 3-10% de los casos, y es más frecuente en hombres. Los signos motores son más frecuentes que los sensitivos, siendo frecuentes la afectación piramidal, la lesión del tallo cerebral y las convulsiones. Las lesiones del tracto piramidal suelen originar parálisis espástica, signo de Babinsky, clonus y dislalia. Las lesiones del tallo inducen dificultad para deglutir. La afectación del SNC puede debutar con signos clínicos sugestivos de meningoencefalitis, que puede resolverse espontáneamente. Se han descrito casos de meningitis aséptica (43). La afección psiquiátrica es frecuente, con confusión, alucinaciones y agitación. Son útiles en el diagnóstico la tomografía axial computarizada (TAC), la resonancia magnética, la tomografía de fotón único (SPECT), la angiografía cerebral, y el análisis de líquido cefalorraquídeo, que usualmente muestra concentraciones elevadas de proteínas, bandas oligoclonales de IgG e índice IgG elevado, pleocitosis con predominio de linfocitos, y niveles de IL-6 elevados (44; 45).

Manifestaciones pulmonares

La prevalencia de la afectación pulmonar es del 1% (46). El hallazgo pulmonar más común son los aneurismas de la arteria pulmonar, y el principal

signo clínico es la hemoptisis. La localización más frecuente de los aneurismas es la arteria lobar inferior derecha (35%), la arteria lobar inferior izquierda (19%) y la arteria pulmonar principal derecha (17%). En la radiografía de tórax, muchos de los aneurismas aparecen como lesiones nodulares en hiliares o parahiliares. Son útiles para el diagnóstico la TAC y la resonancia magnética. También se ha observado neumonitis eosinofílica, masas mediastínicas, mediastinitis y quilotipsis con síndrome de vena cava superior.

Manifestaciones gastrointestinales

Se pueden encontrar úlceras esofágicas, gástricas o intestinales, únicas o múltiples, causando diarrea, hemorragia y perforación intestinal. La frecuencia de afectación gastrointestinal varía en función de la población estudiadas, pero generalmente es de 50 a 60% (2).

Manifestaciones genitourinarias

La incidencia de epididimitis es de 4-11%. Se han descrito casos aislados de amiloidosis, nefropatía por IgA, trombosis de vena renal y glomerulonefritis segmentaria y focal (2; 8).

I.1.e. PRONÓSTICO Y MORBIMORTALIDAD

Los factores pronósticos más importantes en la EB son la afectación ocular y de SNC. Las causas principales de mortalidad son la afectación cardiovascular, pulmonar y gastrointestinal (47). En diferentes series, el sexo masculino ha presentado mayor prevalencia de afectación ocular, pulmonar, de SNC, TVP, tromboflebitis y test de patergia positivo, por lo que es de esperar que los pacientes varones tengan un curso más grave de la enfermedad (48).

I.2. HEMOSTASIA

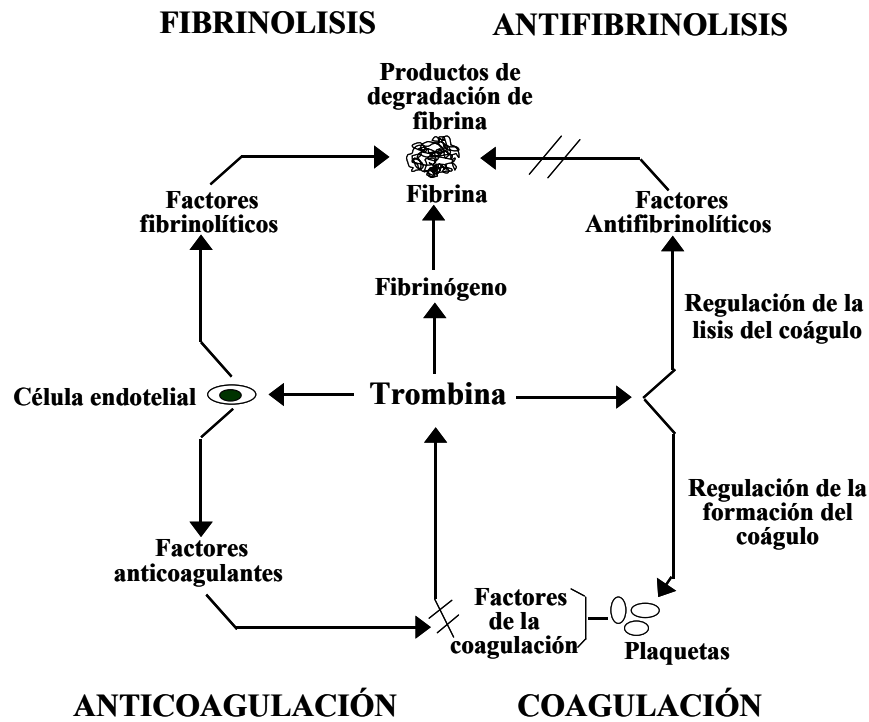
I.2.a. GENERALIDADES

La hemostasia es el conjunto de mecanismos y procesos que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. De esta forma, se asegura que las células de los tejidos dispongan ininterrumpidamente de oxígeno y nutrientes, a la vez que puedan liberarse de los productos de desecho metabólicos. Así, el mantenimiento de un flujo constante de sangre es de vital importancia. Obviamente, asimismo son de vital importancia los precisos mecanismos implicados en la reparación de un eventual daño vascular de forma que, finalmente, se restaure el flujo sanguíneo.

En los mecanismos responsables del mantenimiento de la fluidez sanguínea y de la reparación del daño vascular intervienen células (tanto de la pared vascular como células sanguíneas) y proteínas (con o sin actividad enzimática). Alteraciones de la biología celular o molecular de estos mecanismos resultan en estados de hipocoagulabilidad (que se manifiestan como cuadros hemorrágicos) o de hipercoagulabilidad (trombosis localizadas o generalizadas en el sistema vascular).

Cuando un vaso sanguíneo se daña, se ponen en marcha los mecanismos hemostáticos que se pueden agrupar en cuatro fases: la primera es la contracción de la pared del vaso, la segunda es la adhesión de las plaquetas a la zona de la pared dañada y la agregación de las mismas entre sí, la tercera es la formación y consolidación del coágulo de fibrina, y la cuarta es la eliminación del coágulo. Las dos primeras fases forman la llamada hemostasia primaria, y las otras dos, la hemostasia secundaria. La hemostasia secundaria está integrada por cuatro sistemas (Figura 1). La coagulación y la anticoagulación controlan la formación del coágulo, mientras que la fibrinólisis y la antifibrinólisis controlan su eliminación.

Figura 1: Sistema hemostático



La pared del vaso sanguíneo consta de tres capas histológicas: la capa íntima, que es la más interna, la capa media y la adventicia. La capa íntima está formada por una única capa de células endoteliales que están en contacto con la sangre circulante, y que juegan un papel fundamental en la hemostasia. El primer suceso que ocurre cuando se produce una discontinuidad en la capa de células endoteliales que recubre el sistema vascular, es el taponamiento de dicha discontinuidad por agregados de plaquetas. La rotura del endotelio produce la activación de las plaquetas, que se adhieren a la superficie del subendotelio y entre sí. En este proceso intervienen el fibrinógeno (Fbg) y el factor von Willebrand (F vW), así como receptores de la superficie plaquetar (glicoproteínas Ib y IIb/IIIa) que interaccionan con componentes subendoteliales, colágeno y fibronectina. Así, las plaquetas agregan entre sí formando un tapón hemostático primario. Concomitantemente, se produce la liberación del contenido de los gránulos densos (adenosín trifosfato (ATP),

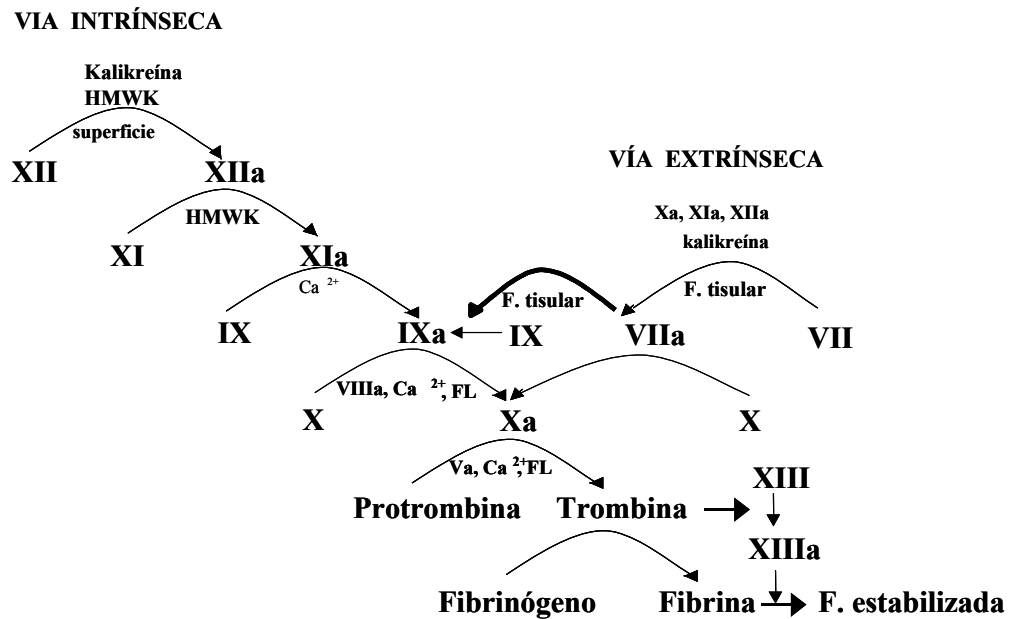
adenosín difosfato (ADP), iones calcio (Ca^{2+}), serotonina), necesarios para la agregación plaquetar y la vasoconstricción, y de los gránulos α plaquetares (Fbg, F vW, factor plaquetar 4, tromboxano, etc.), iniciándose la cascada de la coagulación o hemostasia secundaria.

I.2.b. LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA

El siguiente suceso que acontece tras un daño vascular es el desencadenamiento de la coagulación, una compleja cascada enzimática cuyo resultado final es una red tridimensional de polímeros insolubles de fibrina, que es responsable de la estabilización del coágulo hemostático. Concomitantemente a la activación de la coagulación, se inicia el sistema anticoagulante de la proteína C (PC), un sistema regulador que, junto a la antitrombina (AT) y el cofactor II de la heparina (CH II), confina el coágulo al sitio donde se produjo el daño vascular y previene la diseminación del proceso de coagulación en la circulación. Finalmente, mientras que se repara la pared vascular y la capa endotelial, la fibrinólisis entra en acción, disolviendo el coágulo, recanalizando el vaso y restaurando el flujo sanguíneo.

La coagulación sanguínea es el proceso por el cual la activación de una serie de precursores enzimáticos produce la transformación del Fbg en fibrina. Dichos precursores, denominados factores de la coagulación, circulan como proenzimas inactivos, y se activan secuencialmente unos a otros, culminando en la generación de trombina y en la consiguiente formación del coágulo de fibrina. Dichas secuencia se ilustra en la Figura 2.

Figura 2: La cascada de la coagulación sanguínea



La vía extrínseca de la coagulación

Las células endoteliales intactas de las paredes de los vasos impiden el desencadenamiento de procesos trombogénicos mediante varios mecanismos: la síntesis continua de prostaciclina, que inhibe la agregación plaquetar, la expresión de glicosaminoglicanos, que unen y potencian a la AT, y la expresión en su superficie de complejos trombina-trombomodulina, que pueden activar el sistema anticoagulante de la PC. Es así como se evita que se formen coágulos sanguíneos en el interior de los vasos intactos. Por contra, cuando el endotelio es estimulado por citoquinas como el factor de necrosis tumoral o la IL-1, se convierte en una superficie de alto poder trombogénico. Las células endoteliales estimuladas expresan en su superficie el factor tisular (FT), que forma complejos con el factor VII (F VII). El complejo FT-F VII cataliza lentamente la activación del factor X (F X), y el F X activado, a su vez, acelera el proceso de activación del F VII. Aunque no se conoce exactamente cuál es el primer evento catalítico de la vía extrínseca, se acepta

que un estímulo principal para la iniciación de la coagulación *in vivo* es la exposición de la sangre a tejidos dañados que expresan el FT. Este proceso de desencadenamiento de la coagulación es lo que se ha denominado como la vía extrínseca de la coagulación.

La vía intrínseca de la coagulación

Clásicamente se ha distinguido otra vía de la coagulación, la vía intrínseca o fase de contacto de la coagulación, que es responsable de la coagulación de la sangre *in vitro*. Los mejores activadores *in vitro* de la coagulación son sustancias como el vidrio, el kaolín o el sulfato de dextrano, todas ellas cargadas negativamente. Otras sustancias que la activan son el colágeno, las plaquetas activadas y determinados ácidos grasos. Al iniciarse la vía intrínseca, se activan el factor XII (F XII), la prekalikreína (PKK) y el factor XI (F XI). Además, el contacto con la superficie, probablemente plaquetar, produce un cambio conformacional del F XII que lo hace más susceptible de sufrir una rotura proteolítica, promoviéndose su interacción con la PKK y el F XI. Así, se ha propuesto que la autoactivación del F XII es la primera actividad catalítica de la vía intrínseca (49), que se continúa con la activación recíproca de la PKK y, por tanto, la consiguiente aparición de más F XII activado (50). La cascada de activaciones continuaría entonces, formándose en última instancia factor IX (F IX) activado. Es de interés reseñar que la activación de la fase de contacto de la coagulación puede iniciar el proceso de la fibrinólisis.

La vía común de la coagulación

Independientemente de que la coagulación haya sido iniciada por la vía intrínseca o extrínseca, la cascada enzimática converge en una vía común con la activación del F X por el F IX activado, generado por cualquiera de las dos vías. El F X activado cataliza la formación de trombina a partir de protrombina. La trombina convierte al Fbg en fibrina, controlando así la

formación del coágulo. Todo el proceso hemostático está controlado por la trombina (51). En efecto, la trombina modifica las plaquetas para acelerar la coagulación, y las células endoteliales para inhibirla. La trombina activa al factor XIII, que estabiliza a la fibrina, haciéndola resistente a su disolución. Así, la respuesta del sistema hemostático (formación y disolución del coágulo) es dependiente de la concentración de trombina y de la normalidad de las cuatro dianas sobre las que actúa la trombina (plaquetas, células endoteliales, Fbg y factor XIII). Por otra parte, la trombina regula la cascada de la coagulación a través de la activación del sistema anticoagulante de la PC.

El mecanismo de anticoagulación

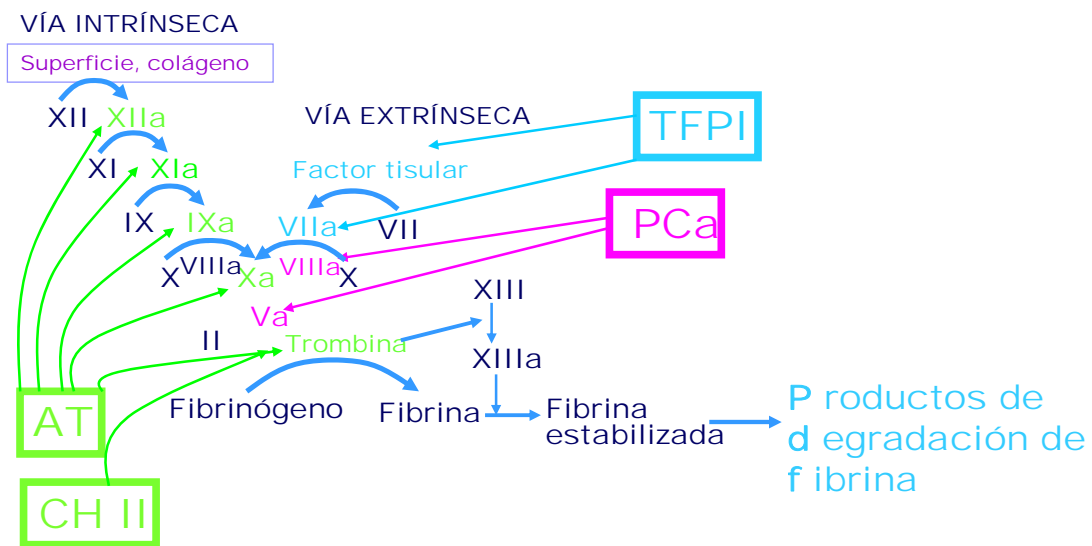
La coagulación sanguínea precisa de un mecanismo de regulación que evite la extensión incontrolada del coágulo formado. El requerimiento de una superficie adecuada limita considerablemente la propagación del trombo más allá del lugar del daño vascular, al restringir las reacciones enzimáticas a dicho lugar. Otro mecanismo de control es la fibrinólisis, que actúa desde un primer momento limitando el crecimiento del trombo. Adicionalmente, el mecanismo de la anticoagulación está destinado a inhibir a los factores activadores de la coagulación, controlando así la formación del coágulo de fibrina.

El mecanismo de anticoagulación está formado por dos sistemas (Figura 3): el sistema de inhibidores de proteasas y el sistema de la PC, que se describirá con detalle más adelante. Los inhibidores de proteasas son la AT, el CH II, el inhibidor de la vía del factor tisular 1 (TFPI-1), la α -2 macroglobulina, la α_1 antitripsina (α_1 AT) y el C1-inhibidor (52). El sistema de la PC está formado por la PC, la proteína S (PS), la trombomodulina (TM), el receptor endotelial de la PC (EPCR), el inhibidor de la PC activada (PCI), y la proteína de unión al componente 4b del complemento (C4b-BP). La AT, el CH II, la α_1 AT, el C1-inhibidor y el PCI pertenecen al grupo de las serpinas (*serin protease inhibitor*), que actúan como falsos sustratos de los enzimas tipo serina a los que inhiben (53). La AT es el principal regulador de la generación de

trombina, inhibiendo a los factores XII activado, XI activado, kalikreína, IX activado, X activado y trombina (54). El CH II inhibe a la trombina (55). El TFPI-1 inhibe al F X activado y al complejo FT-F VII (56). La α_2 -macroglobulina inactiva a la mayor parte de los factores de la coagulación y fibrinolisis activados. El C1-inhibidor, un componente del sistema del complemento, es un inhibidor de los factores XII activado, XI activado y kalikreína. La α_1 AT inhibe al F XI activado, a la plasmina y a la PC activada (PCa).

Figura 3: Inhibidores de la coagulación. Los enzimas y cofactores activados generados durante el proceso de la coagulación son regulados por una serie de inhibidores. La AT inhibe a la mayoría de los enzimas generados, mientras que el CH II inhibe a la trombina. El sistema de la PC inhibe a los F Va y F VIIIa, y el TFPI inhibe al complejo formado entre el FT y el factor VII

INHIBIDORES DE LA COAGULACIÓN



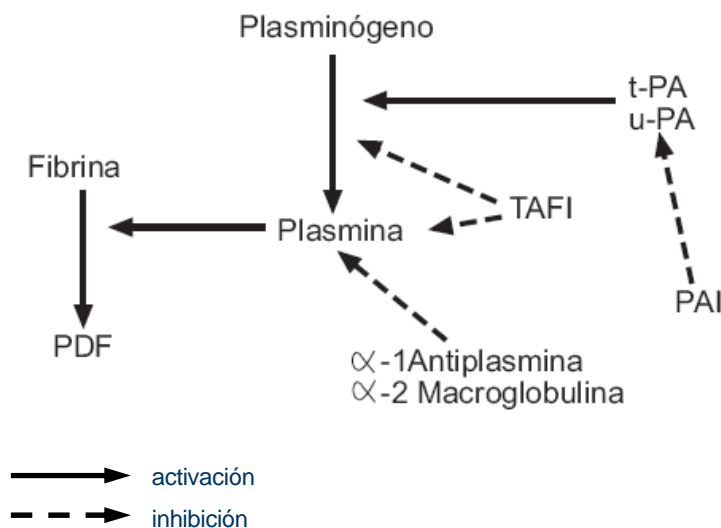
I.2.c. LA FIBRINOLISIS

Los coágulos no son permanentes. La formación del coágulo va seguida del inicio de los procesos de reparación del vaso, estimulados por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, y de la fibrinólisis, que es el conjunto de mecanismos encargados de la degradación del coágulo de fibrina. La fibrinólisis comienza con la localización simultánea en el coágulo de fibrina de activador tisular del plasminógeno (t-PA), plasminógeno, α_2 -antiplasmina (α_2 AP) y trombina. El t-PA, producido por las células endoteliales, cataliza el paso de plasminógeno a plasmina. La plasmina degrada a la fibrina convirtiéndola en fragmentos de degradación (PDFs). El exceso de plasmina se inactiva por acción de la α_2 AP. Los procesos que desencadenan la fibrinólisis no están claramente establecidos. El t-PA es sintetizado y liberado a la circulación por las células endoteliales de forma permanente y/o ante diversos estímulos fisiológicos (ejercicio, estasis, etc.). Además, las células endoteliales que exhiben la trombina unida a la TM, una proteína integral de membrana, son estimuladas en la producción de t-PA (51), por lo que la trombina podría señalar el desencadenamiento de la fibrinólisis. El activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA) es otro enzima que cataliza el paso de plasminógeno a plasmina.

Existen varios inhibidores de la fibrinólisis que mantienen el sistema en equilibrio, como se observa en la Figura 4. Los inhibidores del activador del plasminógeno (PAIs) se unen al t-PA o a la u-PA, inactivándolos y frenando de esta manera la fibrinólisis. Estos inhibidores son el PAI-1, también llamado inhibidor de los activadores del plasminógeno de tipo endotelial, el PAI-2, inhibidor de los activadores del plasminógeno placentario, del que sólo se detectan niveles plasmáticos significativos en mujeres gestantes (57), y el PAI-3, que más tarde se identificó como el PCI (58), con mayor concentración plasmática pero menor actividad antifibrinolítica (59). El principal inhibidor de la fibrinólisis *in vivo* es el PAI-1. Recientemente, se ha descrito otro mecanismo que actúa inhibiendo el paso de plasminógeno a plasmina: la vía del inhibidor de

la fibrinólisis activable por trombina (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*, TAFI) (60). El TAFI activado elimina los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en los PDFs, evitando así el anclaje de t-PA y plasminógeno sobre los mismos. Otros inhibidores de la fibrinólisis actúan inhibiendo la actividad proteolítica de la plasmina: la α_2 AP y la α_2 -macroglobulina.

Figura 4: La vía de la fibrinólisis



Para una correcta hemostasia, es esencial el equilibrio entre factores activadores e inhibidores de la fibrinólisis. Cuando se forma un coágulo, la unión simultánea del t-PA y el plasminógeno a la fibrina facilita su conversión a plasmina, que lisa el coágulo de fibrina. El exceso de t-PA que se libera al plasma es inactivado rápidamente por el PAI-1 liberado por las plaquetas y el endotelio tras el daño vascular, de la misma forma que el exceso de plasmina es degradado por la α_2 AP. De esta manera, la fibrinólisis activa queda confinada al coágulo de fibrina.

I.2.d. EL SISTEMA DE LA PROTEINA C

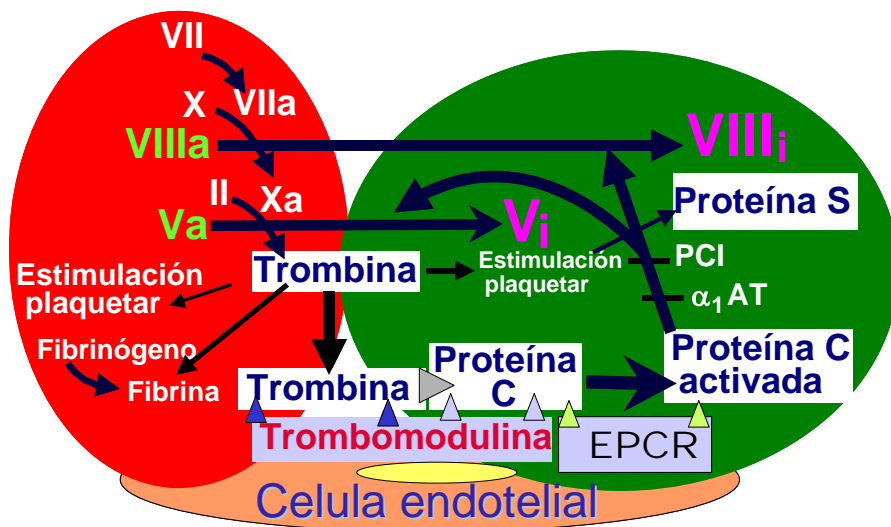
El sistema de la proteína C

El sistema de la PC es una ruta enzimática que regula la generación de trombina en el torrente sanguíneo. El sistema es iniciado por la propia trombina (61). Una vez activada, la PCa inactiva a los factores V activado (F Va) y VIII activado (F VIIIa), disminuyendo drásticamente la generación de trombina (62). Las alteraciones cualitativas o cuantitativas de los componentes del sistema de la PC dan lugar a un aumento significativo del riesgo de trombosis, siendo responsables de casi la mitad de las causas conocidas de trombofilia.

El sistema de la PC, a diferencia de otros mecanismos anticoagulantes, es capaz de amplificar la respuesta anticoagulante conforme aumentan los mecanismos procoagulantes. La PC circula en sangre en forma de zimógeno inactivo, debiendo ser activada para poder ejercer su acción anticoagulante (62). Dicha activación tiene lugar sobre la superficie de la célula endotelial (Figura 5). Parte de la trombina generada durante el proceso de la coagulación se une a su receptor específico en la superficie de la célula endotelial, la TM. Una vez unida a la TM, la trombina pierde su capacidad procoagulante y se convierte en un potente anticoagulante, al activar rápidamente a la PC. Otro receptor en la membrana de la célula endotelial, el EPCR, aumenta la velocidad de activación de la PC por el complejo trombina-TM (63). El perfecto ensamblaje de estas cuatro proteínas es esencial para la correcta activación de la PC. Una vez activada, el enzima resultante, la PCa, debe dissociarse de su receptor para poder ejercer su acción anticoagulante, a lo que contribuye la PS, que además facilita el acoplamiento de la PCa en las superficies fosfolipídicas donde están teniendo lugar las reacciones de coagulación. Allí, la PCa es capaz de degradar, de forma selectiva, a los cofactores de la coagulación F Va y F VIIIa (64), reduciendo drásticamente la formación de trombina y, por tanto, el proceso de la coagulación. Por

consiguiente, para que el sistema de la PC pueda ejercer su acción anticoagulante, se deben ensamblar perfectamente las moléculas de PC, trombina, TM y EPCR sobre la superficie de la célula endotelial. Cualquier modificación en alguno de estos componentes puede alterar el proceso normal de anticoagulación.

Figura 5: El sistema de la proteína C



La vida media de la PCa es inusualmente larga, de alrededor de 10 minutos (65). Sus principales inhibidores son el PCI, la α_1 AT y la α_2 -macroglobulina (65-67). La lenta inactivación de la PCa le permite desplazarse con el flujo sanguíneo hasta localizar a los complejos de la coagulación sobre las superficies celulares fosfolípídicas procoagulantes, donde los inactiva y controla de esta manera la propagación de la coagulación.

La TM se encuentra distribuida uniformemente en la superficie de la célula endotelial de todos los vasos, con unas 100.000 moléculas/célula endotelial, excepto en la microcirculación cerebral, donde la concentración es más baja. Cuando el diámetro del vaso se estrecha, el área de la superficie

vascular expuesta a la sangre circulante aumenta exponencialmente desde menos de 3 a más de 3000 cm²/mL de sangre. Por lo tanto, la concentración relativa de TM disminuye en los grandes vasos. Esto resultaría en una deficiente activación de la PC en los grandes vasos, sobre todo teniendo en cuenta que la afinidad entre la TM y la PC es débil. Por el contrario, el EPCR se localiza principalmente en el endotelio de las arterias y venas de los grandes vasos y tiene una alta afinidad por la PC. Ello permite una efectiva localización de la PC sobre estas superficies y asegura una activación eficaz de la PC sobre la superficie de los grandes vasos.

Alteraciones del sistema de la proteína C

La importancia del sistema de la PC como un potente mecanismo anticoagulante natural se manifestó tras la descripción de deficiencias familiares de PC o PS asociadas con un aumento del riesgo de trombosis (68) y de recién nacidos con deficiencia homocigota de PC, que presentaban trombosis masivas mortales si no se trataban inmediatamente con infusión de plasma fresco. Una revisión de los principales mecanismos fisiopatológicos que subyacen bajo ciertos estados de hipercoagulabilidad hereditaria o adquirida revela que una alteración del sistema de la PC es la causa de la mayoría de estos estados, lo cual pone de relieve la importancia de la PC como una vía anticoagulante natural para la prevención de la enfermedad trombótica.

Una alteración de cualquiera de los componentes del sistema de la PC esenciales para su activación, puede dar lugar a un bajo nivel circulante de PCa y a un mayor riesgo trombótico (69). Así, además de las bien caracterizadas deficiencias de PC y PS, los niveles reducidos de PCa (70) también pueden ser debidos a mutaciones en el gen de la TM (71) o del EPCR (72), situaciones que se han asociado a un aumento del riesgo de trombosis (73-76). Por otra parte, una disfunción endotelial puede producir una reducción de los niveles de TM y EPCR en la membrana de la célula endotelial (77), con la consiguiente reducción de la activación de la PC. La inflamación es una de las condiciones

clínicas que alteran la función endotelial y reducen la expresión de la TM y el EPCR. Se ha descrito una disminución de PCa circulante y un aumento del riesgo de trombosis en pacientes con disfunción endotelial asociada a fiebre botonosa mediterránea o a insuficiencia renal crónica (78).

En condiciones basales, existe un nivel detectable de PCa circulante, como consecuencia de la continua activación de la coagulación, como lo prueba la detección de complejos PCa:PCI y PCa: α_1 AT in vivo (65; 79). Se ha descrito que niveles reducidos de PCa circulante pueden ser un factor de riesgo de trombosis venosa (80) y de infarto de miocardio (81).

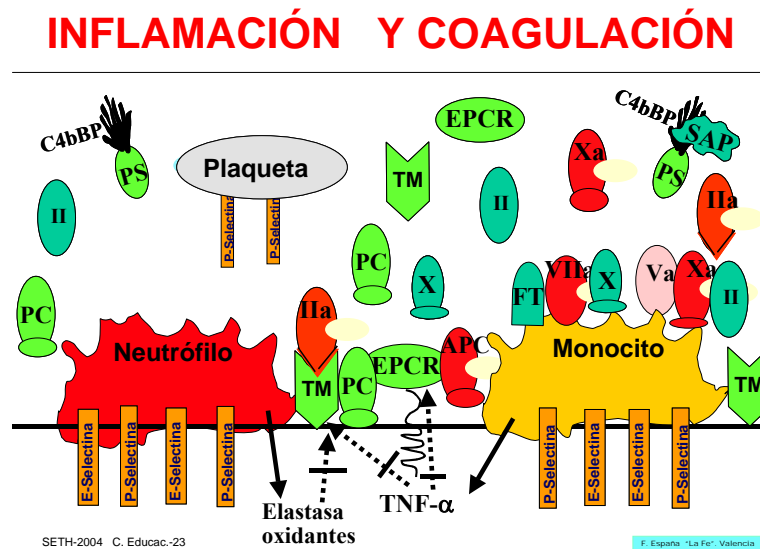
Uno de los principales factores genéticos de riesgo trombótico es la presencia de la mutación factor V Leiden (F V Leiden) (82), consistente en una mutación puntual en el gen del factor V de la coagulación en el que una guanina en posición 1691 está sustituida por una adenina. La mutación da lugar a un cambio en un aminoácido de la secuencia del factor V (Arg506-Gln), y está presente en el 1-5% de la población general. El F Va es esencial para acelerar la coagulación, al actuar como cofactor del F X activado en la activación de la protrombina. La mutación F V Leiden puede considerarse una alteración del sistema de la PC. El papel de la PC, como se ha detallado previamente, es el de regular la coagulación inactivando a F Va y F VIIIa. La PCa destruye la actividad del F Va cortando por los enlaces Arg306, Arg506 y Arg679, y de esta forma controla la velocidad y extensión de la coagulación. El corte por Arg506 acelera el corte de las otras dos argininas. Cuando la Arg506 está sustituida por el glutámico, como ocurre en la mutación F V Leiden, la PCa no puede cortar este enlace, y la velocidad de rotura de las otras dos argininas se reduce, por lo que la inactivación del F Va es mucho más lenta, y la coagulación no puede regularse en este punto, existiendo, por tanto, una mayor tendencia a la trombosis en los individuos con esta anomalía genética. Esta situación se denomina resistencia a la PCa (R-PCa). Alrededor de un 25% de pacientes con TVP confirmada tienen como único defecto detectado una mutación F V Leiden o una deficiencia de PC o PS.

Inflamación y vía de la proteína C

En condiciones fisiológicas, el árbol vascular proporciona una potente actividad anticoagulante, mientras que la actividad procoagulante es mínima. Sin embargo, la inflamación altera este balance, reduciendo la actividad anticoagulante e incrementando la estimulación de reacciones procoagulantes. Un claro ejemplo es el shock séptico inducido por infección con gram-negativos. La infección provoca una reducción de los mecanismos anticoagulantes, al reducir el número de moléculas de TM y EPCR sobre el endotelio y aumentar los mecanismos procoagulantes, de tal forma que el proceso de coagulación se desarrolla de manera generalizada e incontrolada, con consumo del Fbg, proceso denominado coagulación intravascular diseminada. La Figura 6 muestra un modelo de los procesos modulados por la inflamación, con especial énfasis en el sistema de la PC (83).

La inflamación induce la unión de neutrófilos y monocitos al endotelio, vía receptores de adhesión inducibles, incluyendo las selectinas. Los monocitos expresan FT y unen F VII activado para iniciar la coagulación. Las plaquetas activadas pueden unirse a neutrófilos adherentes vía selectinas, proporcionando una superficie adecuada sobre la cual puede propagarse la coagulación. Los monocitos activados liberan citoquinas que inhiben la síntesis de TM. La TM de la pared del vaso puede ser degradada por los neutrófilos, aumentando el nivel de TM soluble, con menor actividad anticoagulante. La inflamación reduce el nivel de PS en la circulación, y la mayor parte de ésta se encuentra unida al C4b-BP, sin actividad anticoagulante.

Figura 6: Influencia de la inflamación sobre la coagulación y el sistema de la proteína C. Modificada de Esmon y cols, 1995 (83).



I.2.e. EL ENDOTELIO

El endotelio vascular juega un papel activo en el mantenimiento del equilibrio hemostático, trabajando conjuntamente con las plaquetas, las proteínas de la cascada de la coagulación y el sistema fibrinolítico. Las células endoteliales inhiben la formación de coágulos sintetizando y segregando TM, heparina sulfato y TFPI; modulan la fibrinólisis sintetizando y segregando t-PA, u-PA y PAIs, inhiben la agregación plaquetaria liberando ADP, prostaciclina (PGI_2) y óxido nítrico (ON), y regulan el tono vascular sintetizando endotelinas vasoconstrictoras y prostaciclina vasodilatadoras (84).

I.3. TROMBOFILIA

I.3.a. CONCEPTO, PREVALENCIA Y TIPOS

La trombofilia es una tendencia al tromboembolismo venoso (TEV), causada por la presencia de factores ambientales, adquiridos o hereditarios. Se aplica este término solamente a un subgrupo de pacientes con trombosis atípica, presentando alguna de las siguientes características: edad temprana del evento, recurrencia frecuente, historia familiar consistente, localizaciones inusuales o amplias, y desproporción entre la gravedad y el factor de riesgo. En la mayoría de pacientes, los eventos trombóticos son episódicos, separados por largos períodos asintomáticos, lo que sugiere la existencia de algún factor desencadenante para cada evento.

El término trombofilia hereditaria reconoce la presencia de un factor hereditario que por sí solo predispone al TEV, pero que frecuentemente requiere la interacción con otros componentes, hereditarios o adquiridos, para que ocurra el evento. Se puede definir la trombofilia hereditaria como una tendencia al TEV genéticamente determinada. Las anormalidades dominantes o las combinaciones de defectos menos graves pueden dar lugar a una clínica aparente desde una edad temprana o a una recurrencia frecuente.

La Tabla 2 resume los factores genéticos que pueden predisponer a la trombofilia. Generalmente, la trombosis venosa se debe a la interacción entre factores genéticos y adquiridos. Entre estos últimos, se encuentran la edad avanzada, la inmovilización, la cirugía mayor, ortopédica o neurocirugía, el embarazo y el puerperio, el uso de hormonas conteniendo estrógenos, las neoplasias, el síndrome antifosfolipídico, y la R-PCa adquirida (85).

Tabla 2: Causas de trombofilia hereditaria

Hereditarias	Adquiridas / hereditarias *	Posiblemente hereditarias **
Deficiencia de AT	Hiperhomocisteinemia	Deficiencia de plasminógeno
FV Leiden	Factor VIII aumentado	Deficiencia de CH II
C677T MTHFR **	Hiperfibrinogenemia	Deficiencia de t-PA
Deficiencia de PC		Aumento de PAI-1
PG20210A		
Deficiencia de PS		
Disfibrinogenemia		

*Se desconoce la contribución relativa precisa.

**No hay firme evidencia de que estas condiciones estén asociadas a trombofilia hereditaria.

La Tabla 3 muestra el riesgo de TEV asociado a los diferentes defectos trombofílicos congénitos.

Tabla 3: Defectos trombofílicos congénitos. Prevalencia y riesgo de tromboembolismo venoso

Defecto trombofílico	Prevalencia en controles	Prevalencia en TEV	Odds Ratio
Sin defecto			1
Deficiencia de AT	0,01-0,02%	0,5-1%	20-50
Deficiencia PC	0,2-0,3%	2-5%	7-10
Deficiencia PS		3%	2-10
FV Leiden	3-7%	8-20%	3-8
PG20210A	2-4%	6-9%	2,5-4

I.3.b. TROMBOFILIAS HEREDITARIAS

Déficit de antitrombina

En nuestro medio se ha calculado una prevalencia de esta alteración de 0,5-1% de los pacientes con fenómenos trombóticos. La AT inhibe a la mayoría de los factores de la coagulación activados. Las manifestaciones trombóticas venosas en pacientes con déficit de AT son similares a las que ocurren en el déficit de PC o PS; sin embargo, parece que los episodios de tromboflebitis ocurren más raramente. Se han descrito varias mutaciones asociadas con el déficit de AT. El déficit de tipo I se asocia a bajos niveles plasmáticos de AT, mientras que el déficit de tipo II es un defecto funcional que reduce la actividad anticoagulante de la AT, manteniéndose normales sus niveles antigénicos. Se asocia a cuadros trombóticos más precoces y graves que los déficits de PC y PS, salvo las formas en que existe un defecto funcional. La presencia del déficit de AT incrementa hasta 50 veces el riesgo de padecer trombosis. Las mujeres con déficit de AT parecen tener un especial riesgo de desarrollar fenómenos trombóticos durante el embarazo.

Déficit de proteína C

El déficit heterocigoto de PC incrementa el riesgo de trombosis, sin que exista diferencia en la frecuencia de trombosis en función del tipo de déficit. Al igual que para la AT, el déficit de tipo I cursa con bajos niveles en plasma, y el de tipo II es un defecto funcional con niveles antigénicos normales. Los miembros de una familia con déficit de PC presentan entre 8 y 10 veces mayor riesgo de padecer trombosis venosa, y el 50% habrá padecido al menos un episodio trombótico a la edad de 40 años (86). En estas familias, gran parte de los eventos trombóticos se desarrollan sin la presencia de un factor desencadenante (87). El riesgo relativo para el desarrollo de trombosis en pacientes obtenidos de la población general con déficit de PC es similar al de las familias con dicha alteración (88). La prevalencia de déficit de PC en

pacientes con trombosis es del 3%, mientras que en la población general, la prevalencia es de 0,2% (89).

Déficit de proteína S

La PS circula en plasma en dos formas. Un 40% lo hace en la forma libre, con actividad anticoagulante, mientras que un 60% lo hace en forma de complejo con el C4b-BP, un componente del sistema del complemento, sin actividad anticoagulante. El déficit de PS consiste en un trastorno de herencia autonómica dominante con tres subtipos de presentación en heterocigotos, definidos en función de la concentración de PS total (la suma de PS libre y PS unida al C4b-BP), la de PS libre, y la actividad de la PS como cofactor de la PC. El tipo I tiene niveles bajos de PS total y libre, estando también reducida su actividad como cofactor de la PCa. El tipo II tiene niveles normales de PS total y libre, estando reducida su actividad como cofactor de la PCa. En el tipo III, los niveles de PS total son normales, pero tanto los de PS libre como los de la actividad de cofactor de la PCa están reducidos, estando así reducida su actividad. Los individuos con deficiencia de PS tienen 8,5 veces más riesgo de desarrollar trombosis venosa que los individuos sin esta deficiencia (68). En nuestro medio, se ha calculado una prevalencia de déficit de proteína S en pacientes con trombosis venosa del 7,3%. Los individuos homocigotos padecen púrpura neonatal fulminante. Su papel como factor de riesgo para enfermedad cerebrovascular arterial no está claro.

Resistencia a la proteína C activada

El F V Leiden (Q506 o Arg506Gln) se origina por la sustitución de arginina por glutamina en la posición 506 del factor V de la coagulación, debido a una mutación en el nucleótido 1691 del gen que lo codifica. El F Va mutado es resistente a la degradación por la PCa. Ello condiciona un acúmulo de F Va y un aumento en la producción de trombina, y finalmente un estado de

hipercoagulabilidad. Otras mutaciones conocidas del factor V, como el factor V Cambridge (cambio en el aminoácido arginina 306 por treonina) o el factor V Hong Kong (cambio en el aminoácido arginina 306 por glicina), no parecen conferir R-PCa.

La prevalencia de individuos heterocigotos para el F V Leiden en la población europea oscila entre 5 y 8%, constituyendo la causa más frecuente de trombofilia hereditaria. Sólo el 1% de pacientes con F V Leiden son homocigotos (90). En España, la prevalencia en población general es de 3-4% (91; 92).

Entre 10 y 20% de los pacientes con un primer episodio de TVP o tromboembolismo pulmonar (TEP) presentan F V Leiden. El riesgo relativo para TVP es de 7 en individuos heterocigotos y hasta de 80 en homocigotos para el F V Leiden (93). Aún así, la probabilidad de desarrollar fenómenos trombóticos y su gravedad es menor que en pacientes con otras causas menos frecuentes de trombofilia hereditaria.

Se ha objetivado una mayor prevalencia de F V Leiden en pacientes con TVP que tienen otros defectos trombofílicos hereditarios tales como deficiencia de PC, de PS, de AT, mutación del gen de la protrombina, niveles elevados de factor VIII u homocigosidad para la mutación del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) (94).

Además, el riesgo de TVP se incrementa con el uso de anticonceptivos orales hasta 30 veces respecto al de la población general, especialmente con anticonceptivos de tercera generación, al inducir éstos una R-PCa comparable a la propia resistencia causada por el defecto genético, resultando una R-PCa final semejante a la de mujeres homocigotas para el F V Leiden (95). En las mujeres portadoras de la mutación y consumidoras de anticonceptivos orales, existe asimismo un mayor riesgo de trombosis venosa cerebral (96). El riesgo de TVP también es mayor en mujeres embarazadas portadoras de F V Leiden (97), especialmente cuando la mutación se asocia con complicaciones obstétricas (98). Por el contrario, no se ha demostrado que el F V Leiden

confiera un mayor riesgo de TVP tras cirugía traumatológica (99), o en procesos neoplásicos (100). Sin embargo, el riesgo de desarrollar TVP se incrementa en portadores de catéter venoso central con F V Leiden (101). No se ha conseguido demostrar un mayor riesgo de trombosis arterial en los portadores de la mutación (102).

Mutación G20210A de la protrombina

La mutación G20210A de la región 3' no traducida del gen de la protrombina está asociada a un aumento de los niveles plasmáticos de protrombina. Esta mutación es la segunda causa más frecuente de estados hereditarios de hipercoagulabilidad. La prevalencia de dicha mutación tiene una importante variabilidad geográfica (103), siendo más prevalente en los países del sur de Europa que en los del norte, a la vez que es el factor de riesgo hereditario trombotico más prevalente en la población española (104; 105), con una prevalencia que oscila entre el 3,5 y el 5%. Los portadores heterocigotos tienen un aumento global del riesgo trombotico entre 2 y 3 veces, presentando mayor riesgo de TVP en extremidades (106), de trombosis venosa portal idiopática (107), de trombosis venosa cerebral, especialmente en usuarias de anticonceptivos orales (108), y de complicaciones obstétricas (109). Algunos autores han encontrado una asociación entre esta mutación y el riesgo de trombosis arterial, manifestado como enfermedad cerebrovascular (108) o como cardiopatía isquémica (110), aunque otros autores no han confirmado estos resultados (111).

Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa

Se ha demostrado que niveles elevados de homocisteína plasmática constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de TVP y de aterotrombosis (112-114). Los niveles plasmáticos de homocisteína están regulados, entre otros, por la enzima MTHFR (115), que transforma la homocisteína en

metionina. Una mutación de dicha enzima que se asocie con una disminución de su actividad puede producir un aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína. El genotipo TT del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR se asocia a niveles plasmáticos moderadamente elevados de homocisteína, y se considera la causa genética más frecuente de hiperhomocisteinemia (113). Los niveles plasmáticos elevados de homocisteína pueden ser debidos a otras causas, como déficits nutricionales de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina B6 (116).

La prevalencia en nuestro medio de la mutación del gen de la MTHFR es del 15% (117). La homocigosidad para el alelo T se ha considerado factor de riesgo para el desarrollo de TVP (118; 119), aunque no todos los autores han confirmado estos resultados (120).

Deficiencia del cofactor II de la heparina

El CH II es un inhibidor homólogo a la AT, pero con diferente especificidad. Requiere concentraciones de heparina más elevadas para su actividad, e inhibe a la trombina pero no al factor Xa ni al IXa. El dermatan sulfato, otro glicosaminoglicano, también acelera la inactivación de la trombina por el CH II, mientras que no tiene efecto sobre la AT.

Aunque se han descrito deficiencias de CH II asociadas a trombosis (121; 122), no está establecida dicha asociación. Así, un estudio familiar reveló la presencia de dos hermanas con deficiencia homocigota de CH II, además de otros doce familiares con deficiencia heterocigota (55). El único portador de la mutación que presentó TVP era homocigoto, pero además tenía una deficiencia heterocigota de AT. Ni su hermana heterocigota ni los demás familiares portadores tenían historia de TVP, sugiriendo que la deficiencia de CH II confiere un bajo riesgo de TVP, incluso en homocigotos, excepto cuando se asocia con otros factores trombofílicos (55; 123; 124).

Deficiencia de plasminógeno

Se han descrito deficiencias de plasminógeno de tipo familiar, asociadas con una tendencia trombótica. Existen dos formas de deficiencia de plasminógeno: la de tipo I, con disminuciones plasmáticas tanto del nivel de proteína como de su actividad, y la de tipo II, con reducción únicamente de la actividad funcional. Se trata de un defecto autosómico dominante de significado incierto como factor de riesgo para trombosis venosa (125).

Deficiencia de factor XII

El déficit de F XII se ha relacionado clásicamente con cardiopatía isquémica y con trombosis venosa (126), aunque no todos los estudios han podido comprobar dicha asociación (127).

I.3.c. TROMBOFILIAS ADQUIRIDAS

Hiperhomocisteinemia

La homocisteína es un aminoácido derivado de la metionina cuyo grupo sulfidrilo puede producir citotoxicidad endotelial, inhibición de la glutatión peroxidasa y ON, interferencia con los factores de la coagulación, y oxidación de la LDL (128). El piridoxal-5-fosfato, la forma activa de la vitamina B6, interviene en el metabolismo de la homocisteína. La vitamina B6 interviene también en la síntesis de ARNm y en la síntesis proteica, así como en la producción de ciertas citoquinas que se generan durante los procesos inflamatorios. Por tanto, en enfermedades autoinmunes que cursan con procesos inflamatorios, el aumento del consumo de vitamina B6 puede generar un déficit de la misma y secundariamente una hiperhomocisteinemia plasmática.

Como se ha indicado previamente, la hiperhomocisteinemia se considera actualmente un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria y para la trombosis arterial y venosa (112-114). El mecanismo mediante el cual la hiperhomocisteinemia causa un estado protrombótico no está totalmente establecido. Parecen estar involucrados varios procesos. La homocisteína puede dañar directamente el endotelio, aumentar el colesterol LDL, aumentar la agregación plaquetaria, alterar la regulación vasomotora e incrementar la interacción entre leucocitos y endotelio (128-130). Además, puede inhibir la síntesis de TM, que actúa como cofactor de la trombina en la activación de la PC (131), reduciendo su capacidad anticoagulante, así como inhibir la acción anticoagulante de la AT.

Anticuerpos antifosfolípido

El TEV es una complicación reconocida en diferentes enfermedades autoinmunes. La presencia de anticuerpos antifosfolípido (anticoagulante lúpico (AL) y anticuerpos anticardiolipina (AAC)) tipo IgG en título alto y medio se asocia a trombosis venosa y arterial, enfermedad neurológica, abortos espontáneos y trombocitopenia. El AL y los AAC son inmunológicamente diferentes, pero las manifestaciones clínicas asociadas con su presencia son muy similares. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos eleva 10 veces el riesgo de desarrollar fenómenos tromboticos venosos, y algunos estudios retrospectivos evidencian que el 31% de los pacientes con anticuerpos antifosfolípido desarrollan TVP (132). Se ha encontrado un aumento de los anticuerpos antifosfolípido en pacientes jóvenes con infarto de miocardio y con enfermedad cerebrovascular.

Aumento de la actividad funcional del factor VIII, IX, XI

Los niveles elevados de factor VIII se han descrito como factor de riesgo para el desarrollo de TEV (133-135), habiéndose encontrado un incremento mayor del riesgo a mayor concentración de dicho factor (136). Del

mismo modo, los niveles plasmáticos elevados de los factores IX y XI aumentan el riesgo de TEV (137; 138).

Aumento de los niveles de TAFI

El TAFI es una metaloprocariopeptidasa que puede ser activada fácilmente por la plasmina. Aunque la trombina es un débil activador del TAFI, la presencia de TM acelera extraordinariamente su activación, como ocurre con la activación de la PC. El TAFI activado es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina generados por la acción de la plasmina sobre la fibrina, y de esta manera elimina los anclajes de t-PA y plasminógeno sobre los mismos, impidiendo la estimulación de la actividad de cofactor de la fibrina y favoreciendo la inhibición de la plasmina por la α_2 AP. Diversos estudios han demostrado una amplia variación interindividual en la concentración plasmática de TAFI. Se ha descrito una asociación entre niveles elevados de TAFI y aumento del riesgo de trombosis (139).

Déficit de Anexina

Las anexinas constituyen una superfamilia de proteínas de similar estructura y caracterizadas por su capacidad de unión a los fosfolípidos (FL) en presencia de iones (140). Cada una de ellas tiene una función biológica diferente: la anexina A1 inhibe la inflamación. La anexina A2 funciona como receptor de t-PA y regula la formación de plasmina sobre la superficie celular. La anexina A5 se encuentra en muchos tejidos y también en sangre, y probablemente es liberada por la pared del vaso. Se une preferentemente a FL cargados negativamente, que son capaces de actuar como superficies catalíticas para los complejos de la coagulación. Por lo tanto, la anexina 5 es capaz de prevenir la formación de los complejos protrombinasa, actuando como un anticoagulante. Se ha demostrado que la deficiencia de anexina A5 se asocia con trombosis (141), mientras que el aumento de su concentración puede reducir el riesgo de infarto de miocardio en individuos jóvenes (142).

I.4. HEMORREOLOGIA

La Hemorreología estudia el comportamiento del flujo sanguíneo y la interacción de la sangre con la pared del vaso. El flujo sanguíneo depende no sólo de la acción bombeante del músculo cardíaco y de la resistencia al flujo impuesta por la geometría vascular, sino también de la resistencia al flujo debida a la composición de la sangre. El comportamiento del flujo sanguíneo depende de la viscosidad sanguínea (VS), de la viscosidad plasmática (VP), de la agregación eritrocitaria (AE), y de la deformabilidad eritrocitaria (DE). Las alteraciones hemorreológicas son causa de eventos trombóticos tanto del área venosa como arterial (143; 144). Así, un aumento de la VS, de la VP, de los niveles de Fbg, de la AE y de la rigidez de los hematíes pueden asociarse a eventos trombóticos.

I.4.a. VISCOSIDAD SANGUÍNEA

La sangre es un fluido no *newtoniano*, ya que su viscosidad varía con las condiciones del flujo. Esto se debe a las variaciones que la AE y DE experimentan con las distintas condiciones de cizallamiento de la sangre.

Los parámetros hemorreológicos que modulan la VS son la velocidad de cizallamiento (*shear rate*) y la fuerza de cizallamiento (*shear stress*). La velocidad de cizallamiento es la diferencia de velocidad entre dos capas adyacentes de un fluido en movimiento por unidad de distancia entre ambas. La fuerza de cizallamiento es la fuerza que actúa paralelamente a la superficie del vaso sobre cada unidad de área de flujo en movimiento. La VS es el cociente entre el *shear stress* y el *shear rate*.

A baja velocidad de cizallamiento sanguíneo, cuando las fuerzas que actúan sobre los hematíes son pequeñas, se produce un aumento de la VS. Por el contrario, a velocidad de cizallamiento elevada, los hematíes desagregan y

se deforman, cambiando su habitual forma discoidea por una forma oval que opone una resistencia mínima al flujo sanguíneo, disminuyendo por tanto la VS (145). Los *poquets* de las válvulas de venas y vénulas postcapilares, donde la velocidad de flujo sanguíneo es muy baja y la estasis máxima, son los lugares donde más probabilidad existe de que los hematíes agreguen, y es donde suele iniciarse la formación del trombo venoso (146).

La VS debe determinarse a 37°C, pues la temperatura influye sobre la misma. Puede valorarse a distintas velocidades de cizallamiento, que remedan las existentes en las diversas áreas del árbol vascular. Los factores que determinan la VS son el hematocrito, la VP, la DE y la AE. Se puede medir a hematocrito nativo y a hematocrito corregido de 45 %. La VS a hematocrito corregido refleja las posibles alteraciones en los otros parámetros que la modulan, siendo independiente del hematocrito (147), y permite comparar los resultados obtenidos entre laboratorios.

I.4.b. VISCOSIDAD PLASMÁTICA

La VP no varía con las condiciones del flujo sanguíneo dado que el plasma es un fluido *newtoniano*. La VP depende principalmente de las proteínas plasmáticas. Las proteínas que mayor efecto ejercen sobre la VP son las más asimétricas y de mayor peso molecular, como el Fbg, que ejerce un importante efecto sobre la VP. En condiciones normales, las globulinas y las lipoproteínas (LDL y VLDL) tienen un efecto menor que el Fbg sobre la VP. La albúmina influye muy poco en la VP, debido a su bajo peso molecular y a su relativa simetría. Por ello, en condiciones fisiológicas, la VP está fundamentalmente determinada por la concentración de Fbg y de colesterol LDL.

I.4.c. DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA

La DE es la capacidad que posee el hematíe para cambiar de forma cuando es sometido a una tensión de cizallamiento determinada. En condiciones de reposo, el hematíe tiene forma de discocito bicóncavo (Figura 7), resultante del equilibrio entre las fuerzas externas e internas que actúan sobre él (148). En áreas de la circulación donde las fuerzas de cizallamiento son muy altas, el hematíe adopta una forma oval, que opone una resistencia mínima al flujo (Figura 8) (148; 149). Si la capacidad del hematíe para deformarse está alterada, se enlentece el flujo sanguíneo en la macrocirculación, aumentando el tiempo de contacto de las células entre sí y con el endotelio. En la microcirculación, el hematíe tiene que sufrir deformaciones máximas, ya que su diámetro es de aproximadamente 8 μm y el de los capilares que atraviesa oscila entre 3 y 5 μm (Figura 9). Una disminución de la DE produce a nivel microcirculatorio una disminución del flujo capilar, favoreciendo los fenómenos trombóticos y la hipoperfusión tisular.

Figura 7: Imagen de hematíes en reposo

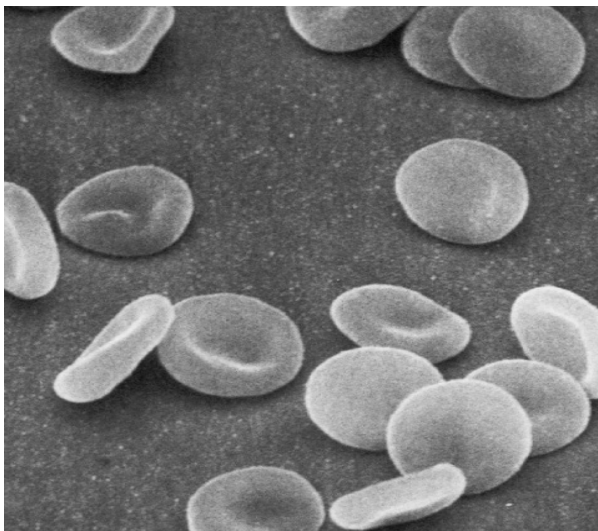


Figura 8: Deformabilidad eritrocitaria en la macrocirculación

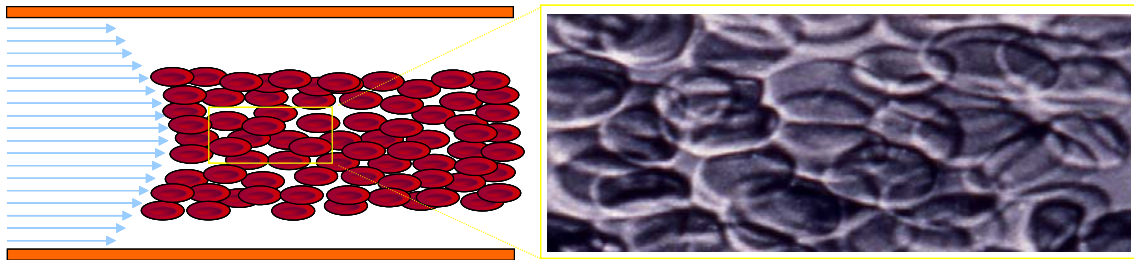
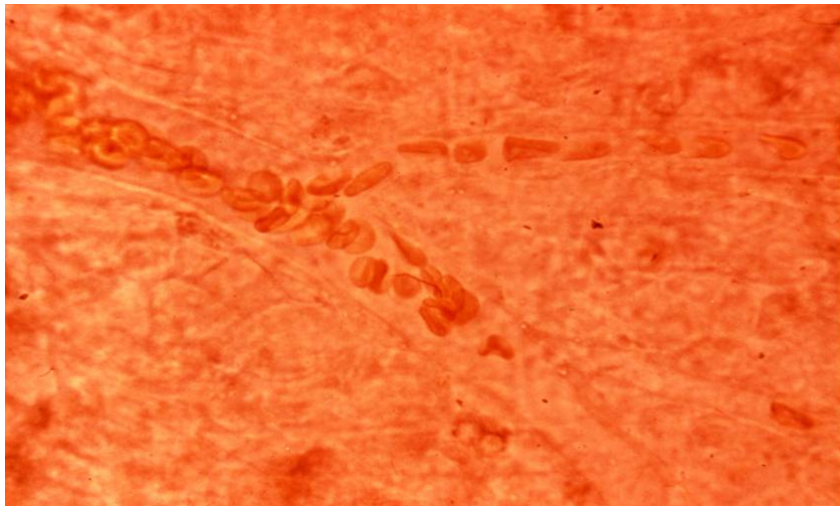


Figura 9: Deformabilidad eritrocitaria en la microcirculación



Además de la tensión de cizallamiento, la DE depende de la geometría celular (relación superficie-volumen), de la viscosidad citoplasmática, y de la viscoelasticidad de la membrana eritrocitaria. Las alteraciones de la relación superficie-volumen se acompañan de alteraciones en el volumen corpuscular medio (VCM) (150). La viscosidad citoplasmática depende de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y del estado físico-químico de la disolución de la hemoglobina. Cuando aumenta la CHCM por encima de 37 g/dL, la viscosidad de la solución de hemoglobina aumenta exponencialmente y se convierte en el factor determinante de la DE (151). Sin embargo, en condiciones normales, es la viscoelasticidad de la membrana eritrocitaria el principal factor determinante de la DE. La membrana eritrocitaria está compuesta por una doble capa de lípidos (FL y colesterol) y

por proteínas. La viscoelasticidad de la membrana puede modificarse por anomalías cualitativas o cuantitativas de las proteínas del citoesqueleto o de los lípidos que la componen.

I.4.d. AGREGACION ERITROCITARIA

La AE es el resultado del equilibrio entre las fuerzas de atracción y las fuerzas de repulsión existentes entre los hematíes. En condiciones normales, la membrana eritrocitaria mantiene una carga neta negativa, responsable de las fuerzas de repulsión entre los hematíes, que se debe fundamentalmente a la presencia en la membrana eritrocitaria de ácido siálico (152). En oposición, existe una atracción entre los hematíes dependiente de las fuerzas electrostáticas de Van Der Waal. Por otra parte, en los lugares de la circulación donde la velocidad del flujo es baja, como las venas, las proteínas plasmáticas forman puentes macromoleculares de unión entre los hematíes, formando los *rouleaux* eritrocitarios (153), como muestran las Figuras 10 y 11. Al abandonar el territorio venoso y aumentar así las fuerzas de cizallamiento, los *rouleaux* desagregan.

El aumento de la AE juega un papel crucial, especialmente en los *poquets* de las válvulas de venas y vénulas postcapilares, donde la velocidad de flujo sanguíneo es muy baja, y es por tanto donde suele iniciarse la formación del trombo venoso. Adicionalmente, también a nivel microcirculatorio (retina, circulación cerebral y coronaria), la hiperagregabilidad eritrocitaria, con la formación de macroagregados eritrocitarios, contribuye al estancamiento microcirculatorio, reduciendo la perfusión capilar y el transporte de oxígeno a los tejidos, a la vez que estos macroagregados desplazan a las plaquetas y leucocitos hacia el endotelio vascular (marginación leucocitaria), aumentando las interacciones célula-célula y célula-endotelio, y potenciando así el desarrollo del trombo.

Figura 10: Rouleaux eritrocitarios

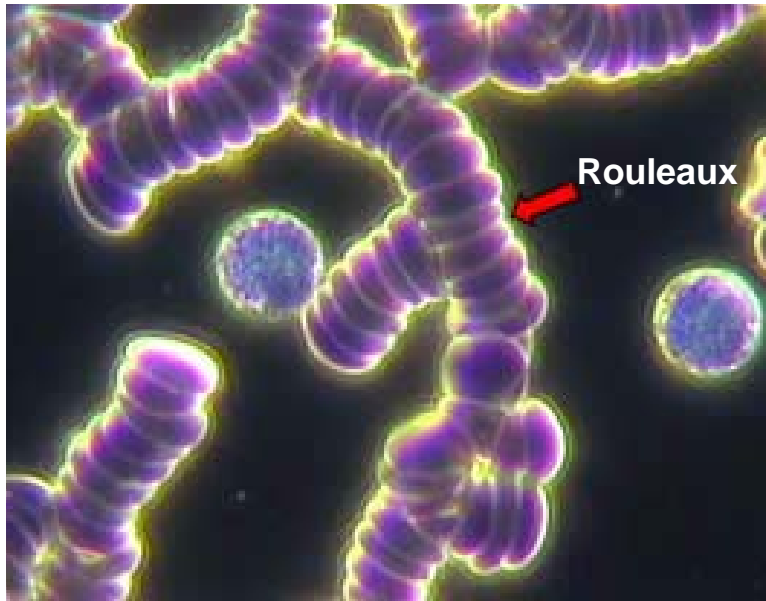
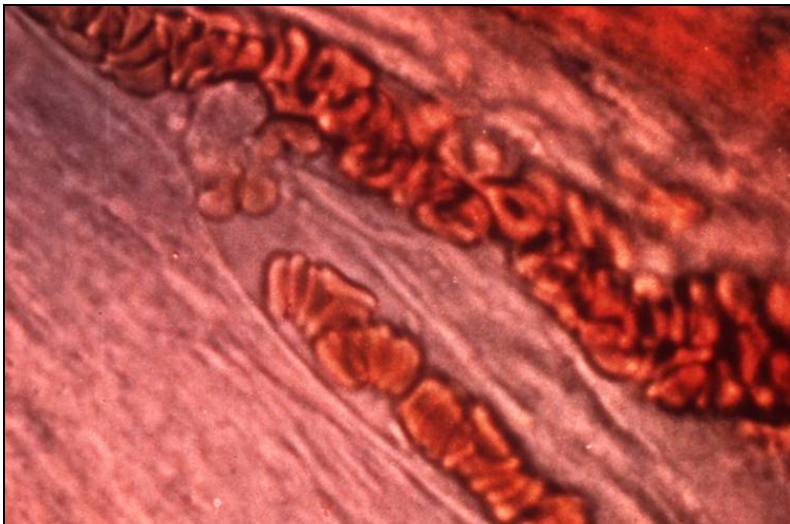


Figura 11: Rouleaux eritrocitarios en la microcirculación



La AE depende de otros factores además de la velocidad del flujo sanguíneo, como son la geometría del hematíe, la DE, el hematocrito y las proteínas plasmáticas. El aumento del volumen eritrocitario dificulta la AE, y su disminución la facilita (154; 155). De igual forma, la disminución de la DE

reduce la AE, pues los hematíes rígidos presentan una mayor dificultad para ofrecer una superficie de contacto suficiente (154-156). Los cambios estructurales de la membrana eritrocitaria, tanto en las glicoproteínas de superficie como en la composición lipídica, pueden modificar la carga electrostática neta y por tanto la fuerza de repulsión entre los hematíes, favoreciendo la AE (157). Un hematocrito bajo dificulta la interacción entre los hematíes, del mismo modo que un hematocrito elevado conlleva una mayor tendencia a formar *rouleaux* (158). Para evitar la influencia del valor hematocrito sobre la determinación de la AE, se recomienda que ésta se realice a un hematocrito fijo de 45% (159).

En condiciones fisiológicas, la AE depende fundamentalmente de la concentración de Fbg plasmático (160; 161). En menor medida, pueden influir otras proteínas plasmáticas como las Ig (162) y las lipoproteínas plasmáticas, observándose una correlación directa tanto con LDL como con VLDL, e inversa con HDL (163; 164). Se ha sugerido que otras proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva puedan ejercer una influencia sobre la AE (161; 165; 166).

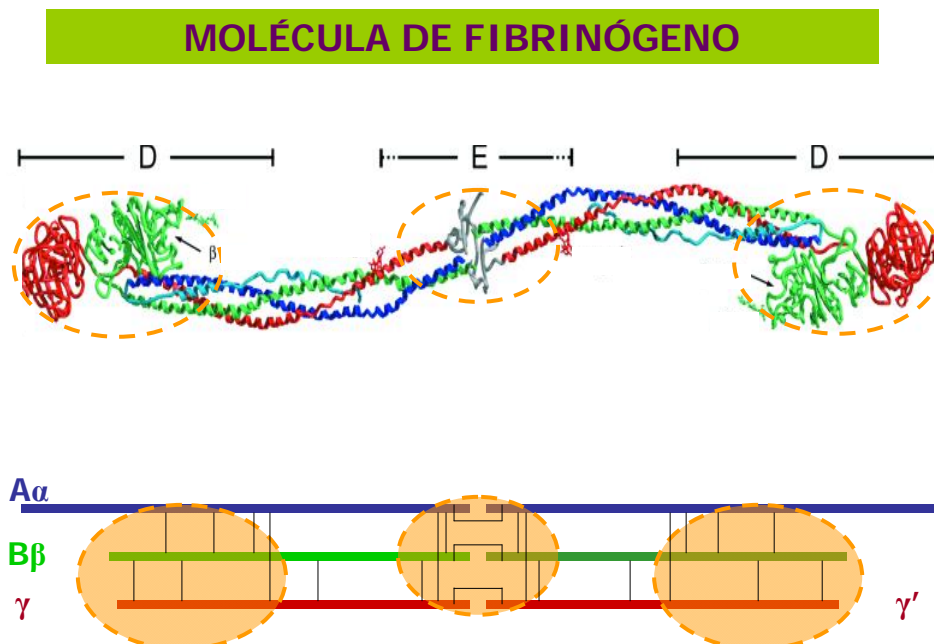
I.4.e. FIBRINÓGENO

El Fbg es una glicoproteína simétrica de síntesis hepática y masa molecular de 340.000 daltons, compuesta por seis cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro, tal como refleja la Figura 12 (167). Es un factor de la coagulación, que forma un gel de fibrina a través de una serie de reacciones moleculares iniciadas por la acción proteolítica de la trombina (167; 168). Además de jugar un papel principal en la hemostasia y en la hemorreología, es una proteína de fase aguda que influye en la función endotelial y en el proceso arteriosclerótico (169).

El Fbg se asocia con muchos otros factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión arterial, diabetes mellitus, consumo de tabaco y dislipemia.

Las mujeres tienen valores más elevados que los hombres (169). Sus niveles aumentan asimismo con la edad, el uso de contraceptivos orales y la menopausia, y disminuyen con el ejercicio, la ingesta de alcohol y el tratamiento hormonal sustitutivo con estrógenos. Los niveles de Fbg están relacionados con los cambios estacionales, incrementándose en invierno (170). Ciertos polimorfismos en el gen del Fbg pueden afectar sus niveles plasmáticos (171). La síntesis hepática de Fbg está controlada fundamentalmente por los niveles de IL-6 (172), citoquina que aumenta en los procesos inflamatorios.

Figura 12: Esquema de la molécula de Fbg. $A\alpha$, $B\beta$ y γ representan las cadenas polipeptídicas del Fbg. D es el dominio terminal, que contiene la zona carboxi-terminal. E es el dominio central, que contiene la zona amino-terminal. Por acción de la trombina, se liberan los fibrinopéptidos A y B, para formar fibrina.



I.4.f. ASOCIACION DE LOS FACTORES REOLÓGICOS CON LA TROMBOSIS ARTERIAL

La contribución del Fbg en el proceso arteriosclerótico no está aún claramente establecida. Podría ser un factor de riesgo cardiovascular, o bien, como reactante de fase aguda, podría ser sólo un marcador del proceso inflamatorio subyacente a la arteriosclerosis.

Diversos estudios han investigado la asociación entre niveles de Fbg y enfermedad cardiovascular. Un metaanálisis de seis estudios prospectivos publicados entre 1.980 y 1.992 mostró que los niveles de Fbg se asociaban con el desarrollo posterior de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular (169). El estudio Framingham, que incluyó a mujeres en su análisis y estudió todas las manifestaciones de la enfermedad cardiovascular, concluyó que por cada aumento de los niveles de Fbg de una desviación estándar por encima de la media (56 mg/dL), la incidencia de un primer episodio cardiovascular aumentaba aproximadamente 20% en hombres y en mujeres, tras ajustar por edad y por otros factores de riesgo cardiovascular (173). Un metaanálisis de 18 estudios prospectivos publicado en 1.998 concluyó que los individuos con valores de Fbg en el tercil superior presentaban un riesgo de enfermedad coronaria 1,8 veces superior que aquellos con valores en el tercil inferior (174). Otro metaanálisis reciente ha obtenido resultados similares (175), encontrando un incremento del riesgo de cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y mortalidad por cada incremento de 100 mg/dL en los niveles de Fbg. Sin embargo, otros autores sugieren que esta asociación se debe a factores confundientes (176).

La VP también se ha visto relacionada con la enfermedad cardiovascular. Un estudio prospectivo realizado en la década de los 90 demostró que la VP era un importante predictor independiente de cardiopatía isquémica en hombres de edad media (177). El análisis de los mismos sujetos tras 10 años ha confirmado el valor predictivo de cardiopatía isquémica de la

VP (178). Otro estudio prospectivo mostró asimismo que la VP se asociaba de forma independiente a un primer episodio de cardiopatía isquémica (179; 180). Dos estudios prospectivos han confirmado la asociación de la VP con la incidencia de cardiopatía isquémica, y han añadido su valor predictivo de accidente cerebrovascular (181; 182). Un metaanálisis de 4 estudios prospectivos publicado en el año 2.000 concluyó que los individuos con valores de VP en el tercil superior presentaban un riesgo de enfermedad coronaria 1,57 veces superior que los individuos con valores en el tercil inferior (183).

La VS también se ha visto asociada en diversos estudios prospectivos a manifestaciones clínicas de arteriosclerosis, como cardiopatía isquémica o accidente cerebrovascular (182; 184), aunque otros autores no han confirmado que la VS sea un factor de riesgo cardiovascular independiente (185).

La disminución de la DE podría favorecer la isquemia en la microcirculación al disminuir el flujo capilar, dado que si el hematíe no se deforma correctamente no es capaz de atravesar los capilares de pequeño diámetro. En la macrocirculación, si la capacidad del hematíe para deformarse está alterada, se produce un enlentecimiento del flujo sanguíneo, aumentando el tiempo de contacto de las células entre sí y con el endotelio, e incrementándose la activación plaquetaria (186). La relación entre alteraciones de la DE y trombosis arterial es clara en enfermedades hematológicas como la drepanocitosis o la talasemia *maior*. Pero fuera de estas situaciones, su papel como factor de riesgo cardiovascular es controvertido (187).

El incremento de la AE contribuye al estancamiento microcirculatorio, lo que puede alterar la resistencia vascular periférica, reduciendo la perfusión capilar y el transporte de oxígeno a los tejidos. Asimismo, se forman macroagregados eritrocitarios que desplazan a las plaquetas y leucocitos hacia el endotelio vascular, aumentando las interacciones célula-célula y célula endotelio, y potenciando así el desarrollo del trombo arterial. No existen

estudios prospectivos que analicen la relación de la AE con la incidencia de enfermedad cardiovascular, aunque diversos estudios transversales o caso-control han mostrado un aumento de la AE en la cardiopatía isquémica o en la enfermedad cerebrovascular (144; 188-193).

I.4.g. ASOCIACION DE LOS FACTORES REOLÓGICOS CON LA TROMBOSIS VENOSA

La VS elevada es un factor de riesgo establecido para TVP (194). Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento para evidenciar el papel de los demás parámetros reológicos en la patogenia de la TVP han sido de caso-control y realizados con un pequeño tamaño muestral (195; 196), por lo que no hay suficiente evidencia para afirmar que las demás alteraciones hemorreológicas constituyan un factor de riesgo independiente para TVP. Todos los estudios han confirmado un aumento de los niveles de Fbg en pacientes que habían padecido una TVP 12 meses antes (195-198), o 28 meses antes (199). Se ha sugerido que el riesgo de TVP en pacientes con niveles de Fbg superiores a 500 mg/dL es cuatro veces mayor (200).

De forma similar, se ha encontrado un aumento de la AE 12 meses (195; 198) o 28 meses (199) después de un episodio de TVP, pero no se han excluido los pacientes con enfermedades neoplásicas, que pueden causar por sí mismas tanto hiperagregabilidad eritrocitaria como TVP. En lo que se refiere a la VP, los diferentes estudios en pacientes con antecedentes de TVP han mostrado resultados discrepantes, encontrándola elevada algunos (201) y normal otros (196-199).

Estudios recientes (Vayá y cols, *13th European Conference on Clinical Hemorheology*, Siena 2005) indican que en pacientes con TVP el incremento de lípidos plasmáticos está en relación con el aumento de la VP y de la AE que presentan estos pacientes, por lo que la hiperlipemia podría a través de mecanismos hemorreológicos incrementar el riesgo de TVP.

I.5. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTADO PROTROMBÓTICO EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET

Tal y como se ha detallado en el primer apartado, los pacientes con EB presentan un riesgo aumentado de desarrollar trombosis tanto en el territorio venoso como en el territorio arterial, con una frecuencia de alrededor del 25% (26). No están establecidos los mecanismos responsables de este estado protrombótico en la EB, pudiendo deberse a un estado de hipercoagulabilidad, de hipofibrinólisis o a alteraciones hemorreológicas.

I.5.a. FACTORES DE RIESGO TROMBOTICO EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET

Fibrinógeno, factor VII, factor VIII

En los pacientes con EB, se han encontrado niveles de Fbg plasmático elevados (202). Sin embargo, ciertos autores opinan que este aumento de Fbg no estaría implicado en la tendencia protrombótica de los pacientes con EB, sino que sería sólo un marcador de actividad de la enfermedad (203).

Estudios aislados han encontrado que los pacientes con EB que han sufrido procesos trombóticos presentan niveles elevados de factor VIII al ser comparados con pacientes con EB sin trombosis (204).

Los niveles plasmáticos de FVII activado en pacientes con EB no parecen tener implicación alguna en el desarrollo de trombosis (7; 205).

Plaquetas, factor activador plaquetario, P-selectina, anticuerpos antiplaquetarios, metabolitos del ácido araquidónico

El factor activador plaquetario (FAP) es producido por numerosas células como monocitos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas y células endoteliales, tras su estimulación por el TNF- α . El FAP activa las plaquetas y favorece la contracción del músculo liso vascular. Asimismo, favorece la adhesión de los leucocitos y de las plaquetas a las células endoteliales. La P-selectina es un marcador de activación plaquetar que también favorece la adhesión plaquetar a las células endoteliales. Estudios recientes han implicado al FAP y a la P-selectina en el daño endotelial y en la tendencia trombótica de los pacientes con EB (206).

Ciertos polimorfismos genéticos de la glicoproteína Ia de la membrana plaquetar han sido identificados como factores de riesgo para trombosis. Polat y cols (207) encuentran que los pacientes con EB presentan una frecuencia mayor que el grupo control del genotipo 807TT del gen de la glicoproteína Ia de la membrana plaquetar. Los pacientes con EB portadores de dicho genotipo presentan un riesgo incrementado para el desarrollo de trombosis.

El metabolismo del ácido araquidónico en el endotelio y en las plaquetas ha sido involucrado en la tendencia protrombótica de los pacientes con EB. La estimulación de dichas células libera tromboxano B2 (TXB2) y prostaglandina $F_{1\alpha}$ (PGF $_{1\alpha}$). Los niveles de PGF $_{1\alpha}$ se han encontrado disminuidos en la fase activa de los pacientes con EB (208) en un trabajo, sin embargo, se ha criticado la técnica empleada en este estudio, cuestionándose por tanto estos resultados. Otros autores han encontrado niveles elevados de PGF $_{1\alpha}$ y TXB2 (209), concluyendo que el aumento de TXB2 puede constituir un factor de riesgo proagregante.

Anticuerpos anti-célula endotelial, factor Von Willebrand, factor tisular, inhibidor del factor tisular, óxido nítrico, trombomodulina

En los pacientes con EB se han encontrado aumentados los anticuerpos anti-célula endotelial, observándose una correlación positiva entre los niveles de los mismos y la actividad de la enfermedad (210). Sin embargo, no está establecido si dichos anticuerpos son los causantes del daño endotelial, o bien si aparecen como consecuencia del mismo. Asimismo, diversos estudios han encontrado elevados ciertos marcadores de lesión endotelial en pacientes con EB, especialmente el F vW (211), la TM (7; 212) y la E-selectina (212).

El FT es el primer paso de la cascada de la coagulación, actuando sobre la formación del complejo FT-FVII, el FX y la trombina. El TFPI es una proteína sintetizada en el endotelio vascular que modula la acción del FT. Ertenli y cols han observado que en los pacientes con EB, la secreción de TFPI por las células endoteliales disminuye tras la administración de heparina de bajo peso molecular (213), lo que sugiere que una reserva defectuosa de TFPI endotelial en estos pacientes puede ser en parte responsable de su estado protrombótico. Sin embargo, Akarsu y cols sugieren que serían los niveles elevados de TFPI, y no disminuidos, los que se relacionarían con la actividad de la enfermedad y la tendencia protrombótica de los pacientes con EB (214), pero estos autores no ofrecen una explicación fisiopatológica del mecanismo mediante el cuál los niveles elevados de TFPI podrían favorecer los procesos trombóticos.

El ON tiene una acción vasoconstrictora, y es liberado por células endoteliales, neutrófilos y macrófagos. Los pacientes con EB en fase activa presentan niveles elevados de ON (215).

La TM es esencial para la activación de la vía de la PC. Se han encontrado niveles elevados en pacientes con EB (7; 212; 216), aunque otros autores han encontrado niveles disminuidos (217). Se piensa que los niveles

elevados de TM en los pacientes con EB corresponden a una TM deficiente en su función de activar la vía de la PC (7).

Fibrinólisis, activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador tisular del plasminógeno y polimorfismo 4G/5G del promotor del gen del inhibidor del activador tisular del plasminógeno, α 2 antiplasmina, complejos plasmina antiplasmina, plasminógeno, TAFI

Los resultados obtenidos acerca de los diferentes componentes de la fibrinólisis en la EB son discordantes. Algunos autores han encontrado datos que orientan hacia una activación de la fibrinólisis en la EB, que se manifestaría por niveles elevados de complejos plasmina/ α 2AP (7; 218; 219). Los resultados obtenidos al analizar los niveles del antígeno del t-PA (t-PA ag) no son concluyentes, encontrando niveles normales algunos autores (211; 218; 220), y niveles disminuidos otros (221). La actividad del t-PA o t-PA funcional (t-PA fc) se ha encontrado normal en pacientes con EB (218; 220). Los niveles de PAI-1 antigénico (PAI-1 ag) se han encontrado elevados en la mayoría de los estudios (211; 218; 220), mientras que los de PAI-1 funcional (PAI-1 fc) se han encontrado normales (221) o elevados (218; 220). La causa de los resultados tan dispares puede residir en los métodos de laboratorio empleados o en la fase de actividad de la enfermedad en la que se encontraban los enfermos. No se ha observado asociación entre estos parámetros y el desarrollo de eventos trombóticos en los pacientes con EB (211; 218; 220; 221).

Se ha encontrado un aumento de los marcadores de hipercoagulabilidad en los pacientes con EB, tales como los complejos trombina/antitrombina (T-AT) y el fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2) (219). En un estudio, se encontró una disminución de los complejos plasmina/ α 2AP y un aumento del F1+2 (222). Por el contrario, los complejos plasmina/ α 2AP se encontraron normales en otro trabajo (223).

El TAFI inhibe la formación de plasmina y, por tanto, su exceso favorece el desarrollo de procesos trombóticos. Recientemente, Donmez y cols (224) han estudiado el posible papel del TAFI en el desarrollo de trombosis en pacientes con EB, encontrando que los pacientes con EB presentan niveles más elevados de TAFI que los controles. Sin embargo, los pacientes con EB con antecedentes de trombosis no presentaron niveles plasmáticos de TAFI diferentes a los pacientes con EB sin antecedentes de trombosis. Por tanto, el posible papel del TAFI en el desarrollo de episodios trombóticos en pacientes con EB no está totalmente establecido.

En la mayoría de estudios, no se ha podido encontrar una asociación entre las mencionadas alteraciones del sistema fibrinolítico, los marcadores de hipercoagulabilidad, los marcadores de daño endotelial, y el desarrollo de eventos trombóticos. Aunque algunos autores consideran que la disfunción endotelial debida a la inflamación puede constituir un importante factor protrombótico, este factor no puede ser el único responsable del estado de hipercoagulabilidad de la EB, ya que en otros procesos que cursan con vasculitis no existe un incremento del riesgo de trombosis.

Vía de la proteína C

Aunque algunos autores han relacionado los defectos en la vía de la PC con la EB, hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio valorando la implicación de estos defectos en los procesos trombóticos de la EB.

Déficit de antitrombina, proteína C y proteína S

Dentro de los defectos hereditarios de la coagulación con tendencia protrombótica, los déficits de los inhibidores fisiológicos de la coagulación AT (7; 219; 225-227), PC y PS (219), no parecen jugar un papel importante en las

manifestaciones trombóticas de la EB (7; 225-228), aunque se han descrito asociaciones en casos aislados (227; 229-231).

Resistencia hereditaria a la proteína C activada: factor V Leiden

La R-PCa causada por la presencia de F V Leiden es el defecto hereditario más frecuente asociado a trombosis (90). Los resultados respecto al papel que el F V Leiden puede jugar en la etiopatogenia del estado protrombótico de la EB son contradictorios. Algunos autores encuentran que la prevalencia del F V Leiden no es significativamente superior en los pacientes con EB que sufrieron episodios trombóticos comparados con los que no los sufrieron (7; 204; 232; 233). Por otro lado, los estudios llevados a cabo en la población turca concluyen que la presencia de F V Leiden en los pacientes con EB puede jugar un papel importante en su estado protrombótico (234-238). Entre estos trabajos destaca el de Gurgey y cols (238), que estudian la presencia de F V Leiden en pacientes con EB clasificados en función de la presencia o ausencia de eventos trombóticos. Concluyen que la frecuencia de F V Leiden fue de 33% en el grupo de pacientes con EB y trombosis, mientras que en el grupo de pacientes con EB sin trombosis fue de 9%, lo que supone un riesgo de eventos trombóticos casi seis veces mayor para los pacientes con EB con mutación F V Leiden. Hay que considerar que algunos de estos estudios carecen de grupo control, lo que no permite conocer si existen diferencias entre casos y controles respecto a la frecuencia de F V Leiden. Por otra parte, dado que la heterocigosidad para el F V Leiden no es infrecuente en la población general, la presencia de esta mutación en los pacientes con EB podría ser una mera coincidencia. Kiraz y cols (239) sugieren que, en los pacientes con EB, el ser portador de F V Leiden supone una mayor predisposición al desarrollo de fenómenos trombóticos, aunque éste no sea el único factor responsable del estado de hipercoagulabilidad, ya que no todos los pacientes con EB y F V Leiden presentan trombosis. Por tanto, deben coexistir otros mecanismos para el desarrollo de los fenómenos trombóticos, aunque la presencia de esta mutación podría potenciar la aparición de estos eventos.

Diversos autores observan que la presencia de F V Leiden puede incrementar el riesgo de afectación ocular en la EB (240; 241). Batioglu y cols (242) observaron que la prevalencia de F V Leiden en los pacientes con afectación ocular era del 40% mientras en los controles sanos era del 9,8%, a la vez que el 53% de los pacientes con afectación vascular retiniana oclusiva presentaban F V Leiden. Asimismo, Verity y cols concluyen que el F V Leiden puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de afectación ocular en la EB (240), especialmente de las oclusiones vasculares retinianas, ya que el 44% de los pacientes con este tipo de afectación ocular eran portadores de dicha mutación. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por otros autores (233; 243).

Por tanto, los resultados acerca del papel que el F V Leiden puede jugar en la patogenia tanto de los eventos trombóticos venosos como de las oclusiones retinianas en la EB son discordantes. Además, debemos considerar que la prevalencia de F V Leiden es variable en las diversas áreas geográficas, por lo que los resultados obtenidos en Turquía o Japón en pacientes con EB no son extrapolables a los obtenidos en la población española.

En nuestro medio, dado que la EB es poco frecuente, son muy escasos los estudios llevados a cabo sobre la mutación F V Leiden en relación a la presencia de eventos trombóticos, destacando en este sentido el trabajo de Espinosa y cols (7), donde no se observó asociación entre las manifestaciones trombóticas de los pacientes con EB y la mutación F V Leiden, aunque, dado que el tamaño muestral era pequeño ($n= 38$), la falta de asociación entre el mencionado defecto trombofílico y la presencia de manifestaciones trombóticas podría cuestionarse.

Mutación G20210A del gen de la protrombina

La mutación G20210A de la región 3' no traducida del gen de la protrombina puede contribuir a incrementar los niveles plasmáticos de protrombina, aumentando el riesgo trombótico entre 2 y 3 veces (7; 106). La prevalencia de dicha mutación tiene una importante variabilidad geográfica (103), siendo más prevalente en los países del sur de Europa que en los del norte, a la vez que es el factor de riesgo hereditario trombótico más prevalente en la población española (104; 105), con una prevalencia que oscila entre el 3,5 y el 5%. Algunos autores han encontrado una asociación entre la mutación G20210A del gen de la protrombina y el desarrollo de trombosis en pacientes con EB. Así, Gul y cols observan que el 32 % de pacientes con EB que habían padecido eventos trombóticos eran portadores heterocigotos de la mutación, mientras que sólo la presentaban el 3% de pacientes con EB sin trombosis, lo que suponía que los portadores de la mutación tenían un riesgo 14 veces mayor de padecer eventos trombóticos (244). En este sentido, Tursen y cols observan que la mutación de la protrombina es más prevalente en los pacientes con EB (19%) que en el grupo control (1%), aunque no valoran su asociación con eventos trombóticos (245). También se han comunicado casos aislados de pacientes con EB portadores de dicha mutación que desarrollaron trombosis masivas y de localización inusual (241; 246). Sin embargo, otros autores, tras realizar estudios en series numerosas de pacientes, no han podido confirmar dicha asociación (7; 204; 238). El único estudio realizado en población española (noreste de España) hasta la fecha (7), analizando el papel de la mutación G20210A del gen de la protrombina en el estado procoagulante de la EB, no encontró ninguna asociación entre dicha mutación y el estado procoagulante de los pacientes con EB.

También se ha valorado la asociación de la mutación G20210A del gen de la protrombina con la presencia de uveítis posterior en estos pacientes. En un estudio reciente realizado en población italiana en pacientes con EB, se ha observado que los portadores de dicha mutación desarrollaron afectación

ocular más grave, con uveítis y vasculitis retiniana, que los no portadores (233). Sin embargo, Batioglu y cols (233) no han observado asociación entre dicha mutación y la afectación ocular en la EB (242). Por tanto, el papel que la mutación G20210A del gen de la protrombina pueda jugar en el desarrollo de eventos trombóticos o de uveítis retiniana en los pacientes con EB no está totalmente aclarado.

Hiperhomocisteinemia y polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa

Otro mecanismo vinculado a la génesis de eventos trombóticos no sólo venosos, sino también arteriales, es la hiperhomocisteinemia. El genotipo 677TT del gen de la MTHFR se asocia a niveles plasmáticos moderadamente elevados de homocisteína siendo un factor que predispone al desarrollo de eventos trombóticos, pero, a diferencia del F V Leiden o de la mutación G20210A del gen de la protrombina, no ha demostrado actuar como factor independiente en la génesis de fenómenos tromboembólicos (119).

Se han realizado diversos estudios valorando si la homocigosidad para la mutación C677T del gen MTHFR y los niveles plasmáticos de homocisteína se asocian a trombosis venosa en la EB. Respecto al gen de la MTHFR, son cuatro los estudios realizados (7; 204; 232; 247). Todos ellos encuentran que la homocigosidad para dicho gen no incrementa el riesgo de trombosis en pacientes con EB. Respecto a la hiperhomocisteinemia, los resultados de los diversos trabajos son contradictorios: mientras algunos autores sugieren que los niveles elevados de homocisteína plasmática pueden jugar un papel en la patogenia de los eventos trombóticos venosos en la EB (202; 247-249), otros no encuentran correlación entre los niveles elevados de homocisteína y la trombosis en dichos pacientes (250; 251). Es importante destacar que, en el estudio de Lee y cols (202), la hiperhomocisteinemia no sólo se relacionaba con la trombosis, sino también con la actividad de la enfermedad. Por lo tanto, para valorar adecuadamente el papel que la hiperhomocisteinemia pueda jugar en la patogenia de los eventos trombóticos en la EB, es fundamental conocer

si los pacientes se encuentran o no en una fase activa de la enfermedad, dato no siempre aportado por los diversos autores. Igualmente, se debe tener en cuenta la posible influencia de factores de riesgo cardiovascular como tabaco (252) e hiperlipemia (253), ya que pueden influir en los niveles plasmáticos de homocisteína. También se ha observado una asociación entre la hiperhomocisteinemia y la uveítis en los pacientes con EB (254).

Anticuerpos antifosfolípido: anticuerpos anticardiolipina y anticoagulante lúpico

Los estudios más recientes no han encontrado asociación entre la EB y la presencia de AAC (255). Sin embargo, algunos trabajos han encontrado que los pacientes con EB en fase activa presentan títulos de AAC significativamente superiores a los pacientes con EB sin actividad (256). La mayor parte de los estudios llevados a cabo valorando la relación entre la presencia de AAC y AL y el desarrollo de eventos vasculares en pacientes con EB han observado que no existe una correlación entre ambos (7; 226; 257), aunque puntualmente algún trabajo ha señalado una posible asociación (258; 259). Por tanto, la presencia de anticuerpos antifosfolípido y su relación con la trombosis en la EB sigue sin estar aclarada, aunque no parece existir una asociación.

I.5.b. ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS EN LA ENFERMEDAD DE BEHCET

Es conocido que las alteraciones del flujo sanguíneo son causa de eventos trombóticos tanto del área venosa como arterial (143; 144; 260). En la bibliografía revisada, sólo existe un trabajo donde se haya valorado la AE como mecanismo protrombótico en la EB (203). En este estudio prospectivo,

se observó una asociación entre la hiperagregabilidad eritrocitaria y el riesgo trombótico en pacientes con EB. Un defecto en la clasificación de los eventos trombóticos en este estudio, ya que incluye a las vasculitis retinianas en el mismo grupo que las TVP, hace cuestionables los hallazgos, a la vez que no se determinaron otros parámetros hemorreológicos que también podrían favorecer el desarrollo de eventos trombóticos. Hasta la fecha, no existen estudios que valoren la VP, la VS y la DE como posibles factores de riesgo protrombótico en la EB, a diferencia de otras vasculitis como el lupus eritematoso sistémico, donde se han llevado a cabo varios estudios, observándose una disminución de la DE (261) y un aumento de la VP (262).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En los pacientes con EB pueden existir diversos factores de riesgo trombótico que contribuyan al estado de hipercoagulabilidad que presentan estos pacientes, lo que podría estar en relación con la mayor prevalencia de eventos trombóticos. Así, nuestra hipótesis contempla la posibilidad de una asociación entre las mutaciones factor V Leiden y protrombina G20210A y unos menores niveles de proteína C activada con los eventos trombóticos. Asimismo, una mayor viscosidad sanguínea fundamentalmente relacionada con las concentraciones elevadas de fibrinógeno, que caracteriza a esta vasculitis, podría favorecer también el desarrollo de eventos trombóticos al modificar el perfil hemorreológico en estos pacientes. Por último, mayores concentraciones de homocisteína plasmática, relacionadas o no con la homocigosidad para el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR, podrían incrementar tanto el riesgo trombótico como el desarrollo de uveítis en los pacientes con EB.

II.2. OBJETIVOS

- Conocer las características clínicas de los pacientes con EB en la Comunidad Valenciana, especialmente las manifestaciones cutáneas y trombóticas.
- Estudiar la asociación de los factores de riesgo trombótico hereditarios (AT, PC, PS, homocisteína, F V Leiden, mutación G20210A del gen de la protrombina, polimorfismo C677T del gen de la MTHFR) y adquiridos (anticuerpos antifosfolípido) en los pacientes con EB con la tendencia protrombótica de estos pacientes.
- Evaluar la vía de la PC en pacientes con EB y valorar los niveles de PCa circulante en estos pacientes. Determinar si los niveles de PCa circulante se relacionan con los eventos trombóticos en pacientes con EB.
- Valorar si los parámetros hemorreológicos (VS, VP, Fbg, AE y DE) están alterados en los pacientes con EB y analizar su contribución al estado protrombótico de estos pacientes.

III. RESULTADOS

PUBLICACIONES CONSTITUTIVAS DE LA PRESENTE TESIS
DOCTORAL

Se adjunta una copia de los trabajos publicados y de los trabajos enviados a publicar:

III.1. TRABAJOS PUBLICADOS

Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis

British Journal of Haematology 2004; 126: 550-556.

Factor de impacto: 3,195

Silvia Navarro**, José M^a Ricart*, Pilar Medina**, Amparo Vayá***, Piedad Villa***, José Todolí****, Amparo Estellés**, M^aLuisa Micó****, Justo Aznar***, Francisco España**

*: Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

** : Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia

***: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia

****: Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe. Valencia

Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis

Silvia Navarro,¹ José María Ricart,²
Pilar Medina,¹ Amparo Vayá,³
Piedad Villa,³ José Todolí,⁴
Amparo Estellés,¹ María Luisa Micó,⁴
Justo Aznar³ and Francisco España¹

¹Research Centre, ²Dermatology Service,

³Department of Clinical Pathology and ⁴Internal
Medicine Service, Hospital Universitario La Fe,
Valencia, Spain

Received 16 March 2004; accepted for
publication 21 May 2004

Correspondence: Dr Francisco España, Hospital
Universitario La Fe, Centro de Investigación,
Av. Campanar, 21, 46009 Valencia, Spain.
E-mail: espanya_fra@gva.es

Summary

Behçet's disease is a multi-systemic inflammatory disorder of unknown cause. Most abnormalities have been associated with endothelial injury caused by vasculitis. Thrombosis occurs in about 25% of patients, although the mechanism is unknown. The objective of this study was to evaluate the protein C activation system in Behçet's disease and its correlation with venous thromboembolism (VTE). Thirty-nine patients (12 with VTE) and 78 age- and sex-matched controls were included in the study, and levels of protein C, protein S, activated protein C (APC), protein C inhibitor (PCI), soluble thrombomodulin (TM), antithrombin (AT), α_1 -antitrypsin, fibrinogen, factor VIII, von Willebrand factor (VWF) and C-reactive protein (CRP) were measured. APC and TM levels were significantly lower in patients than in controls, whereas protein S, AT, α_1 -antitrypsin, fibrinogen, factor VIII, VWF and CRP levels were significantly higher in patients than in controls. APC, PCI and TM levels were lower in patients with VTE (0.65 ± 0.19 ng/ml, $86\% \pm 22\%$ and 15.5 ± 7.1 ng/ml respectively) than in those without VTE (0.78 ± 0.17 ng/ml, $100\% \pm 15\%$ and 22.1 ± 15.3 ng/ml) ($P < 0.05$). In patients, APC levels below 0.75 ng/ml (10th percentile of the control group) increased the risk of VTE about fivefold (odds ratio = 5.1; 95% confidence interval = 1.1–23.4). These results show that reduced APC levels are associated with the high incidence of VTE in Behçet's disease.

Keywords: activated protein C, Behçet's disease, thrombomodulin, venous thrombosis, inflammation.

Behçet's disease is a rare inflammatory, lifelong disorder of unknown cause, characterized by recurrent oral and genital ulceration, and skin lesions (Kaklamani *et al*, 1998; Sakane *et al*, 1999). It is a multi-system disease that may involve cutaneous, articular, neurological, intestinal, pulmonary, urogenital or vascular manifestations (Koç *et al*, 1992; Espinosa *et al*, 2002). Vascular injuries and autoimmune responses are characteristic of Behçet's disease. Large vessels are affected by vasculitis of the vasa vasorum, and there is a prevalence of vascular involvement that manifests as venous and arterial thrombosis in about 25% of patients (Chajek & Fainaru, 1975; Koç *et al*, 1992). Venous thromboembolism (VTE) is more common than arterial thrombosis, with deep vein thromboses being the most frequent (Gül *et al*, 1999). Endothelial dysfunction resulting from vascular inflammation is

considered to be an important factor of thrombosis, although the endothelial injury itself cannot completely explain the hypercoagulable state of the disease because other vasculitis syndromes do not increase the risk of thrombosis (Lee *et al*, 2002). Other alterations, such as deficiencies of protein C, protein S and antithrombin (AT), or the presence of antiphospholipid antibodies and factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations, have been considered. Although some studies found an association between these abnormalities and thrombosis in Behçet's disease (Hull *et al*, 1984; Chafa *et al*, 1992; Guermazi *et al*, 1997; Mammo *et al*, 1997; Mader *et al*, 1999; Vayá *et al*, 2000), many other studies did not find any of these abnormalities to be associated with Behçet's disease (Lenk *et al*, 1998; Nalçacı & Pekçelen, 1998; Mader *et al*, 1999; Toydemir *et al*, 2000; Espinosa *et al*, 2002).

The aim of this study was to evaluate the protein C pathway and thrombophilic parameters in patients with Behçet's disease, and to correlate these data with thrombosis.

Patients and methods

Patients

We studied 39 patients with Behçet's disease (19 male, 20 female). The mean (\pm standard deviation, SD) age at diagnosis was 34 ± 10 years (range, 15–60 years). The mean age at study inclusion was 42 ± 12 years (range, 16–74 years). All patients fulfilled the criteria for diagnosis of Behçet's disease according to the International Study Group for Behçet's disease (1990). Only two patients with Behçet's disease presented severe ocular affection at sampling, indicating that they were in an active phase of the disease. In the other patients, the disease was inactive or with a minimum activity (mild aphthosis and/or arthralgias). Twelve patients had suffered a VTE and were referred to our service for thrombophilic study. The thrombosis was located in the lower limbs ($n = 7$), iliac-cava vein plus pulmonary embolism ($n = 1$), cerebral sinus ($n = 1$), right intracardiac area ($n = 1$), upper limbs ($n = 1$) and pulmonary embolism plus ischaemic stroke ($n = 1$). Four patients had suffered repeated episodes of superficial phlebitis. Two patients had experienced more than one VTE episode, and were on long-term oral anticoagulant therapy with acenocoumarol. According to the protocol approved by the Ethics Committee of our hospital, the thrombophilic study of these two patients was performed as follows: 20 d before sampling, acenocoumarol was replaced by low-molecular weight heparin and heparin was not administered on the day before sampling. None of the patients had antiphospholipid antibodies, malignancy, renal or hepatic dysfunction or lupus anticoagulant, or were receiving oral anticoagulation therapy at sampling. Sampling took place at least 6 months after the thrombotic event. The thrombophilic study performed on all patients evaluated the following parameters: AT, protein C, protein S, plasminogen, heparin cofactor II, activated protein C resistance, factor V Leiden and the prothrombin G20210A mutation.

Objective thrombosis diagnostic procedures were performed in all patients to confirm the diagnosis of VTE (contrast venography or ultrasonography) or pulmonary embolism (ventilation-perfusion lung scanning or pulmonary angiography). Intracardiac thrombosis was assessed by transoesophageal echocardiography. Cerebral venous thrombosis and ischaemic stroke were diagnosed by computed tomography and magnetic resonance imaging and venography.

At the time of blood collection, seven patients were taking corticosteroids, five were under colchicine treatment and five were taking both drugs. Nine patients were taking ciclosporin, alone ($n = 3$) or combined with corticosteroids ($n = 4$) or colchicine ($n = 2$), and 13 patients were not under specific treatment.

Controls

While patients were being recruited, a control group of 78 age- and sex-matched healthy individuals from the same geographical area as the patients was studied. They were laboratory and medical personnel and persons who visited our hospital for medical check-ups. All controls were apparently healthy and none had a personal or familial history of thrombotic disease. The absence of thrombotic events or a family history of thrombosis was verified by means of a validated questionnaire (Frezzato *et al*, 1996). The thrombophilic study was also carried out in the control group subjects. All patients and controls gave their informed consent. The study was approved by the local Ethics Committee.

Laboratory tests

Plasma activated protein C (APC) levels were measured using a previously reported method (España *et al*, 1996) with slight modifications (España *et al*, 2001). Briefly, 4.5 ml blood was drawn into two tubes containing 0.5 ml of 0.129 mol/l trisodium citrate. Immediately, 46 μ l of 1000 U/ml heparin was added to one tube and the mixture was incubated at 37°C for 30 min to force all plasma APC to form complexes with its major plasma inhibitor, protein C inhibitor (PCI). In the presence of heparin, more than 95% of the APC forms complexes with PCI (España, 1991). Therefore, the concentration of APC:PCI in the tube with heparin is the sum of *in vivo* circulating APC:PCI complexes and the complexes formed *in vitro* from the circulating APC. The second blood tube was mixed with 46 μ l of a mixture of 0.58 mol/l benzamidine HCl and 0.5 mmol/l PPACK to inhibit circulating APC, so that the APC:PCI complex in this tube reflects the concentration of the *in vivo* circulating APC:PCI complex. Hence, the concentration of circulating APC was calculated from the difference in APC:PCI concentration in the two samples. The detection limit of the APC assay was 0.1 ng/ml. The inter- and intra-assay variations were less than 6% and 11% respectively. Repeated assays revealed non-significant intra-individual variations of APC levels (España *et al*, 2001). Although our APC assay consists of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that measures plasma APC:PCI complexes before and after addition of heparin, it actually determines the proteolytic activity of APC to cleave and complex to PCI, as non-functional, inactive APC will not cleave and complex PCI. We have shown that the APC concentration measured with this assay does reflect plasma APC concentrations (España *et al*, 1996), and that there was a good correlation between APC levels obtained with our APC assay and those obtained with the assay reported by Gruber and Griffin (1992).

For the other parameters, blood samples were collected into vacuum tubes containing 1/10 vol. of 3.2% trisodium citrate as anticoagulant. Samples were centrifuged at 2000 g for 30 min to obtain platelet-poor plasma, which was stored in aliquots at -70°C until tested.

Fibrinogen and factor VIII functional levels were determined using high-sensitivity standard reagent IL [Instrumentation Laboratory (IL), Milano, Italy]. Their respective inter- and intra-assay variations were less than 5% and 10%. Quantification of von Willebrand factor (VWF) was performed by an immunoturbidimetric assay (Villa *et al*, 2001), using IL Test VWF antigen (VWF:Ag) Kit (IL). The IL Calibrator Plasma for VWF:Ag was calibrated against the 4th International Standard FVIII/VWF (National Institute for Biological Standards and Control 97/586). The inter- and intra-assay variations were less than 4%. AT activity was assayed for its anti-activated factor X (anti-Xa) activity in the presence of heparin using the IL test Antithrombin Kit (IL). The inter- and intra-assay variations were less than 4%. Protein S activity was determined as the degree of prolongation of the prothrombin time in the presence of bovine thromboplastin, calcium ions and APC, using the IL test (IL). The inter- and intra-assay variations were less than 7%. The modified APC resistance assay was performed after diluting the patient's plasma with factor V-depleted plasma, as previously reported (Jorquera *et al*, 1994). The inter- and intra-assay variations were less than 5%. Protein C antigen (España *et al*, 1986) and PCI antigen and APC:PCI complexes (España & Griffin, 1989) were measured using ELISAs as indicated earlier. The inter- and intra-assay variations were less than 6% and 9%, respectively. α_1 -antitrypsin (α_1 AT) antigen was measured with a specific ELISA using the IgG fraction of rabbit anti- α_1 AT antiserum (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). The inter- and intra-assay variations were less than 8% and 10%, respectively. Soluble plasma thrombomodulin (TM) was measured by an enzyme immunoassay (Asserachrom TM, Diagnostica Stago, Asnieres-sur-Siene, France). The inter- and intra-assay variations were less than 6%. C-reactive protein (CRP) was measured by a high-sensitivity nephelometric assay (Behring Nephelometer; Behringwerke AG, Marburg, Germany). The inter- and intra-assay variations were less than 3%.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard methods. FV Leiden mutation was detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of a fragment of the factor V gene, following the method described by Gandrille *et al* (1995). The prothrombin gene G20210A variant was detected using a previously described PCR technique (Poort *et al*, 1996).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows software, release 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Distribution of variables was assessed with the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous variables are reported as mean and standard deviations or as medians and range (according to their distribution). Patient and control groups were compared with the Student's *t*-test for independent samples, or with the Mann–Whitney rank sum *U*-test to take into account skewed

distributions. The chi-square test (with Yate's correction) was used to compare the sex ratios, percentage of smokers, and the prevalence of thrombophilic mutations between patients and controls. Correlations were evaluated with Pearson's linear regression or with the Spearman rank test. Logistic regression analysis was used to identify links between APC levels and VTE. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were calculated from the logistic model. Two-tailed *P*-values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

The clinical characteristics of the study group are given in Table I. No significant differences were observed between patients and controls regarding age and sex distribution and percentage of smokers.

No patients with protein C, protein S, AT, plasminogen or heparin cofactor II deficiency were identified, whereas one control subject had protein C deficiency. One patient with Behçet's disease was a heterozygous carrier of the factor V Leiden mutation, another patient carried the prothrombin G20210A variant, and one patient was double heterozygous for the two mutations, whereas two control subjects were heterozygous for the factor V Leiden mutation and three for the prothrombin G20210A mutation ($P > 0.5$).

The mean levels of APC and TM were significantly lower in the 39 patients with Behçet's disease than in the 78 control subjects, whereas the levels of protein S, AT, α_1 AT, fibrinogen, factor VIII, VWF and CRP were significantly higher in patients than in controls (Table II). When the two

Table I. Clinical characteristics of the study subjects.

Characteristics	Behçet's patients (%) (<i>n</i> = 39)	Controls (%) (<i>n</i> = 78)	<i>P</i>
Age, years (mean \pm SD)	42.4 \pm 12.1	41.8 \pm 11.3	0.896
Male	48.7	48.7	1.000
Smokers	28.2	38.4	0.296
Mouth ulcers	100		
Genital ulcers	77		
Arthralgia	67		
Fever	51		
Ocular involvement	49*		
Cutaneous involvement	44†		
Thrombotic events	31		
Neurological events	28‡		
Gastrointestinal involvement	13		

*Ten patients with posterior uveitis, four with anterior uveitis and five patients with others.

†Twelve patients with pseudofolliculitis, seven with erythema nodosum, two with vasculitis and four with others.

‡Central nervous system (12 patients) and peripheral nervous system (one patient).

Table II. Coagulation parameters in patients and controls.

Parameter	Patients (<i>n</i> = 39)	Controls (<i>n</i> = 78)	<i>P</i>
Activated protein C (ng/ml)	0.74 ± 0.18	1.19 ± 0.35	<0.001
Protein C inhibitor (%)	96 ± 19	100 ± 24	0.366
APC:PCI complexes (ng/ml)	0.58 ± 0.27	0.67 ± 0.41	0.159
Thrombomodulin (ng/ml)	20.0 ± 13.5	27.7 ± 12.3	0.008
Protein C (U/ml)	1.10 ± 0.22	1.04 ± 0.16	0.095
Protein S (U/ml)	1.16 ± 0.25	1.02 ± 0.19	0.002
Antithrombin (U/ml)	1.06 ± 0.10	1.00 ± 0.13	0.039
α ₁ -antitrypsin (μmol/l)	33.3 ± 7.8	95 ± 22	0.001
Fibrinogen (g/l)	3.00 ± 0.68	2.66 ± 0.69	0.012
Factor VIII (U/dl)	130 ± 53	96 ± 24	<0.001
von Willebrand factor (U/dl)	131 ± 64	97 ± 36	0.004
C-reactive protein (mg/l)	2.3 (1.1–6.3)	1.4 (0.9–1.9)	<0.001

Data are expressed as mean ± SD, except for C-reactive protein that is expressed as median (interquartile range).

patients carrying the factor V Leiden mutation were excluded from the calculations, these differences did not change significantly.

In patients, there was a positive correlation between APC and TM levels ($r = 0.456$, $P = 0.004$). Among controls, there was a positive correlation between APC and protein C levels ($r = 0.374$, $P = 0.001$) and smoking ($r = 0.263$, $P = 0.048$),

and a negative correlation between APC and CRP levels ($r = -0.438$, $P < 0.001$).

Table III shows the influence of different treatments on the parameter levels studied. Inflammation markers were, in general, lower in patients who were not under treatment for Behçet's disease, but the differences were not statistically significant. Although APC levels in the subset of patients treated with immunosuppressors were lower than in the other two subgroups, APC levels in the three subgroups of patients were lower than in the control group ($P < 0.001$ in all cases).

Among patients with Behçet's disease, APC levels were lower in those with a history of VTE than in those without VTE history (Table IV). Although TM was lower in patients with VTE, the difference did not reach statistical significance. PCI levels were lower in patients who had had VTE. Although protein C, protein S, α₁AT, factor VIII, VWF and CRP levels were higher in VTE patients than in those without VTE, the difference was not statistically significant. VTE risk was two times higher in males than in females. Nine patients with VTE (75%) and 10 without VTE (37%) had an APC level below 0.75 ng/ml, the 10th percentile of the control group, indicating that, in patients with Behçet's disease, APC levels below 0.75 ng/ml increased the risk of VTE about fivefold (OR = 5.1; 95% CI = 1.1–23.4). When adjusting for age, sex, smoking, CRP levels and the presence of thrombophilic mutations, the OR was 7.3 (1.2–19.5).

Table III. Coagulation parameters in patients according to treatment.

Parameter	Treatment		
	A None (<i>n</i> = 13)	B Anti-inflammatory* (<i>n</i> = 17)	C Immunosuppressor† (<i>n</i> = 9)
Age, years	39 (34–47)	46 (39–51)	33 (28–47)
Sex (% of males)	49	29	56
Activated protein C (ng/ml)	0.83 (0.71–0.88)	0.81 (0.66–0.90)	0.60 (0.46–0.75)
Protein C inhibitor (%)	100 (91–106)	101 (82–110)	87 (82–105)
APC:PCI complexes (ng/ml)	0.54 (0.39–0.64)	0.54 (0.39–0.72)	0.48 (0.42–0.67)
Thrombomodulin (ng/ml)	20 (13–23)	17 (9–22)	16 (10–34)
Protein C (U/ml)	1.10 (0.99–1.19)	1.12 (0.99–1.32)	1.01 (0.79–1.17)
Protein S (U/ml)	1.20 (1.00–1.39)	1.11 (1.01–1.24)	1.13 (0.97–1.24)
Antithrombin (U/ml)	1.03 (1.00–1.14)	1.02 (0.96–1.09)	1.03 (1.01–1.15)
α ₁ -antitrypsin (μmol/l)	30.9 (26.4–36.3)	32.7 (29.1–38.7)	33 (29.7–37.8)
Fibrinogen (g/l)	2.65 (2.13–3.19)	3.01 (2.80–3.37)	3.00 (2.66–3.51)
Factor VIII (U/dl)	107 (85–131)	135 (81–172)	118 (97–170)
von Willebrand factor (U/dl)	112 (68–133)	107 (74–203)	144 (82–184)
C-reactive protein (mg/l)	2.5 (0.8–3.7)	3.2 (1.4–8.7)	2.0 (1.6–6.8)

Except for sex, data are expressed as median (interquartile range).

*Corticosteroids (*n* = 7), colchicine (*n* = 5) or both (*n* = 5).

†Ciclosporin alone (*n* = 3) or combined with corticosteroids (*n* = 4) or colchicine (*n* = 2).

Statistical significance (Mann–Whitney *U*-test):

A vs. B: fibrinogen, $P = 0.024$. For all other parameters, $P > 0.20$.

A vs. C: activated protein C, $P = 0.010$. For all other parameters, $P > 0.05$.

B vs. C: activated protein C, $P = 0.038$. For all other parameters, $P > 0.05$.

Parameter	Patients with thrombosis (<i>n</i> = 12)	Patients without thrombosis (<i>n</i> = 27)	<i>P</i>
Age, years	41 (34–54)	42 (35–55)	0.738
Sex (% of males)	50	69	0.176
Activated protein C (ng/ml)	0.68 (0.48–0.79)	0.81 (0.69–0.90)	0.034
Protein C inhibitor (%)	87 (75–101)	101 (86–107)	0.025
APC:PCI complexes (ng/ml)	0.55 (0.49–0.66)	0.59 (0.41–0.78)	0.542
Thrombomodulin (ng/ml)	16.2 (7.6–22.4)	22.1 ± 15.3	0.329
Protein C (U/ml)	1.18 (1.05–1.32)	1.05 (0.90–1.20)	0.117
Protein S (U/ml)	1.18 (1.02–1.37)	1.11 (1.01–1.21)	0.369
Antithrombin (U/ml)	1.06 (1.03–1.20)	1.03 (1.00–1.13)	0.819
α_1 -antitrypsin (μ mol/l)	34.2 (29.1–45.3)	32.7 (27.3–37.5)	0.394
Fibrinogen (g/l)	3.07 (2.51–3.27)	3.11 (2.62–3.35)	0.831
Factor VIII (U/dl)	145 (91–195)	118 (89–139)	0.128
von Willebrand factor (U/dl)	135 (103–211)	108 (67–151)	0.094
C-reactive protein (mg/l)	2.9 (1.7–6.2)	1.9 (1.1–8.6)	0.447

All data, except C-reactive protein, were normally distributed in both subgroups. Nevertheless, given the small sample sizes, data are expressed as median (interquartile range) and statistical significance was assessed by the Mann–Whitney *U*-test.

Discussion

Our results show that plasma APC level is significantly reduced in Behçet's disease. More remarkably, APC levels were significantly lower in patients with a history of VTE than in asymptomatic patients. As a low APC level is a risk factor for VTE (España *et al*, 2001), these results suggest that the reduced APC level seen in patients with Behçet's disease might be related to the high incidence of VTE seen in these patients. In fact, patients with APC levels below 0.75 ng/ml (the 10th percentile of the control group) had five times more risk of VTE than those with APC levels above that cut-off point.

Venous thromboembolism risk was higher in male than in female patients with Behçet's disease, which agrees with the fact that the disease is more severe in males (Toydemir *et al*, 2000).

The levels of TM were significantly lower in patients than in controls and, among patients, lower in those with a history of VTE. Demiret *et al* (2000) also reported that TM levels were lower in patients with Behçet's disease than in healthy individuals, and Gurgey *et al* (1998) have reported reduced levels of TM in patients with Behçet's disease compared with healthy subjects, but only in those who were carriers of the factor V Leiden mutation. We only had two patients with the factor V Leiden mutation. When both patients were excluded from the calculations, the group of patients with VTE still showed a mean TM level lower than that observed in patients without VTE. In contrast, several authors have reported increased levels of TM in patients with Behçet's disease compared with healthy individuals (Boehme *et al*, 1996; Haznedaroglu *et al*, 1996; Espinosa *et al*, 2002). These differences could be due to a different disease activity status in different series (Espinosa *et al*, 2002). In healthy subjects, a reduced level of soluble TM may reflect a lower TM expression

Table IV. Coagulation parameters in patients with or without venous thromboembolism.

(Salomaa *et al*, 1999), which could result in a lower protein C activation rate and a reduced plasma APC level. Proinflammatory mediators have been reported to suppress endothelial TM expression and thus may reduce the level of soluble TM (Moore *et al*, 1987; Archipoff *et al*, 1991). The positive correlation between APC and TM levels in patients supports this hypothesis. Reduced TM expression might be caused by gene mutations or by a modulation of its expression by components associated with the disease. An association between mutations in the TM gene and increase in the risk of thrombosis has been described (Norlund *et al*, 1997; Ohlin *et al*, 1997; Le Flem *et al*, 1999, 2001). On the contrary, TM expression can be modified by endotoxin, interleukin-1 or tumour necrosis factor- α (Moore *et al*, 1987; Conway & Rosenberg, 1988), which may be increased in patients with Behçet's disease caused by inflammation. Therefore, the chronic inflammation that occurs in patients with Behçet's disease, as evidenced by the increase in CRP, α_1 AT, fibrinogen and VWF levels, might induce a down-regulation of TM expression and a lower APC generation.

The fact that *in vivo* circulating APC:PCI complex levels were similar or even lower in patients than in controls supports our hypothesis that the low APC levels seen in patients is the result of a reduced activation of protein C on the endothelium.

Protein C inhibitor and α_1 AT are the major plasma APC inhibitors (Heeb *et al*, 1989), and elevated α_1 AT levels may reduce the levels of circulating APC (España *et al*, 1996; Mezzano *et al*, 2001). However, although the levels of α_1 AT were significantly increased in patients with Behçet's disease, patients with and without a history of VTE had similar α_1 AT levels, and no significant correlation was found between APC and α_1 AT in patients, indicating that the reduced APC levels in patients with VTE compared with those without VTE is not

due to the effect of increased inhibitor concentrations. We have previously reported that the influence of α_1 AT on plasma APC levels is significant only when α_1 AT levels increase to 200% (España *et al*, 1996). On the contrary, an increase in plasma PCI could account for the reduced levels of APC observed in patients. However, PCI levels were similar in patients and controls. Among patients, PCI was even lower in those with a history of VTE who had lower APC levels. Therefore, the reduced APC levels observed in patients with VTE may not be explained by an increase in PCI levels. The reduction in PCI levels observed in patients with a history of VTE could reflect the higher hypercoagulability in these patients (Taberner *et al*, 1990; España *et al*, 1991).

To determine whether the treatment of Behçet's disease influences the levels of the different parameters studied, patients were grouped into three subgroups according to treatment: patients under no treatment, patients taking anti-inflammatory drugs alone, and patients receiving immunosuppressors with or without anti-inflammatory drugs. Although patients treated with immunosuppressors had lower APC levels than the other two subsets of patients, all three subgroups showed APC levels significantly lower than those of the control group. Thus, the drugs used for treatment of the disease may not explain the reduced APC and TM levels observed in these patients.

In conclusion, our results show that patients with Behçet's disease have reduced APC levels that may explain the high incidence of VTE seen in these patients.

Acknowledgements

This work was supported in part by research grants from Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III, FIS, PI020125 and PI020136), Madrid, and from Generalitat Valenciana-Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología (Grupos 03/010), Valencia, Spain.

References

- Archipoff, G., Beretz, A., Freyssinet, J.-M., Klein-Soyer, C., Brisson, C. & Cazanave, J.P. (1991) Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin on inducible tissue factor activities on the surface of human saphenous vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumor necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochemical Journal*, **273**, 679–684.
- Boehme, M.W., Schmitt, W.H., Youinou, P., Stremmel, W.R. & Gross, W.L. (1996) Clinical relevance of elevated serum thrombomodulin and soluble E-selectin in patients with Wegener's granulomatosis and other systemic vasculitides. *American Journal of Medicine*, **101**, 387–394.
- Chafa, O., Fischer, A.M., Meriane, F., Chellali, T., Stenberg, C., Otmani, F. & Benabadi, M. (1992) Behçet's syndrome associated with protein S deficiency. *Thrombosis and Haemostasis*, **67**, 1–3.
- Chajek, T. & Fainaru, M. (1975) Behçet's disease: report of 41 cases and a review of the literature. *Medicine*, **54**, 179–196.
- Conway, E.M. & Rosenberg, R.D. (1988) Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, **8**, 5588–5592.
- Demir, S., Sengül, N., Yerdel, M.A., Tuzuner, A., Ulus, A.T., Gurler, A., Bergqvist, D., Siegbahn, A. & Karacagil, S. (2000) Haemostasis in patients with Behçet's disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, **19**, 570–574.
- España, F. (1991) Complexes of activated protein C with its inhibitors. In: *Protein C Pathway* (ed. by J. Aznar & F. España), pp. 61–75. Springer-Verlag, Barcelona.
- España, F. & Griffin, J.H. (1989) Determination of functional and antigen protein C inhibitor and its complexes with activated protein C in plasma by ELISAs. *Thrombosis Research*, **55**, 671–682.
- España, F., Estellés, A., Aznar, J. & Gilabert, J. (1986) Assay of protein C in human plasma: comparison of amidolytic, coagulation and immunochemical assays. *Thrombosis Research*, **44**, 771–782.
- España, F., Estellés, A., Griffin, J.H. & Aznar, J. (1991) Interaction of plasma kallikrein with protein C inhibitor in purified mixtures and in plasma. *Thrombosis and Haemostasis*, **65**, 46–51.
- España, F., Zuazu, I., Vicente, V., Estellés, A., Marco, P. & Aznar, J. (1996) Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays – enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thrombosis and Haemostasis*, **75**, 56–61.
- España, F., Vayá, A., Mira, Y., Medina, P., Estellés, A., Villa, P., Falcó, C., Royo, M. & Aznar, J. (2001) Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, **86**, 1368–1373.
- Espinosa, G., Font, J., Tàssies, D., Vidaller, A., Deulofeu, R., López-Soto, A., Cervera, R., Ordinas, A., Ingelmo, M. & Reverter, J.C. (2002) Vascular involvement in Behçet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *American Journal of Medicine*, **112**, 37–43.
- Frezzato, M., Tosetto, A. & Rodeghiero, F. (1996) Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. *American Journal of Epidemiology*, **143**, 1257–1265.
- Gandrille, S., Alhenc-Gelas, M. & Aiach, M. (1995) A rapid screening method for the factor V Arg 506 Gln mutation. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **6**, 245–247.
- Gruber, A. & Griffin, J.H. (1992) Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood*, **79**, 2340–2348.
- Guermazi, S., Hamza, M. & Dellagi, K. (1997) Protein S deficiency and antibodies to protein S in patients with Behçet's disease. *Thrombosis Research*, **86**, 197–204.
- Gül, A., Aslantas, A.B., Tekinay, T., Koniçe, M. & Özçelik, T. (1999) Procoagulant mutations and venous thrombosis in Behçet's disease [letter]. *Rheumatology*, **38**, 1298–1299.
- Gurgey, A., Gurler, A., Oner, A.F., Mesci, L. & Kirazli, S. (1998) Thrombomodulin levels in Behçet's disease with and without the factor V Leiden mutation. *Clinical Rheumatology*, **17**, 186–188.
- Haznedaroglu, I.C., Ozdemir, O., Ozcebe, O., Dundar, S.V. & Kirazli, S. (1996) Circulating thrombomodulin as a clue of endothelial damage in Behçet's disease. *Thrombosis and Haemostasis*, **75**, 974–975.
- Heeb, M.J., España, F. & Griffin, J.H. (1989) Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood*, **73**, 446–454.
- Hull, R.G., Harris, E.N., Gharavi, A.E., Tincani, A., Asherson, R.A., Valesini, G., Denman, A.M., Froude, G. & Hughes, G.R. (1984)

- Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behçet's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **43**, 746–748.
- International Study Group for Behçet's disease (1990) Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*, **335**, 1078–1080.
- Jorquera, J.I., Montoro, J.M., Fernández, M.A., Aznar, J.A. & Aznar, J. (1994) Modified test for activated protein C resistance. *Lancet*, **344**, 1162–1163.
- Kaklamani, V.G., Vaiopoulos, G. & Kaklamanis, P.G. (1998) Behçet disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **27**, 197–217.
- Koç, Y., Güllü, I., Akpek, G., Akpolat, T., Kansu, E., Kiraz, S., Batman, F., Kansu, T., Balkauci, F. & Akkaya, S. (1992) Vascular involvement in Behçet's disease. *Journal of Rheumatology*, **19**, 402–410.
- Le Flem, L., Picard, V., Emmerich, J., Gandrille, S., Fiessinger, J.N., Aiach, M. & Alhenc-Gelas, M. (1999) Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **19**, 1098–1104.
- Le Flem, L., Mennen, L., Aubry, M.L., Aiach, M., Scarabin, P.Y., Emmerich, J. & Alhenc-Gelas, M. (2001) Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis, and varicose veins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 445–451.
- Lee, Y.J., Kang, S.W., Yang, J.I., Choi, Y.M., Sheen, D., Lee, E.B., Choi, S.W. & Song, Y.W. (2002) Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behçet's disease. *Thrombosis Research*, **106**, 19–24.
- Lenk, N., Ozet, G., Alli, N., Coban, O. & Erbas, S. (1998) Protein C, and protein S activities in Behçet's disease as risk factors of thrombosis. *International Journal of Dermatology*, **37**, 124–125.
- Mader, R., Ziv, M., Adawi, M., Mader, R. & Lavi, I. (1999) Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinical manifestations in Behçet's disease. *Journal of Rheumatology*, **26**, 2404–2408.
- Mammo, L., Al-Dalaan, A., Bahabri, S.S. & Saour, J.N. (1997) Association of factor V Leiden with Behçet's disease. *Journal of Rheumatology*, **24**, 2196–2198.
- Mezzano, D., España, F., Panes, O., Medina, P., Pais, E., Marshall, G., Tagle, R., Downey, P., Caceres, S., Gonzalez, F., Quiroga, T. & Pereira, J. (2001) Increased activation of protein C, but lower plasma levels of free, activated protein C in uraemic patients: relationship with systemic inflammation and hemostatic activation. *British Journal of Haematology*, **113**, 905–910.
- Moore, K.L., Andreoli, S.P., Esmon, N.L., Esmon, C.T. & Bang, N.U. (1987) Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, **79**, 124–130.
- Nalçacı, M. & Pekçelen, Y. (1998) Antithrombin II, protein C and protein S plasma levels in patients with Behçet's disease. *Journal of International Medical Research*, **26**, 206–208.
- Norlund, L., Zoller, B. & Ohlin, A.K. (1997) A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**, 1164–1166.
- Ohlin, A.K., Norlund, L. & Marlar, R.A. (1997) Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**, 396–400.
- Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H. & Bertina, R.M. (1996) A common genetic variant in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis. *Blood*, **88**, 3698–3703.
- Sakane, T., Takeno, M., Suzuki, N. & Inaba, G. (1999) Behçet's disease. *New England Journal of Medicine*, **341**, 1284–1291.
- Salomaa, V., Matei, C., Aleksic, N., Sansores-García, L., Folsom, A.R., Juneja, H., Chambless, L.E. & Wu, K.K. (1999) Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet*, **353**, 1729–1734.
- Taberner, D., España, F., Vicente, V., Estellés, A., Gilibert, J. & Aznar, J. (1990) Protein C inhibitor and other components of the protein C pathway in patients with acute deep vein thrombosis during heparin treatment. *Thrombosis and Haemostasis*, **63**, 380–382.
- Toydemir, P.B., Elhan, A.H., Tükün, A., Toydemir, R., Gurlen, A., Tuzuner, A. & Bokesoy, I. (2000) Effects of factor V gene G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase gene C667T, and prothrombin gene G20210A mutations on deep venous thrombogenesis in Behçet's disease. *Journal of Rheumatology*, **27**, 2849–2854.
- Vayá, A., Forner, M.J., Estellés, A., Villa, P., Mira, Y., Ferrando, F., García-Fuster, J.M., Oliver, V. & Aznar, J. (2000) Intracardiac thrombosis in a case of Behçet's disease associated with the prothrombin 20210G-A mutation. *Haematologica*, **85**, 425–428.
- Villa, P., Iborra, J., Serra, J., Gilsanz, A., Casaña, P., Aznar, J.A. & Aznar, J. (2001) Evaluation of an automated method for the quantification of von Willebrand factor antigen. Its application in the study of vascular dysfunction. *Haematologica*, **86**, 1180–1185.

Haemorheological alterations in Behçet's disease are not related to a tendency for venous thrombosis.

Thrombosis Research 2005;115: 399-404

Factor de impacto: 1,541

José M^a Ricart, Amparo Vayá*, José Todolí**, Javier Calvo***, M^a Teresa Contreras*, Francisco España****, Justo Aznar*, Dolores Corella*****

Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia

** : Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe. Valencia

***: Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario. Valencia

****: Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*****: Departamento de Medicina Preventiva. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia



REGULAR ARTICLE

Haemorheological alterations in Behçet's disease are not related to a tendency for venous thrombosis

Jose M^a Ricart, Amparo Vaya*, José Todolí, Javier Calvo,
M. Teresa Contreras, Francisco España, Justo Aznar, Dolores Corella

Hemorheology and Thrombosis Unit, Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

Received 27 May 2004; received in revised form 9 August 2004; accepted 25 August 2004
Available online 28 September 2004

KEYWORDS

Behçet's disease;
Hemorheology;
Thrombosis

Abstract

Introduction: Behçet's disease is associated with an increased risk of thrombosis, although the prothrombotic mechanisms are unclear. Alterations in blood rheology, particularly increased erythrocyte aggregation, might play a role in the development of such thrombotic events. **Materials and methods:** We measured plasma lipids, fibrinogen, haematocrit, erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability, blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte indexes in patients with a nonactive disease at sampling, and in a well-matched control group. The patient group comprised 42 patients with BD (21 male, 21 female aged 43 ± 12 years) and the control group comprised 46 healthy volunteers (23 male, 23 female aged 45 ± 13 years). Twelve of the 42 patients with BD had a previous documented history of deep vein thrombosis at least 6 months before entering the study, and the other 30 did not. **Results:** Compared with controls, patients showed statistically higher fibrinogen concentrations ($P=0.001$), plasma viscosity ($P=0.002$), blood viscosity ($P=0.006$) and erythrocyte aggregation, both at stasis ($P=0.001$) and at a low shear rate ($P=0.002$); the other rheological parameters were not statistically significant. No differences were observed in the rheological parameters when patients with and without previous thrombotic episodes were compared. **Conclusions:** Although patients with BD show a moderate hyperviscosity syndrome, possibly related to chronic inflammation, this does not seem to play a role in the development of thrombotic events.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3862714; fax: +34 96 1973089.
E-mail address: vaya_amp@gva.es (A. Vaya).

Introduction

Behçet's disease (BD) is a chronic multisystem inflammatory disorder characterized by recurrent oral and genital ulcers and uveitis [1]. It involves a variety of organs, including joints, the gastrointestinal tract, the skin and the central nervous and vascular systems [2]. The main histopathological finding in BD is vasculitis affecting large, medium or small vessels. Thrombotic complications have been reported in approximately 10–45% of patients with BD [3,4], manifested by both arterial and venous thromboses, although venous thromboses are more frequent [3–5], followed by superficial phlebitis [6]. Several factors have been studied to establish the aetiology of thrombosis in patients with BD, as the prothrombotic mechanisms are not clearly defined. These include hypercoagulability [7–15], hypofibrinolysis [16–20] and endothelial injury [21–24].

Alterations in blood rheology appear to increase the risk of developing both arterial and venous thromboses [25–27], although their influence on developing thromboses in patients with BD is poorly understood. Among the various haemorheological parameters, only increased erythrocyte aggregation has been suggested to play an important role in the development of thrombotic events in patients with BD [28]. This is the only study performed so far, and other rheological parameters, such as blood and plasma viscosity and erythrocyte deformability, which also play pivotal roles in determining blood fluidity, have not been measured. That study [28] classified patients with BD who suffered uveitis in the same group as those suffering deep vein thromboses, which may yield confounding results, as uveitis is an inflammatory process not necessarily related to venous thrombosis.

We aimed here to ascertain whether any rheological parameters might be involved in the pathogenesis of thrombotic events in patients with BD. The factors measured were fibrinogen concentration, haematocrit, erythrocyte aggregation, erythrocyte deformability, blood viscosity (BV) and plasma viscosity.

Methods

Patients and controls

The patient group comprised 42 patients with BD (21 male, 21 female, aged 43 ± 12 years) recruited from the records at La Fe and General Hospitals between 1990 and 2003. All patients fulfilled

three or more of the International Study Group criteria for the diagnosis of BD [29]. The mean duration of disease was 8.5 ± 5.9 years (range 1–15 years). The distribution of clinical manifestations from the onset of the disease had been as follows: mouth ulcers 100%; genital ulcers 74%; arthralgia 64%; fever 50%; ocular involvement 45% (33% uveitis and 12% others); cutaneous involvement 43%; thrombotic events 28%; neurological events 28% and gastrointestinal involvement 12%. Only one male patient presented at sampling with an ocular involvement, indicating an active phase of the disease. The other patients were inactive or showed minimum activity (mild aphthosis or arthralgia). Mild aphthosis was defined as the presence of some isolated aphthae in the 4 weeks before sampling, without other concomitant signs or symptoms of disease activity. Twelve of the 42 patients with BD had a documented history of deep vein thrombosis and the other 30 did not. Thromboses were located in the lower limbs ($n=7$), the iliac and caval vein plus pulmonary embolism ($n=1$), the cerebral sinus ($n=1$), the intracardiac area ($n=1$), the upper limbs ($n=1$) and in the lungs with associated ischaemic stroke ($n=1$). Four patients had suffered repeated episodes of superficial phlebitis; two had had more than one deep vein thrombotic episode and were therefore on long-term oral anticoagulant therapy with acenocoumarol. In these two patients, acenocoumarol was replaced with low molecular weight heparin 20 days before sampling; this was not administered on the day before sampling, but immediately after. None of the patients had malignancies, renal or hepatic dysfunction. Sampling took place at least 6 months after any thrombotic event. All thrombotic events had been assessed clinically and were confirmed using objective methods (Doppler ultrasonography, venography, computed tomography or magnetic resonance imaging).

The control group consisted of 46 healthy volunteers (23 male and 23 female aged 45 ± 13 years) matched for age and gender with the patients, and from the same geographical area. They were either members of the staff at our hospital or patients visiting our hospital for a medical checkup. The absence of previous thrombotic events was ruled out by means of a validated questionnaire [30]. Controls and patients were studied at the same time. Informed consent was obtained for all the participants, and the Ethics Committee of our hospital approved the study.

Height (m) and weight (kg) were recorded for all subjects and the body mass index (BMI) was

calculated (kg/m^2). Given the influence of cardiovascular risk factors on haemorheological profile, these were recorded for both groups. A subject was considered having a risk factor if they were obese ($\text{BMI}>30 \text{ kg}/\text{m}^2$), were a smoker (>1 cigarette/day) or if they had hypertension (diastolic blood pressure $>90 \text{ mm Hg}$), hyperlipidaemia (total cholesterol $>220 \text{ mg}/\text{dL}$ or triglycerides $>175 \text{ mg}/\text{dL}$), fasting glucose concentration $>126 \text{ mg}/\text{dL}$, or were receiving pharmacological treatments for hypertension, hyperlipidaemia or diabetes.

Blood collection

Blood was collected from the antecubital vein with a minimum stasis between 0800 and 1000 h after 12 h fasting, into vacuum tubes: dry for biochemical tests, with trisodium citrate for fibrinogen, and into EDTA K3 tubes for haematological and rheological tests. Rheological measurements were performed in duplicate within 2 h after sampling, to avoid the deterioration of erythrocyte rheological properties [31]. Samples of patients and controls were processed simultaneously.

Laboratory methods

Total serum cholesterol, triglycerides and glucose were measured by enzymatic techniques in a Dax-72 autoanalyser (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, USA). Fibrinogen was determined using coagulometric techniques in an ACL-7000 autoanalyser (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Haematocrit was assessed using a microcentrifuge at $15000\times g$ for 7 min. Erythrocyte aggregation was measured in an erythrocyte aggregometer (Myrenne, Germany) at stasis (EA0) and at low shear rate of 3 s^{-1} (EA1) after adjusting the haematocrit to 45% with autologous plasma [32]. Plasma viscosity (PV) was determined in a capillary plasma viscosimeter (Fresenius, Germany) at 37°C [33]. Blood viscosity (BV) was measured in a Brookfield model DV III viscosimeter (Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA, USA) for 230 s^{-1} both at a native and a corrected haematocrit of 45%, at 37°C . Erythrocyte deformability (EI) was determined in a shear stress diffractometer (Rheodyn SSD, Myrenne) at 12, 30 and 60 Pa [34]. Because of the high correlation coefficient between these three values [35], only the results obtained at 60 Pa are given. Basic blood cell count and erythrocyte indexes (MCV, MCH, MCHC) were determined using a Sysmex NE 8.000 autoanalyser (TOA, Medical Electronics, Kobe, Japan).

Statistical analysis

All continuous variables were evaluated for normality of distribution. Triglycerides and glucose distributions were markedly skewed and these data were logarithmically transformed before statistical analysis. χ^2 tests were used to compare differences in percentages between patients and controls. Student's *t*-tests for independent groups were used to compare differences in age, BMI, glucose and lipid concentrations, and rheological variables between cases and controls. Mann–Whitney nonparametric tests were used to compare data between patients with and without thrombotic events. Correlations between rheological parameters were calculated using the bivariate Pearson correlation for patients and controls and with the Spearman test for thrombotic events in patients with BD. The data are expressed as means \pm one standard deviation (S.D.). A bilateral *P* value <0.05 was considered statistically significant. All analyses were calculated using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 10) for Windows.

Results

No statistically significant differences were observed between cases and controls regarding the percentage of hypertensive individuals (12.5 vs. 4.4; $P=0.246$), smokers (30.6 vs. 35.6; $P=0.586$) or obesity (5.0 vs. 5.8; $P=1.00$). One patient with BD was a heterozygous carrier of the factor V Leiden mutation, another carried the prothrombin G20210A variant, and one patient was doubly heterozygous for the two mutations. One control subject was a heterozygous carrier of the factor V Leiden mutation, and one for the prothrombin G20210A mutation ($P>0.5$).

When patients and controls were compared (Table 1), patients showed a statistically higher fibrinogen concentration ($P=0.001$), plasma viscosity ($P=0.002$), blood viscosity at corrected haematocrit ($P=0.006$) and erythrocyte aggregation both at stasis (EA0, $P=0.001$) and at a low shear rate (EA1, $P=0.002$). The other variables were not statistically significant.

No differences in haematimetric indexes were observed between patients and controls. Respectively, the figures were: MCV 86.33 ± 5.06 vs. 87.03 ± 4.65 fL ($P=0.294$); MCH 28.98 ± 1.80 vs. 29.55 ± 1.33 pg ($P=0.081$) and MCHC $33.58\pm 1.16\%$ vs. $33.86\pm 0.93\%$, ($P=0.169$). Statistically significant correlations were found between fibrinogen concentrations and the following rheological

Table 1 Age, gender, BMI, biochemical and rheological parameters in patients with Behçet's disease and in the control group

Variable	Patients (n=42)	Control group (n=46)	P
Age (years)	43±12	43±14	0.758
Gender (male/female)	21/21	23/23	1.000
BMI (kg/m ²)	24.6±3.7	24.1±3.2	0.558
Glucose (mg/dL)	89±16	87±18	0.949
T-Chol (mg/dL)	198±37	200±35	0.754
TG (mg/dL)	100±45	89±39	0.262
Htc (%)	40.5±3.5	41.3±3.5	0.320
Leu (×10 ⁹ /L)	7.4±2.8	6.6±1.1	0.083
Fbg (mg/dL)	310±98	245±52	0.001
PV (cP)	1.27±0.11	1.20±0.06	0.002
EA0	4.05±1.00	2.98±1.02	0.001
EA1	7.70±1.16	6.97±0.99	0.002
El60 (%)	57.20±3.06	56.69±4.30	0.543
BVn230s ⁻¹ (cP)	4.33±0.47	4.22±0.51	0.325
BVc230s ⁻¹ (cP)	4.80±0.41	4.57±0.31	0.006

T-Chol, total cholesterol; TG, triglycerides; Htc, haematocrit; Leu, leucocytes; Fbg, fibrinogen; PV, plasma viscosity; EA0, erythrocyte aggregation at stasis; EA1, erythrocyte aggregation at 3s⁻¹; El60, elongation index at 60 Pa; BVn230s⁻¹, blood viscosity at native haematocrit, 230s⁻¹; BVc230s⁻¹, blood viscosity at corrected haematocrit, 230s⁻¹.

variables: EA0 $r=0.329$, EA1 $r=0.378$, PV $r=0.525$ and BVc230s⁻¹ $r=0.415$ ($P<0.01$). No differences were observed within patients with BD in the rheological variables regarding their duration of disease (>8 or <8 years, Table 2). No differences were observed in rheological variables for uveitis (Fbg, PV, EA0, EA1 and BVc 230s⁻¹), when patients with BD who had had previous uveitis were compared with those who did not ($P=0.083$; $P=0.332$; $P=0.685$; $P=0.138$; $P=0.986$, respectively). No differences were observed in the rheological parameters when patients with and

Table 2 Age, gender and rheological parameters in patients with Behçet's disease related to the duration of the disease

Variable	<8 years (n=21)	>8 years (n=21)	P
Age (years)	37±10	47±12	0.012
Gender (male/female)	9/12	12/9	0.206
Fbg (mg/dL)	307±78	315±116	0.860
PV (cP)	1.26±0.9	1.28±0.13	0.839
EA0	3.89±0.91	4.20±1.1	0.507
EA1	7.63±1.11	7.78±1.23	0.694
BVc230s ⁻¹ (cP)	4.74±0.33	4.85±0.47	0.520

Fbg: fibrinogen; PV, plasma viscosity; EA0, erythrocyte aggregation at stasis; EA1, erythrocyte aggregation at 3s⁻¹; BVc230s⁻¹, blood viscosity at corrected haematocrit, 230s⁻¹.

Table 3 Age, gender and rheological parameters in patients with Behçet disease, with and without thrombosis

Variable	With thrombosis (n=12)	Without thrombosis (n=30)	P
Age (years)	43±16	42±10	0.836
Gender (male/female)	8/4	13/17	0.305
Fbg (mg/dL)	306±84	313±104	0.976
PV (cP)	1.31±0.17	1.25±0.08	0.487
EA0	3.66±0.81	4.21±1.05	0.095
EA1	7.25±1.18	7.90±1.12	0.138
BVc230s ⁻¹ (cP)	4.61±0.45	4.86±0.38	0.119

Fbg, fibrinogen; PV, plasma viscosity; EA0, erythrocyte aggregation at stasis; EA1, erythrocyte aggregation at 3s⁻¹; BVc230s⁻¹, blood viscosity at corrected haematocrit, 230s⁻¹.

without previous thrombotic events were compared (Table 3).

Discussion

Increased blood viscosity, plasma viscosity and red blood cell rheological alterations, such as increased erythrocyte aggregation or decreased erythrocyte deformability, may increase the risk for developing thrombotic events [25–27]. Rheological alterations have been poorly studied within the diverse prothrombotic mechanisms that might be involved in BD. In the present study, patients with BD showed a slight hyperviscosity syndrome characterized by a statistically significant increase in blood viscosity at corrected haematocrit ($P=0.006$), plasma viscosity ($P=0.002$), fibrinogen concentration ($P=0.001$) and erythrocyte aggregation both at stasis ($P=0.001$) and at a low shear rate ($P=0.002$), when compared with a well-matched control group. These results are understandable given that BD is a chronic inflammatory vascular disease with increased fibrinogen concentrations [16,20,36] and consequently increased plasma viscosity and blood viscosity. The increased erythrocyte aggregation observed in patients with BD also seems to be related to increased fibrinogen concentrations, as plasma lipids (both total cholesterol and triglycerides), which are also known to favour erythrocyte aggregation [37–39], were not statistically increased when compared with controls. Erythrocyte deformability was not decreased at any of the shear stresses tested, although other degenerative and inflammatory vascular diseases show less deformable erythrocytes [40,41].

We emphasize that the rheological alterations observed in these patients with BD were present

even when they are not in an active disease state. In addition, the altered rheological profile was not related to the time elapsed since the onset of the disease (duration of the disease), and this is in accord with the chronic inflammatory nature of the disease. However, when patients with BD were classified according to whether they had suffered previous thrombotic events, none of the parameters analysed showed any statistically significant difference, suggesting that alterations in rheological parameters do not seem to contribute to the development of thrombotic events in these patients.

The only study that has determined erythrocyte aggregation in patients with BD as an indicator for an aggressive clinical course of the disease is that published by Demiroglu et al. [28]. This reported that patients with BD who developed thrombosis showed higher erythrocyte aggregation levels than those who did not, suggesting that this rheological parameter could be used as an indicator of thrombotic risk. As that author performed erythrocyte aggregation measurements with the same model instrument as that used in the present study, differences in results cannot be attributed to methodology. An important criticism about the study is that the authors included uveitis in the same group as deep vein thrombosis, which we consider inadequate as uveitis is an inflammatory process not necessarily related to vein thrombosis: this thus may cause confounding results. Moreover, in the present study, when patients with BD who had had uveitis were compared with those who did not, no differences in the rheological profile were observed, indicating that if patients with BD with uveitis had been included in the group of patients with BD with thrombosis, results would not have changed. Another important point to make is that the authors [28] did not observe increased fibrinogen concentrations in those patients who showed higher erythrocyte aggregation, and thus the mechanisms for increased erythrocyte aggregation were not clearly defined. In the present study, given the correlation between erythrocyte aggregation and fibrinogen concentrations, it would seem reasonable to argue that the former was mainly caused by increased fibrinogen concentrations.

In conclusion, the results indicate that patients with BD show moderate blood hyperviscosity, similar to that observed in other forms of vasculitis, such as lupus erythematosis [42,43]. However, none of the rheological parameters analysed seem to be involved in the development of thrombotic events in these patients. Studies with

a larger number of patients are needed to evaluate rheological parameters in patients with BD complicated with venous and also arterial thrombotic events to confirm our rheological results and if altered, their lack of effect in potentiating thrombotic risk. Such studies should include a 'diseased control' group (i.e., patients with other inflammatory disorders, but without increased thrombotic tendencies) to ascertain whether rheological alterations are related to thrombotic events.

References

- [1] Behçet H. Über rezidivierende Aphthöse durch ein virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge, und an den Genitalien. *Dermatol Wochenschr* 1937;105:1152–7.
- [2] Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behçet disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:197–217.
- [3] Koc Y, Güllü I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, et al. Vascular involvement in Behçet's disease. *J Rheumatol* 1992;19:402–10.
- [4] Lie JT. Vascular involvement in Behçet's disease: arterial and venous and vessels of all sizes. *J Rheumatol* 1992;19:341–3.
- [5] Kiraz S, Ertenli I, Öztürk MA, Haznedaroglu IC, Çelik I, Çalgüneri M. Pathological haemostasis and prothrombotic state in Behçet's disease. *Thromb Res* 2002;105:125–33.
- [6] Kuzu MA, Ozaslan C, Koksoy C, Gurler A, Tuzuner A. Vascular involvement in Behçet's disease: 8 year audit. *World J Surg* 1994;18:948–54.
- [7] Mader R, Ziv M, Adawi M, Mader R, Lavi I. Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinical manifestations in Behçet's disease. *J Rheumatol* 1999;26:2404–8.
- [8] Chafa O, Fischer AM, Meriane F, Chellali T, Stenberg C, Otmani F, et al. Behçet's syndrome associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1992;67:1–3.
- [9] Guermazi S, Hamza M, Dellagi K. Protein S deficiency and antibodies to protein S in patients with Behçet's disease. *Thromb Res* 1997;86:197–204.
- [10] Mammo L, Al-Dalaan A, Bahabri SS, Saour JN. Association of factor V Leiden with Behçet's disease. *J Rheumatol* 1997;24:2196–8.
- [11] Toydemir PB, Elhan AH, Tükün A, Toydemir R, Gurten A, Tuzuner A, et al. Effects of factor V gene G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase gene C667T, and prothrombin gene G20210A mutations on deep venous thrombogenesis in Behçet's disease. *J Rheumatol* 2000;27:2849–54.
- [12] Vayá A, Forner MJ, Estellés A, Villa P, Mira Y, Ferrando F, et al. Intracardiac thrombosis in a case of Behçet's disease associated with the prothrombin 20210G-A mutation. *Haematologica* 2000;85:425–8.
- [13] Gül A, Aslantas AB, Tekinay T, Koniçe M, Özçelik T. Procoagulant mutations and venous thrombosis in Behçet's disease [letter]. *Rheumatology* 1999;38:1298–9.
- [14] Lee YJ, Kang SW, Yang JI, Choi Y-M, Sheen D, Lee EB, et al. Coagulation parameters and plasma total homocysteine concentrations in Behçet's disease. *Thromb Res* 2002;106:19–24.
- [15] Ates A, Düzgün N, Ulu A, Tiryaki AOA. Factor V gene (1691A and 4070G) and prothrombin gene 20210A mutations in

- patients with Behçet's disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;**33**:157–63.
- [16] Hampton KK, Chamberlain MA, Menon DK, Davies JA. Coagulation and fibrinolytic activity in Behçet's disease. *Thromb Haemost* 1991;**66**:292–4.
- [17] Espinosa G, Font J, Tàssies D, Vidaller A, Deulofeu R, López-Soto A, et al. Vascular involvement in Behçet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002;**112**:37–43.
- [18] Aitchison R, Chu P, Cater DR, Harris RJ, Powell RJ. Defective fibrinolysis in Behçet's syndrome: significance and possible mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1989;**48**:590–3.
- [19] Miyata M, Sakata Y, Madoiwa S, Sato K, Munakata O, Yoshioka R, et al. Recurrent multiple thrombosis in a patient with abnormal plasminogenemia and Behçet's disease. *Thromb Res* 1999;**95**:347–51.
- [20] Demirer S, Sengül N, Yerdel MA, Tuzuner A, Ulus AT, Gurler A, et al. Haemostasis in patients with Behçet's disease. *Eur J Vasc Surg* 2000;**19**:570–4.
- [21] Haznedaroglu IC, Ozdemir O, Ozcebe O, Dundar SV, Kirazli S. Circulating thrombomodulin as a clue of endothelial damage in Behçet's disease. *Thromb Haemost* 1996;**75**:974–5.
- [22] Haznedaroglu S, Karaaslan Y, Büyüksakik Y, Kosar A, Özcebe IC, Haznedaroglu IC, et al. Selectin adhesion molecule in Behçet's disease. *Ann Rheum Dis* 2000;**59**:61–3.
- [23] Ozoran K, Duzgun H, Gurler A, Tutkak H, Tokgoz G. Plasma von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and antithrombin III concentrations in Behçet's disease. *Scand J Rheumatol* 1995;**24**:376–82.
- [24] Özcebe O, Haznedaroglu IC, Özdemir O, Saynalp NM, Dünder S, Kirazli S. Soluble thrombomodulin and fibrinolysis in Behçet's disease. *Med Princ Pract* 1996;**5**:146–50.
- [25] Rosenson RS. Viscosity and ischemic heart disease. *J Vasc Med Biol* 1993;**4**:206–12.
- [26] Lowe GDO, Lee AJ, Rumley A, Proce JF, Fowkes FGR. Blood viscosity and the risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 1997;**96**:168–73.
- [27] Demiroglu H. The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology. Considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders. *Blood* 1997;**89**:4236.
- [28] Demiroglu H, Yalçin S, Büyüksakik Y, Özcebe, Dünder S. Increased erythrocyte aggregation as an indicator for an aggressive clinical course in Behçet's disease: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 1998;**57**:694–6.
- [29] International Study Group for Behçet's disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990;**335**:1078.
- [30] Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. *Am J Epidemiol* 1996;**143**:1257–65.
- [31] International Committee for Standardization in Haematology, Expert Panel on Blood Rheology F. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1986;**6**:439–53.
- [32] Schmid-Schönbein H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H, Daver V, Heilmann L. New hemorheological techniques for the routine laboratory. *Clin Hemorheol* 1983;**2**:93–105.
- [33] Jung F, Roggenkamp HG, Scheider R, Kiesewetter H. Das Kapillarschlauch-Plasmaviskosimeter ein neues Messgerät zur Quantifizierung der Blutplasmaviskosität. *Biomed Tech* 1983;**28**:249–52.
- [34] Ruef P, Pöschl JMB, Linderkamp O. The Rheodyn SSD for measuring erythrocyte deformability. *Biorheology* 1995;**32**:357–8.
- [35] Schmid-Schönbein H, Ruef P, Linderkamp O. The shear stress diffractometer rheodyn SSD for determination of erythrocyte deformability: I. Principles of operation and reproducibility. *Clin Hemorheol* 1993;**13**:447–57.
- [36] Özatli D, Sayinalp N, Buyukasik Y, Karakus S, Haznedaroglu S, Kirazli S, et al. Unchanged global fibrinolytic capacity despite increased factor VIIa activity in Behçet's disease: evidence of a prethrombotic state. *Rheumatol Int* 2002;**21**:137–40.
- [37] Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993;**72**:119–26.
- [38] Razavian SM, Atger V, Giral P, Cambillau M, Del Pino M, Simon A, et al. for the PCV-METRA Group. Influence of HDL subfractions on erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic men. *Arterioscler Thromb* 1994;**14**:361–6.
- [39] Simon E, Razavian SM, Le Veyec J, Atger V, Paul JL, Simon A, et al. Influence of lipoprotein subfractions on dextran- and fibrinogen-induced erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol* 1995;**15**:667–76.
- [40] Lau CS, Saniabadi AR, Belch JJ. Reduced red blood cell deformability in patients with rheumatoid vasculitis. Improvement after in vitro treatment with dipyridamole. *Arthritis Rheum* 1995;**38**:248–53.
- [41] Cortonovis A, Crippa A, Crippa M. Relationship between hemorheology and pro- and anti-coagulation factors in inflammatory and degenerative vascular diseases. *Minerva Med* 1994;**85**:439–49.
- [42] Reid HL, De Ceulaer K. Abnormal plasma and serum viscosity in systemic lupus erythematosis (SLE): a Jamaican study. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999;**20**:175–80.
- [43] Rosenson RS, Shott S, Katz R. Elevated blood viscosity in systemic lupus erythematosis. *Semin Arthritis Rheum* 2001;**31**:52–7.



CORRIGENDUM

Corrigendum to “Haemorheological alterations in Behcet’s disease are not related to a tendency for venous thrombosis”
[Thromb. Res. 115 (2005) 399–404]

Jose Ma. Ricart, Amparo Vayá, José Todolí, Javier Calvo, M. Teresa Contreras, Francisco España, Dolores Corella, Justo Aznar

Received 11 March 2005; received in revised form 11 March 2005; accepted 11 March 2005

The authors regret that during the publication of the above article, the authors’ affiliations were incorrectly stated. The correct affiliations are reproduced below.

Jose Ma. Ricart^a, Amparo Vayá, José Todolí^b, Javier Calvo^c, M. Teresa Contreras, Francisco España, Dolores Corella^d, Justo Aznar

Hemorheology and Thrombosis Unit, Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^aDermatology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^bInternal Medicine Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain

^cRheumatology Service, General Hospital, Valencia, Spain

^dDepartment of Preventive Medicine, School of Medicine, Valencia, Spain

The author would like to apologise sincerely for any inconvenience caused.

DOI of original article: 10.1016/j.thromres.2004.08.028.

E-mail address: vaya_amp@gva.es2 (A. Vaya).

0049-3848/\$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.
 doi:10.1016/j.thromres.2005.03.024

Erythrocyte aggregation in Behcet's disease determined with the Sefam and Myrenne aggregometer. Lack of association with thrombosis and uveitis

Clinical Hemorheology and Microcirculation 2005; 33: 389-396

Factor de impacto: 0,630

José M^a Ricart, Amparo Vayá*, José Todolí**, M^a Luisa Santaolaria*,
Javier Calvo***, Justo Aznar*

Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe.
Valencia

** : Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe.
Valencia

***: Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario.
Valencia

Erythrocyte aggregation in Behçet's disease determined with the Sefam and Myrenne aggregometer. Lack of association with thrombosis and uveitis

José M. Ricart^a, Amparo Vayá^{b,*}, José Todolí^c, M. Luisa Santaolaria^b, Javier Calvo^d and Justo Aznar^b

^a *Dermatology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain*

^b *Hemorheology and Thrombosis Unit, Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain*

^c *Internal Medicine Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain*

^d *Rheumatology Service, General Hospital, Valencia, Spain*

Abstract. Behçet's disease (BD) is a chronic systemic vasculitis characterised by recurrent oral and genital ulcers and uveitis, in which 25–30% of patients develop thrombotic events of unknown etiology. In order to ascertain whether erythrocyte aggregation (EA) may be involved in thrombotic events and or uveitis in BD patients, we determined using two erythrocyte aggregometers i.e. Myrenne and Sefam (which provides the total disaggregation threshold, needed for erythrocytes to disaggregate), EA in 77 BD patients (42 male, 35 female, aged 44 ± 12 years) and 77 controls (41 male, 36 female, aged 43 ± 11 years). BD patients showed higher EA determined with both aggregometers: Myrenne (EA_0 : $P = 0.035$; EA_1 : $P < 0.001$) or the Sefam (Ta: $P < 0.001$, AI₁₀: $P < 0.001$, γ D: $P = 0.014$) as well as higher fibrinogen and triglyceride levels ($P < 0.001$, $P = 0.003$, respectively) compared with the control group. However no differences were observed in any of the aggregation parameters determined either with the Myrenne (EA_0 , EA_1) or the Sefam (Ta, AI₁₀, γ D) aggregometer when BD patients with thrombotic events ($n = 23$) or uveitis ($n = 21$) were compared with those who did not ($P > 0.05$). These results reinforce previous findings of our group, suggesting that EA does not seem to be involved in thrombotic events or in uveitis in BD patients.

Keywords: Erythrocyte aggregation, Behçet's disease, Sefam and Myrenne aggregometer, thrombosis, uveitis

1. Introduction

Behçet's disease (BD) is a chronic multisystemic inflammatory disorder characterised by recurrent oral and genital ulcers and uveitis [1,2]. Approximately 25–30% of patients show thrombotic events especially in the venous system [3,4], although their etiology remains unknown [5–7]. Within prothrombotic mechanisms, hemorheological alterations have been found to be associated with thrombotic events in arterial, venous or microcirculatory areas [8–11]. Red blood cell hyperaggregability is one of the

* Corresponding author: Amparo Vayá, MD, PhD, Hemorheology and Thrombosis Unit, Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Avda. Campanar 21, Valencia 46009, Spain. Tel.: +34 963862714; Fax: +34 96 1973109; E-mail: vaya_amp@gva.es.

more involved rheological alterations in deep vein thrombosis [12,13] myocardial infarction [14–16], as well as in other thrombotic sites [17,18]. The role played by red blood cell (RBC) hyperaggregability in thrombotic events in BD is a controversial issue as some authors [19] have found a link between them, while others have not [20,21]. This discrepancy may be due to the fact that the former included uveitis in the deep vein thrombotic group which might produce confounding results. In addition, in the above mentioned studies [19–21] EA in BD has been determined with the Myrenne aggregometer which only gives the aggregation index [22]. To date EA in BD has not been evaluated by means of the Sefam erythroaggregometer [23,24] which provides other aspects of the EA process such as aggregation time (Ta), aggregation extent (AI₁₀) and the total disaggregation threshold (γ D) i.e. the shear rate needed for erythrocytes to disaggregate.

The aim of the present study is to determine EA in a large group of patients with BD with two erythrocyte aggregometers i.e. Sefam and Myrenne and to compare it to a control group, as well as to assess the possible association between thrombotic events and EA, considering deep vein thrombosis and uveitis separately.

2. Methods

2.1. Patients and controls

The patient group comprised 77 patients (42 male, 35 female, aged 44 ± 12 years) with BD recruited from the records of La Fe, General and Peset Hospitals in Valencia between 1990 and 2005. All patients fulfilled three or more of the International Study Group criteria for the diagnosis of BD [25]. The mean duration of disease was 9.4 ± 6.3 years (range 1–24 years). From the 77 patients 22 had suffered deep vein thrombosis and/or phlebitis, and 2 of these patients had suffered in addition angina pectoris and ischaemic stroke. One patient had suffered an ischaemic stroke but no thrombosis in the venous system. The time elapsed since the thrombotic events was 6.4 ± 4.1 years (range 1–11 years). Sampling took place at least 6 months after any thrombotic event in order to avoid the reactant phase. Of the 77 BD patients 21 had presented with uveitis. When sampling, patients were not in an active phase of the disease, or with a minimum activity (mild aphthosis and/or arthralgias). None of the patients had malignancies, renal or hepatic dysfunction. All thrombotic events had been assessed clinically and were confirmed using objective methods (Doppler ultrasonography, venography, computed tomography or magnetic resonance imaging). Posterior uveitis was diagnosed by ophthalmic examination and fluorescein angiography.

The control group was made up of 77 subjects (41 male, 36 female, aged 43 ± 11 years) from the staff at La Fe Hospital or from the outpatient Dermatology Clinic due to having minimum dermatologic problems, such as seborrheic keratosis, warts or pityriasis versicolor. In these subjects, the absence of previous thrombotic events was ruled out by the Frezzato's [26] validated questionnaire.

Controls and patients were studied at the same time. Informed consent was obtained from all the participants, and the Ethics Committee of our hospital approved the study. Given the influence of cardiovascular risk factors on the hemorheological profile, these were recorded for both groups. Subjects were considered having a risk factor if they were obese (BMI > 30 kg/m²), were smokers (> 1 cigarette/day), or if they had hypertension (diastolic blood pressure > 90 mmHg), hyperlipidaemia (total cholesterol > 220 mg/dl or triglycerides > 175 mg/dl), fasting glucose concentration > 126 mg/dl, or were receiving pharmacological treatments for hypertension, hyperlipidaemia, or diabetes.

2.2. Blood collection

Blood was collected from the antecubital vein with a minimum stasis between 08:00–10:00 after 12 h fasting, into vacuum tubes: dry for biochemical tests, with trisodium citrate for fibrinogen, and into K3 EDTA for haematological and rheological tests. Erythrocyte aggregation was performed in duplicate within 2 h after sampling, to avoid the deterioration of erythrocyte rheological properties [27]. Samples of patients and controls were processed simultaneously.

2.3. Laboratory methods

Total serum cholesterol, triglycerides and glucose were measured by enzymatic techniques in a Dax-72 autoanalyser (Bayer Diagnostic, Tarrytown, NY, USA). Fibrinogen was determined using coagulometric techniques in an ACL-7000 autoanalyser (Instrumentation Laboratory, Milan, Italy). Haematocrit was assessed using a microcentrifuge at 15 000 *g* for 7 min. Erythrocyte aggregation was measured in an erythrocyte aggregometer (Myrenne GmbH Germany) at stasis (EA₀) and at low shear rate of 3 s⁻¹ (EA₁) after adjusting the haematocrit to 45% with autologous plasma [22]. In addition erythrocyte aggregation was also performed with the Sefam erythro-aggregometer [23,24]. It determines the aggregation time (Ta), the aggregation index at 10 sec (AI₁₀), i.e. a measurement of the extent of erythrocyte aggregation and the disaggregation threshold (γ D) i.e. the shear rate needed for erythrocytes to disaggregate. The temperature was adjusted to 37°C.

Basic blood cell count and erythrocyte indices (MCV, MHC, MCHC) were determined using a Sysmex NE 8.000 autoanalyser (TOA, Medical Electronics, Kobe, Japan).

2.4. Statistical analysis

All continuous variables were evaluated for normality of distribution. Glucose distribution was markedly skewed and this data was logarithmically transformed before statistical analysis. Student's *t*-tests for independent groups were used to compare differences in age, BMI, glucose, lipids, fibrinogen concentration and EA parameters between cases and controls and between BD patients with or without thrombosis and uveitis. Chi squared test was conducted to study the differences in percentages in cardiovascular risk factors between cases and controls and within BD patients with and without thrombosis and uveitis. Correlations between EA measurements obtained with both aggregometers and with them and Fbg, T-Chol and TG were calculated using the Pearson bivariate correlation. The data are expressed as mean \pm one standard deviation (SD). A bilateral *P* value <0.05 was considered statistically significant. All analyses were calculated using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 10) for Windows.

3. Results

No statistically significant differences were observed between cases and controls regarding the percentage of hypertensive individuals (19% vs. 10%, *P* = 0.064), smokers (33.8 vs. 32.5, *P* = 0.864) and obese (15% vs. 8% *P* = 0.178). The percentage of diabetics, 10% in cases vs. 2.6% in controls was borderline significant *P* = 0.047. The percentage of hyperlipemics was higher in cases 18.4% than in controls 4%, *P* = 0.011.

Table 1

Age, gender, BMI, biochemical and rheological parameters in patients with Behçet's disease and in the control group

	BD Patients (n = 77)	Control group (n = 77)	P
Age (years)	44 ± 12	43 ± 11	0.501
Gender (m/f)	42/35	41/36	0.881
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 4.5	25.2 ± 3.5	0.509
EA ₀	3.91 ± 0.96	3.58 ± 0.97	0.035
EA ₁	7.64 ± 1.24	6.95 ± 1.22	<0.001
Ta (s)	1.65 ± 0.51	2.23 ± 0.65	<0.001
AI ₁₀	49.8 ± 8	43.7 ± 8.9	<0.001
γD (s ⁻¹)	136 ± 130	87 ± 70	0.014
MCV (fl)	90.5 ± 5.1	90.2 ± 4.1	0.672
MCH (pg)	29.9 ± 2.1	30.1 ± 1.6	0.467
MCHC (g/dl)	33 ± 1.1	33.4 ± 0.7	0.026
Fbg (mg/dl)	327 ± 77	267 ± 54	<0.001
T-Chol (mg/dl)	213 ± 39	210 ± 34	0.572
TG (mg/dl)	130 ± 66	100 ± 57	0.003
Glu (mg/dl)	95 ± 18	99 ± 13	0.181

EA₀, erythrocyte aggregation at stasis; EA₁, erythrocyte aggregation at 3 s⁻¹; Ta, erythrocyte aggregation time; AI₁₀, aggregation index at 10 sec; γD (s⁻¹), total disaggregation threshold; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; Fbg, fibrinogen; T-Chol, total cholesterol; TG, triglycerides; Glu, glucose.

When BD patients with and without thrombosis and with and without uveitis were compared, no differences in the percentage of hyperlipemia or diabetes was observed $P = 0.623$ and $P = 0.663$, respectively.

Table 1 shows age, gender, BMI, erythrocyte aggregation indices, hematimetric indices, Fbg, T-Chol, TG and Glu levels in BD patients and controls. BD patients show statistically higher EA₀, EA₁, Ta (s), AI₁₀ and γD (s⁻¹) than controls ($P < 0.001$), as well as TG ($P = 0.003$). No differences were observed in the other parameters analysed.

Table 2 shows age, gender, erythrocyte aggregation indices, Fbg, T-Chol, TG and Glu levels in BD patients with and without thrombosis. No differences in any of the aggregation parameter or in Fbg, T-Chol, TG or Glu levels were observed.

Table 3 shows, age, gender, erythrocyte aggregation indices, Fbg, T-Chol, TG and Glu levels in BD patients with and without uveitis. No differences in any aggregation parameter or in Fbg, T-Chol, TG and Glu levels were observed.

Table 4 shows the correlation (r) between EA parameters determined with the Myrenne (EA₀, EA₁) and the Sefam (Ta, AI₁₀, γD) aggregometer.

A negative correlation was observed between EA₀, EA₁ and Ta and positive correlation between EA₀, EA₁ and AI₁₀ and γD ($P < 0.01$).

Table 5 shows the correlation (r) between EA parameters determined with the Myrenne (EA₀, EA₁), the Sefam (Ta, AI₁₀, γD) aggregometer and Fbg, T-Chol and TG levels. A significant correlation was observed between all the EA parameters and Fbg, T-Chol and TG ($P < 0.01$), the Sefam showing the highest correlation (r) values with Fbg levels ($r = -0.667, 0.528, 0.436$).

Table 2

Age, gender, rheological and biochemical parameters in patients with Behçet's disease with and without thrombosis

	With thrombosis (n = 23)	Without thrombosis (n = 54)	P
Age (years)	48 ± 13	43 ± 12	0.142
Gender (m/f)	15/8	27/27	0.220
BMI (kg/m ²)	25 ± 4.3	26 ± 4.6	0.854
EA ₀	3.478 ± 0.968	3.915 ± 1.000	0.085
EA ₁	7.291 ± 1.087	7.774 ± 1.283	0.125
Ta (s)	1.573 ± 0.446	1.667 ± 0.549	0.500
AI ₁₀	49.2 ± 6.04	50.4 ± 8.3	0.568
γD (s ⁻¹)	145 ± 147	138 ± 125	0.840
Fbg (mg/dl)	344 ± 85	324 ± 82	0.344
T-Chol (mg/dl)	213 ± 49	214 ± 34	0.934
TG (mg/dl)	129 ± 61	131 ± 70	0.869
Glu (mg/dl)	94 ± 16	97 ± 19	0.503

EA₀, erythrocyte aggregation at stasis; EA₁, erythrocyte aggregation at 3 s⁻¹; Ta, erythrocyte aggregation time; AI₁₀, aggregation index at 10 sec; γD (s⁻¹), total disaggregation threshold; Fbg, fibrinogen; T-Chol, total cholesterol; TG, triglycerides; Glu, glucose.

Table 3

Age, gender, rheological and biochemical parameters in patients with Behçet's disease with and without uveitis

	With uveitis (n = 21)	Without uveitis (n = 56)	P
Age (years)	44 ± 11	45 ± 13	0.757
Gender (m/f)	10/9	31/24	0.778
BMI (kg/m ²)	25 ± 4	26 ± 4	0.736
EA ₀	3.80 ± 0.82	3.77 ± 1.06	0.921
EA ₁	7.59 ± 1.28	7.65 ± 1.26	0.865
Ta (s)	1.88 ± 0.57	1.70 ± 0.48	0.182
AI ₁₀	48.5 ± 7.5	50.5 ± 7.9	0.340
γD (s ⁻¹)	184 ± 172	123 ± 113	0.134
Fbg (mg/dl)	326 ± 70	329 ± 84	0.898
T-Chol (mg/dl)	219 ± 44	214 ± 38	0.596
TG (mg/dl)	123 ± 82	136 ± 64	0.511
Glu (mg/dl)	93 ± 10	97 ± 20	0.333

EA₀, erythrocyte aggregation at stasis; EA₁, erythrocyte aggregation at 3 s⁻¹; Ta, erythrocyte aggregation time; AI₁₀, aggregation index at 10 sec; γD (s⁻¹), total disaggregation threshold; Fbg, fibrinogen; T-Chol, total cholesterol; TG, triglycerides; Glu, glucose.

4. Discussion

The results obtained in the present study indicate that BD patients show increased EA, determined both with the Myrenne (EA₀, EA₁) and the Sefam (Ta, AI₁₀, γD) aggregometers when compared with a control group. Increased EA is possibly related with increased fibrinogen ($P < 0.001$) as it deals with a chronic vasculitis, as well as to increased triglyceride levels ($P = 0.003$), for both are known to increase

Table 4
Correlations of EA measurements between Myrenne and Sefam aggregometer

	Ta (s)	AI ₁₀	γ D (s ⁻¹)
EA ₀	-0.430**	0.248**	0.313**
EA ₁	-0.552**	0.341**	0.393**

** $P < 0.01$.

EA₀, erythrocyte aggregation at stasis; EA₁, erythrocyte aggregation at 3 s⁻¹; Ta, erythrocyte aggregation time; AI₁₀, aggregation index at 10 sec; γ D (s⁻¹), total disaggregation threshold.

Table 5
Correlations between EA measurements (Myrenne and Sefam) and Fbg, T-Chol and TG

	Fbg (mg/dl)	T-Chol (mg/dl)	TG (mg/dl)
EA ₀	0.216**	0.212**	0.298**
EA ₁	0.393**	0.305**	0.398**
Ta (s)	-0.667**	-0.249**	-0.321**
AI ₁₀	0.528**	0.239**	0.216**
γ D (s ⁻¹)	0.436**	0.221*	0.271**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

EA₀, erythrocyte aggregation at stasis; EA₁, erythrocyte aggregation at 3 s⁻¹; Ta, erythrocyte aggregation time; AI₁₀, aggregation index at 10 sec; γ D (s⁻¹), total disaggregation threshold; Fbg, fibrinogen; T-Chol, total cholesterol; TG, triglycerides.

this rheological parameter [28–30]. This fact is reinforced by the significant correlations observed between the several EA parameters obtained in both aggregometers with fibrinogen and triglyceride levels.

However when BD patients who have suffered thrombotic events ($n = 23$) were compared with those who did not ($n = 54$), no differences were observed in any of the aggregation parameters performed either with the Myrenne or Sefam aggregometer.

Therefore, previous data obtained by Demiroglou et al. [19] in BD patients, who found that EA was higher in those who developed thrombosis is questionable because of the small sample size, and consequently the small number of patients with thrombosis ($n = 8$). In addition these authors included BD patients with uveitis ($n = 13$) in the same group as those who suffered thrombosis, this inclusion criteria being inadequate as uveitis is an inflammatory process not necessarily related to deep vein thrombosis. Moreover, when in the present study we compared BD patients with uveitis ($n = 21$) with those without ($n = 56$), no differences in aggregation parameters between both groups were observed either with the Myrenne or the Sefam aggregometer.

The results of the present study show a significant correlation between the aggregation parameters obtained with the Myrenne and the Sefam aggregometers ($P < 0.01$), the correlation between the aggregation indices, EA₀, EA₁ and Ta, being negative i.e. the higher the aggregation index the less time the erythrocytes need to aggregate, and a positive correlation between EA₀ and EA₁ with the aggregation extent (AI₁₀, γ D) and the total disaggregation threshold (γ D) i.e. the shear rate needed for erythrocytes to disaggregate.

In the present study BD patients have not been found to show increased EA neither in deep vein thrombosis nor in uveitis groups when compared with those who did not. These results strengthen our previous findings regarding the lack of association between EA and thrombotic events in BD [20,21]. The fact that the Sefam erythro-aggregometer gives more detailed information on the EA process [31] allows

us to know that the cohesion of the rouleaux formed in BD is not higher in those patients with thrombosis or uveitis than in those without (no differences in total disaggregation threshold). This aspect of the EA process could not be determined in previous studies [19–21] by means of the Myrenne aggregometer, as this device does not measure the γ D i.e. the shear rate needed for rouleaux to disaggregate.

Some authors [6] recently suggested, that increased triglyceride levels may play a role in thrombotic events in BD although the possible mechanism remains unknown. It has also been demonstrated in other thrombotic settings that hypertriglyceridemia may increase thrombotic risk [32–34]. In the present study in spite of triglyceride levels being higher in cases than in controls, no differences could be observed when patients with or without thrombosis or uveitis were compared, suggesting that triglycerides do not seem to produce any increase in EA regarding thrombotic events in this disease. This also applies to the levels of plasma fibrinogen, which also did not show any differences between patients with thrombosis or uveitis events and those who had not suffered from them.

In conclusion, in BD, EA determined in a large group of patients by means of two erythrocyte aggregometers does not seem to be related to the development of uveitis or thrombotic events in these patients. Further prothrombotic or hypercoagulable mechanisms need to be elucidated in order to ascertain the thrombotic tendency in this disease.

References

- [1] H. Behçet, Über rezidivierende aphthöse durch ein virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge, und an den Genitalien, *Dermatol. Wochenschr.* **105** (1937), 1152–1157.
- [2] V.G. Kaklamani, G. Vaiopoulos and P.G. Kaklamanis, Behçet disease, *Semin. Arthritis Rheum.* **27** (1998), 197–217.
- [3] Y. Koc, I. Güllü, G. Akpek, T. Akpolat, E. Kansu, S. Kiraz, F. Batman, T. Kansu, F. Balkanci, S. Akkaya et al., Vascular involvement in Behçet's disease, *J. Rheumatol.* **19** (1992), 402–410.
- [4] J.T. Lie, Vascular involvement in Behçet's disease: arterial and venous and vessels of all sizes, *J. Rheumatol.* **19** (1992), 341–343.
- [5] S. Kiraz, I. Ertenli, M.A. Öztürk, I.C. Haznedaroglu, I. Çelik and M. Çalgüneri, Pathological haemostasis and prothrombotic state in Behçet's disease, *Thromb. Res.* **105** (2002), 125–133.
- [6] M. Leiba, U. Seligsohn, Y. Sidi, D. Harats, B.A. Sela, J.H. Griffin, A. Livneh, N. Rosenberg, I. Gelernter, H. Gur and M. Ehrenfeld, Thrombophilic factors are not the leading cause of thrombosis in Behçet's disease, *Ann. Rheum. Dis.* **63** (2004), 1445–1449.
- [7] A. Ates, N. Düzgün, A. Ulu and A.O.A. Tiryaki, Factor V gene (1691A and 4070G) and prothrombin gene 20210A mutations in patients with Behçet's disease, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **33** (2003), 157–163.
- [8] W. Koenig, M. Sund, B. Filipiak, A. Döring, H. Löwel and E. Ernst, Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease. Results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18** (1998), 768–772.
- [9] G.D.O. Lowe, A.J. Lee, A. Rumley, J.F. Proce and F.G.R. Fowkes, Blood viscosity and the risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study, *Br. J. Haematol.* **96** (1997), 168–173.
- [10] E. Ernst and W. Koenig, Hemorheology, thrombogenesis and atherosclerosis, *Sem. Thromb. Hemost.* **19** (1993), 99–103.
- [11] T. Kumsishvili, M. Varazashvili and G. McHedlishvili, Local hemorheological disorders during chronic inflammation, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 427–429.
- [12] E. Krieger, B. van Der Loo, B.R. Amann-Vesti, V. Rousson and R. Koppensteiner, C-reactive protein and red cell aggregation correlate with late venous function after acute deep venous thrombosis, *J. Vasc. Surg.* **40** (2004), 644–649.
- [13] E. Alt, S. Banyai, M. Banyai and R. Koppensteiner, Blood rheology in deep venous thrombosis relation to persistent and transient risk factors, *Thromb. Res.* **107** (2002), 101–107.
- [14] X. Weng, G. Cloutier and J. Genest, Jr., Contribution of the –455G/A polymorphism at the b.fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease, *Thromb. Haemost.* **82** (1999), 1406–1411.
- [15] A. Vayá, C. Falcó, E. Réganon, V. Vila, V. Martínez-Sales, D. Corella, M.T. Contreras and J. Aznar, Influence of plasma and erythrocyte factors on red blood cell aggregation in survivors of acute myocardial infarction, *Thromb. Haemost.* **91** (2004), 354–359.
- [16] G. Caimi, E. Hoffmann, M. Montana, B. Canino, F. Dispensa, A. Catania and R. Lo Presti, R. Haemorheological pattern in young adults with acute myocardial infarction, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29** (2003), 11–18.

- [17] H. Demiroglu, The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology. Considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders, *Blood* **89** (1997), 4236.
- [18] D. Zeltser, J. Serov, T. Mardi, O. Rogowski, T. Tulshinski, Y. Goldin, D. Justo, S. Aharonov, M. Rozenblat, S. Berliner, I. Shapira and A. Rubinstein, Serum lipids as minor determinants of the degree of erythrocyte adhesiveness/aggregation in the peripheral blood of individuals with low grade inflammation and moderately increased serum lipids, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **31** (2004), 161–167.
- [19] H. Demiroglu, S. Yalçın, Y. Büyükasik, Özcebe and S. Dündar, Increased erythrocyte aggregation as an indicator for an aggressive clinical course in Behçet's disease: a prospective study, *Ann. Rheum. Dis.* **57** (1998), 694–696.
- [20] A. Vayá, J.M. Ricart, J. Todolí, L. Micó, M.T. Contreras and J. Aznar, Do hemorheological alterations play any role in the development of thrombotic events in Behçet's disease?, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 411–414.
- [21] M.J. Ricart, A. Vayá, J. Todolí, J. Calvo, M.T. Contreras, F. España, J. Aznar and D. Corella, Hemorheological alteration in Behçet's disease are not related to a tendency for venous thrombosis, *Thromb. Res.* **115** (2005), 300–404.
- [22] H. Schmid-Schönbein, E. Volger, P. Teitel, H. Kiesewetter, V. Daver and L. Heilmann, New hemorheological techniques for the routine laboratory, *Clin. Hemorheol.* **2** (1983), 93–105.
- [23] P. Mills, D. Quemada and J. Dufaux, Etude de la cinétique d'aggregation erythrocytaire dans un écoulement Couette, *Rev. Phys. Appl.* **15** (1980), 1357–1366.
- [24] A. Chabanel and M. Samama, Evaluation of a method to assess red blood cell aggregation, *Biorheology* **26** (1989), 785–797.
- [25] International Study Group for Behçet's disease, Criteria for diagnosis of Behçet's disease, *Lancet* **335** (1990), 1078–1080.
- [26] M. Frezzato, A. Tosetto and F. Rodeghiero, Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism, *Am. J. Epidemiol.* **143** (1996), 1257–1265.
- [27] International Committee for Standardization in Haematology, Expert Panel on Blood Rheology, Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability, *Clin. Hemorheol.* **6** (1986), 439–453.
- [28] C. Falcó, A. Vayá, M. Simó, T. Contreras, M. Santaolalia and J. Aznar, Influence of fibrinogen levels on erythrocyte aggregation determined with the Myrenne aggregometer and the Sefam erythro-aggregometer, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **33** (2005), 145–151.
- [29] I. Cicha, Y. Suzuki, N. Tateishi and N. Maeda, Effects of dietary triglycerides on rheological properties of human red blood cells, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **30** (2004), 302–305.
- [30] A. Vayá, M. Martínez, R. Carmona and J. Aznar, Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia, *Thromb. Res.* **72** (1993), 119–126.
- [31] E. Varlet-Marie, A. Gaudard, J.F. Monnier, J.P. Micallef, J. Mercier, F. Bressolle and J.F. Brun, Reduction of red blood cell disaggregability during submaximal exercise: relationship with fibrinogen levels, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **28** (2003), 139–149.
- [32] A. Vayá, Y. Mira, F. Ferrando, M.T. Contreras, A. Estellés, F. España, D. Corella and J. Aznar, Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors, *Br. J. Haematol.* **118** (2002), 255–259.
- [33] T. Kawasaki, J. Kambayashi and M. Sakon, Hyperlipidemia: a novel etiologic factor in deep vein thrombosis, *Thromb. Res.* **79** (1995), 147–151.
- [34] M.D. Mc Coll, N. Sattar, J. Ellison, R.C. Tait, D. Walker, C.J. Packard and I.A. Greer, Lipoprotein (a), cholesterol and triglycerides in women with venous thromboembolism, *Blood Coagul. Fibrinol.* **11** (2000), 225–229.

III.2. TRABAJOS ENVIADOS A PUBLICAR

Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Behcet en 74 pacientes de la Comunidad Valenciana

Enviado a publicar a *Medicina Clínica (Barcelona)*

Factor de impacto: 1,005

José M^a Ricart, José Todolí*, Juan José Vilata**, Javier Calvo***,
Marisa Santaolaria****, Amparo Vayá****

Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*: Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe. Valencia

** : Servicio de Dermatología. Hospital General Universitario.

Valencia

***: Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario.

Valencia

****: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La
Fe. Valencia

**MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE BEHCET
EN 74 PACIENTES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA**

**CLINICAL MANIFESTATIONS OF BEHCET DISEASE IN 74
PATIENTS FROM THE COMMUNITY OF VALENCIA**

José M^a Ricart, José Todolí*, Juan José Vilata**, Javier Calvo***, Marisa Santaolaria****, Amparo Vayá*****.

Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

*: Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

** : Servicio de Dermatología. Hospital General Universitario. Valencia.

***: Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario. Valencia.

****: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Correspondencia:

José María Ricart Vayá, Servicio de Dermatología, Hospital Universitario La Fe, Valencia

Avda. Campanar 21, Valencia 46009, España.

Teléfono: 963862714. Fax: 961973109

Correo electrónico: jricartv@yahoo.es

RESUMEN

Fundamento y objetivo: La enfermedad de Behcet (EB) es una entidad clínica poco prevalente en España. Son escasos los artículos publicados referentes a datos epidemiológicos y manifestaciones clínicas en nuestro país. El objetivo del presente estudio fue conocer las características de las manifestaciones clínicas de la EB en la Comunidad Valenciana.

Material y métodos: Se recogieron datos de los pacientes diagnosticados entre 1990 y 2005 de EB en los Hospitales Universitarios La Fe, General, y Doctor Peset de Valencia. Las diferencias entre sexos se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado.

Resultados: Setenta y cuatro pacientes (40 varones, 34 mujeres) formaron el grupo de estudio. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las aftas orales (98,5%) y genitales (82,4%), seguidas de las cutáneas (64,2%), oculares (42,5%), fiebre (39,4%) y vasculares (28,4%), con predominio de las trombosis venosas sobre las arteriales. Sólo las manifestaciones gastrointestinales fueron más frecuentes en el sexo femenino ($p=0,002$). Las alteraciones vasculares y oculares fueron más graves en los hombres. En cuanto a la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular, 32,4% de los pacientes fueron fumadores, 20,3% hiperlipémicos, 19% hipertensos, 13,5% obesos y 9,5% diabéticos, aunque no se observó asociación entre éstos y los eventos trombóticos ni uveítis posterior ($p>0.05$)

Conclusiones: Los resultados obtenidos fueron similares a los de otras áreas geográficas. Destaca la mayor frecuencia de manifestaciones digestivas en mujeres, y el predominio de eventos trombóticos venosos sobre los arteriales. Los factores de riesgo cardiovascular no parecen jugar un papel en el desarrollo de eventos trombóticos ni uveítis posterior en estos pacientes.

Palabras clave: Enfermedad de Behcet, trombosis, uveítis, eritema nodoso, aftas

ABSTRACT

Objective: Behcet's disease has a low prevalence in the Spanish population. Only a few reports have been published on the clinical features of Behcet's disease in our country. The aim of this study was to determine the type and frequency of these features of Behcet's disease in a population of patients in the Community of Valencia

Methods: We retrospectively studied clinical data from patients with Behcet's disease, diagnosed between 1990 and 2005 in La Fe, General and Doctor Peset University Hospitals. Statistical analysis was carried out using the chi squared test.

Results: Seventy four patients (40 male, 34 female) were studied. The most frequent manifestations were oral (98,5%) and genital aphthae (82,4%), followed by cutaneous lesions (64,2%), ocular lesions (42,5%), fever (39,4%) and vascular manifestations (28,4%). Venous manifestations were more frequent than arterial events. Gastrointestinal lesions occurred more frequently in females compared with males ($p=0,002$). Vascular and ocular manifestations were more severe in males than in females. With respect to cardiovascular risk factors, 32,4% of patients were smokers, 20,3% were hyperlipidemic, 19% hypertensive, 13,5% obese and 9,5% diabetic. Cardiovascular risk factors were not related to thrombotic events or posterior uveitis in these patients.

Conclusion: Behcet's disease in patients in the Community of Valencia is characterized by a variety of clinical manifestations similar to other geographical areas. Gastrointestinal manifestations occur more frequently in female patients, and venous thrombotic manifestations were more frequent than arterial events. Cardiovascular risk factors do not seem to play a role in the development of thrombotic events and posterior uveitis in these patients.

Keywords: Behcet's disease, thrombosis, uveitis, erythema nodosum, aphthae

INTRODUCCION

La enfermedad de Behcet (EB) es una vasculitis de origen desconocido caracterizada por la presencia de aftas orales y genitales recurrentes, uveítis y lesiones cutáneas. Otras manifestaciones que pueden desarrollar estos pacientes son músculo-esqueléticas, neurológicas, pulmonares, gastrointestinales y cardíacas ¹. Afecta preferentemente a individuos jóvenes de entre 20 y 40 años ². Varios autores han descrito que aquellos pacientes en los que la enfermedad se manifiesta a edades más precoces desarrollan cuadros más graves ^{3,4}. Los factores pronósticos más importantes son el desarrollo de lesiones oculares y la afectación del sistema nervioso central (SNC). Los varones desarrollan cuadros clínicos más graves que las mujeres ⁵.

La EB se distribuye a lo largo de “La Ruta de la Seda”, desde el Este de Asia hasta los países del Este del mar Mediterráneo. Turquía tiene la prevalencia más elevada, de 80 a 420 casos por 100.000 habitantes, mientras que en Japón, Irán, Arabia Saudita, China y Corea, ésta es de 13,5 a 20 casos por 100.000 habitantes; en el Reino Unido de 0,64 casos por 100.000 habitantes, y en los EEUU de 0,12 a 0,33 casos por 100.000 habitantes. En Alemania, la prevalencia difiere según se considere a la población nativa alemana (0,42 a 0,55 por 100.000 habitantes) o a la población de origen turco (21 por 100.000 habitantes) ³. Eiroa et al han calculado una prevalencia de la EB en el área sanitaria de La Coruña de 5,6 casos por 100.000 habitantes, con una incidencia anual de 0,53 casos por 100.000 habitantes para el sexo masculino y 0,32 por 100.000 habitantes para ambos sexos ⁶.

Se ha demostrado en diversos estudios la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de la EB en poblaciones de diferente origen étnico ⁵. Existen pocos estudios en la literatura que aporten datos sobre las manifestaciones clínicas de la EB en población española, y el número de pacientes incluidos en éstos es escaso. Así, se ha publicado un estudio en la población del Noroeste de España ⁷ que presentaba los datos de 16 pacientes, un estudio en población del Este de España que presentaba datos de 24

pacientes ⁸, y el trabajo publicado por Espinosa et al ⁹, donde evalúan las características clínicas de 34 pacientes procedentes del Noreste de España.

En el presente estudio se valoran las manifestaciones clínicas de pacientes con EB procedentes de tres hospitales de la ciudad de Valencia, en base a la historia clínica y la encuesta al paciente. Según las bases de datos consultadas, se trata de la muestra más amplia de pacientes con EB en España.

MATERIAL Y METODOS

Se revisaron las historias clínicas de pacientes con diagnóstico de EB del Hospital General, Hospital Peset y Hospital La Fe, tres hospitales universitarios de la ciudad de Valencia, diagnosticados desde 1990 hasta 2005. De los 115 pacientes iniciales, 12 habían fallecido, 10 no cumplían criterios y 19 no seguían revisándose en sus respectivos hospitales. El grupo de estudio estaba comprendido por 74 pacientes (40 varones y 34 mujeres, edad media de $44,9 \pm 12$ años). Todos los pacientes excepto uno cumplían los criterios del Grupo Internacional para el diagnóstico de la EB ¹⁰. Dicho paciente no padecía aftas orales pero tenía una combinación suficiente de síntomas como para diagnosticarlo de la enfermedad.

Se llevó a cabo una entrevista con los pacientes y se cumplieron formularios específicamente diseñados para el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y el Comité Ético del Hospital dio su aprobación para la realización del estudio.

Se registraron la edad, el sexo, el peso, la talla, la duración de la enfermedad, las manifestaciones clínicas, los índices de actividad y de gravedad, así como el tratamiento. Se investigó la presencia de los siguientes factores de riesgo cardiovascular: obesidad (IMC mayor o igual a 30 kg/m^2), hipertensión arterial (tensión arterial mayor o igual a 140/90 mmHg o tratamiento antihipertensivo), tabaquismo (más de un cigarrillo/día), hiperlipemia (colesterol total mayor de 220 mg/dl, triglicéridos mayor de 175 mg/dl o tratamiento hipolipemiente) y diabetes mellitus (glucemia en ayunas mayor de 126 mg/dl o tratamiento antidiabético).

La actividad de la enfermedad se valoró mediante el “Behcet’s Disease Current Activity Form”¹¹, considerando los síntomas presentes durante el mes previo a la entrevista.

Se clasificó además a los pacientes en función de la gravedad clínica de la enfermedad, según las manifestaciones clínicas acumuladas, adjudicando 1 punto por cada síntoma leve (aftas, lesiones cutáneas, artralgias, cefalea recurrente, síntomas gastrointestinales leves, dolor pleurítico, tromboflebitis superficial), 2 puntos por cada síntoma moderado (artritis, trombosis venosa profunda de miembros inferiores, uveítis anterior, sangrado gastrointestinal) y 3 puntos por cada síntoma grave (uveítis posterior, trombosis arterial o aneurismas, trombosis de vena mayor –ej. cava-, neuro-Behcet, perforación intestinal). El índice de gravedad se obtuvo de la suma final de los diferentes síntomas^{4,12}.

Las lesiones dermatológicas fueron consideradas por un dermatólogo antes de incluirlas como características de la EB. El test de patergia no se realizó en la mayoría de pacientes, por lo que no se ha considerado en el presente estudio.

La evaluación ocular se llevó a cabo por los oftalmólogos de cada centro mediante lámpara de hendidura y angiografía con fluoresceína. Clasificamos la afectación ocular como “afectación ocular anterior” y “afectación ocular posterior”. La vasculitis de retina se incluyó en el grupo de uveítis posteriores.

Se consideró la presencia de artritis en aquellos casos en los que los pacientes presentaban inflamación dolorosa de la articulación.

La afectación del sistema nervioso central se incluyó como tal en los casos en que los neurólogos y/o los internistas de cada centro lo creyeron conveniente. La cefalea en ausencia de otras manifestaciones neurológicas no fue considerada como manifestación de EB.

Dentro de los eventos vasculares, se incluyeron las trombosis venosas y la patología arterial. Dentro de los fenómenos trombóticos venosos, se incluyeron las trombosis venosas profundas y las tromboflebitis superficiales. Las trombosis venosas se confirmaron mediante ecografía doppler, venografía,

tomografía axial computerizada o resonancia magnética, a excepción de la tromboflebitis, que fue evaluada clínicamente.

Todos los pacientes recibieron el tratamiento recomendado por sus correspondientes facultativos, y asimismo se realizaron las pruebas diagnósticas que los facultativos consideraron oportunas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa de estadística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versión 9.0 para Windows. Los resultados de las variables cuantitativas se expresaron como media \pm desviación estándar. Los pacientes se agruparon en función del sexo, comparando las diferencias de las variables dicotómicas entre ambos grupos con el test de Chi-cuadrado. La comparación entre los porcentajes de las diferentes manifestaciones clínicas y los factores de riesgo cardiovascular también se analizaron mediante el test de Chi-cuadrado. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El grupo de estudio estaba formado por 74 pacientes (40 varones y 34 mujeres, edad media $44,9 \pm 12$ años). La duración media de la enfermedad fue de $9,4 \pm 6,3$ años (rango 1 a 24 años).

La Tabla 1 muestra la frecuencia de las diferentes manifestaciones desarrolladas por los pacientes hasta el momento del estudio. Tal y como era de esperar, la manifestación más frecuente fue la aparición de aftas orales (98,5%), seguida de la aparición de aftas genitales (82,4%). La primera manifestación de la enfermedad para la mayoría de los pacientes fue la aparición de aftas orales, seguida de la aparición de aftas genitales. Tras las aftas genitales, las manifestaciones más frecuentes fueron las lesiones cutáneas (64,2%), seguidas de las manifestaciones oculares. El 42,5% de los pacientes desarrolló afectación inflamatoria ocular (uveítis anterior y/o uveítis posterior), siendo las uveítis posteriores las más frecuentes. Dentro de las manifestaciones dermatológicas, la pseudofoliculitis fue la más frecuente (39,4%), seguida por

el eritema nodoso (28,8%) y las lesiones pápulo-pustulosas (12,1%). El 28,4% de los pacientes con EB presentó afectación vascular, con un claro predominio de las manifestaciones venosas (21,6%) sobre las arteriales (4,1%).

Al comparar las diferentes manifestaciones clínicas entre hombres y mujeres, únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas en las manifestaciones gastrointestinales, que fueron más frecuentes en las mujeres que en los hombres (36,6% vs. 5,4%; $p=0,002$). Destaca que tres hombres padecieron ceguera total a causa de la enfermedad, frente a ninguna mujer. En los hombres, la manifestación vascular predominante fue la TVP, mientras que en las mujeres fue la tromboflebitis.

No se encontró ninguna asociación entre las diferentes manifestaciones clínicas en todo el grupo de pacientes con EB, ni en los subgrupos de hombres y mujeres.

Se consideraron inactivos al 34 % de los pacientes. No hubo ningún paciente con actividad clínica importante en el momento del estudio. En cuanto al índice de gravedad de la enfermedad, la media de puntuación fue de $6,69 \pm 3,1$ (rango 2 a 16). No se encontraron diferencias significativas en la actividad clínica en función del sexo. Asimismo, el índice de gravedad, no se correlacionó con la edad en el momento del estudio, con la edad al debut de la enfermedad, ni con el tiempo de evolución de la misma.

Los tratamientos que los pacientes recibían en el momento de la entrevista se indican en la Figura 1. Los más utilizados fueron los corticoides, aislados o asociados a inmunosupresores, y la colchicina.

En cuanto a la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular, 24 pacientes (32,4%) eran fumadores, 15 eran hiperlipémicos (20,3%), 14 sufrían hipertensión arterial (19%), 10 pacientes (13,5%) se consideraron obesos y 7 diabéticos (9,5%), todos ellos de tipo 2. Cuando se clasificó a los pacientes en base a que hubieran padecido o no eventos trombóticos, no se observaron diferencias en los porcentajes de pacientes hiperlipémicos ($p=0,428$), hipertensos ($p=0,250$), obesos ($p=0,621$) y diabéticos ($p=0,410$), siendo el porcentaje de fumadores significativamente mayor en los pacientes con EB sin trombosis ($p=0,016$).

Al clasificar a los pacientes en base a que hubieron padecido uveitis posterior o no, tampoco se observaron diferencias en los porcentajes de pacientes dislipémicos ($p=1,000$), hipertensos ($p=0,532$), obesos ($p=0,717$), diabéticos ($p=1,000$) o fumadores ($p=0,488$).

DISCUSIÓN

La EB es una vasculitis sistémica caracterizada por la presencia de aftas orales, aftas genitales y lesiones cutáneas, que se acompaña de manifestaciones oculares, vasculares, del SNC y gastrointestinales, entre otras. Se aprecia una diferencia sustancial al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes estudiados en la población general con los pacientes de los archivos hospitalarios. El primer grupo suele presentar aftas orales, aftas genitales y manifestaciones cutáneas, mientras que los pacientes hospitalarios presentan con mayor frecuencia afectación ocular, vascular o del SNC ^{13,14}. En el presente estudio se han analizado los datos de tres hospitales de la Comunidad Valenciana.

Durante los últimos años han sido publicados numerosos estudios epidemiológicos analizando la frecuencia de las diferentes manifestaciones clínicas de la EB en diversos países. En la Tabla 2 se indican los porcentajes de las manifestaciones clínicas en los pacientes con EB procedentes de distintas áreas geográficas: Italia ⁴, Grecia ¹⁵, Turquía ¹⁶, Alemania ¹⁷ y Japón ¹⁸. Como se puede observar, las frecuencias de las diferentes manifestaciones clínicas en el presente trabajo tienen gran similitud con el estudio italiano ⁴, lo que puede explicarse porque ambas son series de pacientes hospitalarios, y por la proximidad geográfica. Resulta interesante que en el estudio llevado a cabo en pacientes griegos ¹⁵ y turcos ¹⁶, ambos realizados en pacientes hospitalarios, la frecuencia de afectación vascular ronda el 10%, y contrasta con los resultados obtenidos en el presente trabajo (21,6%). Sin embargo, el 30% de los pacientes con EB del estudio italiano ⁴ presentaron fenómenos trombóticos, un porcentaje más similar al obtenido en el presente trabajo.

Son escasas las series publicadas en España. La edad al diagnóstico encontrada en el presente trabajo es similar a la encontrada por Eiroa et al ⁶

(44,9 ± 12 años vs. 45,6 ± 10,5 años). Al comparar la frecuencia encontrada para las diferentes manifestaciones clínicas con la de otros estudios realizados en pacientes españoles ^{8,9} (Tabla 3), se observan algunas diferencias. No se ha podido introducir en la tabla comparativa los pacientes procedentes de Noroeste de España ⁷, puesto que los criterios de inclusión eran diferentes, al haberse incluido en dicho estudio pacientes con criterios incompletos para la EB.

Se ha encontrado en el presente estudio un claro predominio de las manifestaciones vasculares venosas frente a las arteriales (Tabla 1). Los resultados respecto a este punto obtenidos por los diferentes autores son contradictorios, ya que, mientras algunos refieren un claro predominio de las manifestaciones venosas frente a las arteriales ¹⁸⁻²⁰, otros encuentran una mayor frecuencia de manifestaciones arteriales ²¹. Demiroglu et al proponen que el desarrollo de trombosis en pacientes con EB predice la afectación ocular ²²; sin embargo, en el presente estudio no se ha encontrado una asociación entre ambas manifestaciones. Tampoco se ha hallado una asociación entre el desarrollo de trombosis venosa profunda y la presencia de eritema nodoso o pseudofoliculitis, tal y como refieren algunos autores ²³. Sin embargo, es destacable que el 58,3% de los pacientes que presentaron trombosis venosa profunda sufrió a lo largo de la enfermedad al menos un episodio de eritema nodoso y el 44,4% desarrolló pseudofoliculitis.

Algunos autores han observado que los pacientes que desarrollaban manifestaciones vasculares presentaban con más frecuencia alteraciones digestivas ²⁰, asociación que en el presente estudio no se ha podido corroborar. Igualmente, a diferencia de otros autores ^{3,4}, no se ha encontrado que aquellos pacientes que desarrollaron la enfermedad a una edad más temprana tuvieran una mayor gravedad de la misma, ni se ha observado una correlación entre la gravedad y la duración de la enfermedad.

Al comparar la frecuencia de las manifestaciones clínicas en función del sexo, se ha encontrado una mayor frecuencia de alteraciones digestivas en las mujeres con EB. Estas diferencias no se han detectado en estudios previos. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la

frecuencia de aparición de manifestaciones oculares; sin embargo, los cuadros clínicos oculares más graves ocurrieron en pacientes de sexo masculino; de hecho, tres varones desarrollaron ceguera total a causa de su enfermedad, mientras que ninguna mujer la desarrolló. Del mismo modo, no se han encontrado diferencias por sexo en la frecuencia de manifestaciones vasculares, a diferencia de otros autores que encuentran que las manifestaciones vasculares son entre 2,5 a 5 veces más frecuentes en varones que en mujeres ¹⁴.

En cuanto a la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular, comparando los datos obtenidos con la prevalencia de dichos factores en la población española, (datos de la Encuesta Nacional de Salud de 1997 ²⁴), se observa que la proporción de fumadores es similar a la de la población general e incluso algo inferior en nuestra serie (36 % frente a 32,4 %), posiblemente porque se trate de ex-fumadores que abandonaron el hábito tabáquico tras un episodio trombótico.

La prevalencia de hipercolesterolemia, definida por un colesterol total mayor o igual a 250 mg/dl, en la población española en un metaanálisis recientemente publicado fue del 23 % ²⁵, similar a las cifras obtenidas en nuestro estudio (20,3 %), si bien hay que considerar los diferentes criterios utilizados.

En cuanto a la hipertensión arterial, la prevalencia fue del 19%. Se ha estimado que entre un 34,2 % y un 44 % de la población española de edad media padece hipertensión arterial, utilizando criterios similares a los empleados en el presente trabajo ²⁶. La proporción de obesidad encontrada (13,5%) también es similar a la de la población española (14,5%), considerando los datos del estudio SEEDO'00 ²⁷ realizado en población de 25-60 años en el periodo 1990-2000. La prevalencia de diabetes mellitus conocida o ignorada es de alrededor del 6% en España, frente al 9,5% en nuestra serie ²⁸. Estas diferencias podrían explicarse por el frecuente tratamiento corticoideo de nuestros pacientes (el 61% recibían corticoides), puesto que en todos los casos se trataba de una diabetes mellitus tipo 2.

No se han observado diferencias al comparar el porcentaje de factores de riesgo cardiovascular entre los pacientes con EB con y sin trombosis. Ésto puede explicarse por el hecho de que la mayor parte de eventos trombóticos han afectado al área venosa, donde los factores de riesgo cardiovascular clásicos juegan un papel controvertido ²⁹.

En conclusión, la frecuencia de las manifestaciones clínicas encontrada en los pacientes con EB en la Comunidad Valenciana ha sido similar a la observada en otras provincias españolas, así como en otras áreas geográficas (Turquía, Grecia, Alemania, Italia). Las mujeres con EB presentaron más alteraciones digestivas que los hombres con EB. Las manifestaciones trombóticas y la uveítis posterior han afectado a hombres y mujeres en igual proporción, si bien la gravedad clínica ha sido mayor en los primeros. Adicionalmente, la mayor parte de eventos trombóticos afectaron al área venosa, constituyendo la presencia de eventos arteriales una rareza en la presente serie.

Tabla 1. Comparación de las manifestaciones clínicas de la EB entre hombres y mujeres.

Manifestaciones clínicas	Hombres	Mujeres	Todos	p
Aftas Orales	97,3% (36/37)	100% (31/31)	98,5%	1
Aftas Genitales	75,7% (28/37)	90,3% (28/31)	82,4%	0,115
Aftas orales y/o genitales	100% (37/37)	100% (31/31)	100%	1
Lesiones cutáneas	66,7% (24/36)	61,3% (19/31)	64,2%	0,647
- Pápulo-pustulosas	11,1% (4/36)	13,3% (4/30)	12,1%	1
- Pseudofoliculitis	44,4% (16/36)	33,3% (10/30)	39,4%	0,358
- Vasculitis	5,6% (2/36)	10,0% (3/30)	7,6%	0,652
- Eritema nodoso	22,2% (8/36)	36,7% (11/30)	28,8%	0,197
Lesiones oculares	35% (14/40)	51,5% (17/33)	42,5%	0,155
-Uveítis Anterior	22,5% (9/40)	30,3% (10/33)	26%	0,450
-Uveítis posterior	27,5% (11/40)	30,3% (10/33)	28,8%	0,792
Manifestaciones vasculares	35% (14/40)	20,6% (7/34)	28,4%	0,171
-TVP	30% (12/40)	11,8 % (4/34)	21,6%	0,06
-Tromboflebitis	12,5% (5/40)	17,6% (6/34)	14,9 %	0, 535
-TVP y/o tromboflebitis	32,5% (13/40)	20,6% (7/34)	27%	0,250
-Arterial	2,5% (1/40)	5,9% (2/34)	4,1%	0,591
Artritis	23,6% (9/38)	25,8% (8/31)	23,2%	0,839
Fiebre	41,7% (15/36)	36,7% (11/30)	39,4%	0,679
Neuro-Behcet	18,9% (7/37)	13,8% (4/29)	16,7%	0,743
Manifestaciones gastrointestinales	5,4% (2/37)	36,6% (11/30)	18,2%	0,002

p: frecuencia de manifestaciones clínica en hombres vs mujeres

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la EB en diferentes países.

País (año)	Turquía ¹⁶ (2003)	Grecia ¹⁵ (2003)	Alemania ¹⁷ (1997)	Italia ⁴ (2004)	Japón ¹⁸ (1993)	España (Serie actual)
n	2313	82	89	137	3316	74
Aftas orales	100%	100%	99%	100%	98%	98,5%
Aftas genitales	88,1%	82,9%	74,5%	62,8%	73%	82,4%
Afectación ocular	29,1%	76,8%	58,9%	59,9%	69%	42,5%
Afectación vascular	7%	10,9%	25,1%	30,7%	9%	28,4%
Afectación de SNC	2,3%	19,5%	12,1%	17,5%	11%	16,7%

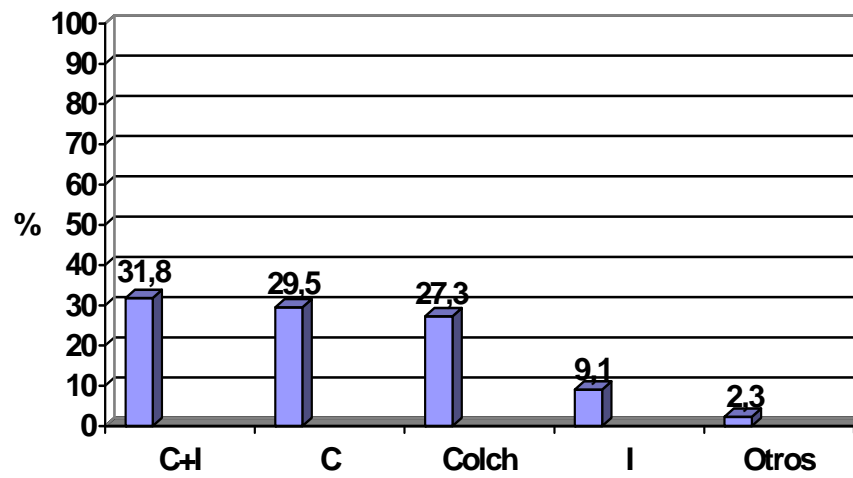
Resultados expresados en porcentaje de pacientes.

Tabla 3. Comparación con otras series españolas.

Manifestaciones clínicas	Baixauli ⁸ n=24	Espinosa ⁹ n=38	Serie actual n=74
Aftas Orales	100%	100%	98,5%
Aftas Genitales	83%	66%	82,4%
Aftas orales y/o genitales	100%	ND	100%
Lesiones cutáneas	42%	68%	64,2%
- Pseudofoliculitis	20,8%	34%	39,4%
- Eritema nodoso	8,3%	42%	28,8%
Lesiones oculares	54%	55%	42,5%
- Uveitis posterior	12,5%	16%	28,8%
Neuro-Behcet	12%	13%	16,7%
TVP y/o tromboflebitis	12,5%	37%	28,4%

ND: datos no disponibles

Figura 1. Tratamiento empleado en el momento del estudio.



C+I (corticoides más inmunosupresores); C (corticoides); Colch (Colchicina); I (inmunosupresores).

Datos expresados en porcentaje de pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yazici H, Yurdakul S, Hamuryudan V. Behçet's syndrome. En: Klippel JH, Dieppe PA, editores. *Rheumatology*. London: Mosby, 1998; p. 1-6.
2. Benamour S. [Manifestaciones reumáticas de la enfermedad de Behcet]. *Ann Med Interne (Paris)* 1999;150:562-70.
3. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behcet's disease. *N Engl J Med* 1999;341:1284-91.
4. Pipitone N, Boiardi L, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, Malatesta R. et al. Clinical manifestations of Behcet's disease in 137 Italian patients: results of a multicenter study. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S46-51.
5. Yazici H, Tuzun Y, Pazarli H, Yurdakul S, Ozyazgan Y, Ozdogan H, et al. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984;43:783-9.
6. Eiroa P, Sánchez J, Rosales M. Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Behcet en el área Sanitaria de La Coruña. *Rev Esp Reumatol* 1991;18:285-287.
7. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Branas F, Lopez-Lazaro L, Olivieri I. Epidemiologic and clinical aspects of Behcet's disease in a defined area of Northwestern Spain, 1988-1997. *J Rheumatol* 2000;27:703-7.
8. Baixauli A, Calvo J, Tamarit JJ, Campos C, Garcia S, Herrera A. Enfermedad de Behcet: estudio retrospectivo. *An Med Interna* 2001;18:405-10.
9. Espinosa G, Font J, Tassies D, Vidaller A, Deulofeu R, López-Soto A, et al. Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002;112:37-43.

10. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. *Lancet* 1990 ;335:1078-80.
11. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ. Behcet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:728-33.
12. Krause I, Uziel Y, Guedj D, Mukamel M, Molad Y, Amit M, et al. Childhood Behcet's disease: clinical features and comparison with adult-onset disease. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:457-62.
13. Azizlerli G, Kose AA, Sarica R et al. Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol* 2003;42:803-6.
14. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Behcet syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:38-42.
15. Zouboulis CC, Vaiopoulos G, Marcomichelakis N, Palimeris G, Markidou I, Thouas B, et al. Onset signs, clinical course, prognosis, treatment and outcome of adult patients with Adamantiades-Behcet's disease in Greece. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S19-26.
16. Tursen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease. *Int J Dermatol* 2003;42:346-51.
17. Zouboulis CC, Kotter I, Djawari D, Kirch W, Kohl PK, Ochsendorf F, et al. Epidemiological features of Adamantiades-Behcet's disease in Germany and in Europe. *Yonsei Med J* 1997;38:411-22.
18. Nakae K, Masaki F, Hashimoto T, Inaba G, Mochizuki M, Sakane T. Recent epidemiological features of Behçet's disease in Japan. En: Wechsler B, Godeau P, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Excerpta Medica, 1993; p. 145-151.
19. Kabbaj N, Benjelloun G, Gueddari FZ, Dafiri R, Imani F. Les atteintes

- vasculaires de la maladie de Behcet. A propos de 40 dossiers. *J Radiol* 1993 ;74:649-56.
20. Tohme A, Aoun N, El-Rassi B, Ghayad E. Vascular manifestations of Behcet's disease. Eighteen cases among 140 patients. *Joint Bone Spine* 2003;70:384-9.
 21. Lakhanpal S, Tani K, Lie JT, Katoh K, Ishigatsubo Y, Ohokubo T. Pathologic features of Behcet's syndrome: a review of Japanese autopsy registry data. *Hum Pathol* 1985;16:790-5.
 22. Demiroglu H, Barista I, Dundar S. Risk factor assessment and prognosis of eye involvement in Behcet's disease in Turkey. *Ophthalmology* 1997;104:701-5.
 23. Hamza M. Maladie de Behçet. En: Kahn MF, editor. *Maladies et syndromes systémiques*, 4^a ed. Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 2000 ; p. 883-924.
 24. Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud de España 1997. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo, 1999.
 25. Medrano MJ, Cerrato E, Boix R, Delgado-Rodriguez M. Factores de riesgo cardiovascular en la población española: metaanálisis de estudios transversales. *Med Clin (Barc)* 2005;124:606-12.
 26. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, de la Cruz Troca JJ, Guallar-Castillon P, del Rey Calero J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension* 1998;32:998-1002.
 27. Aranceta J, Perez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, et al. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med Clin (Barc)* 2003;120:608-12.
 28. González P, Herrera JL, Ascaso JF, Escobar F, Gómez-Gerique JA,

Jiménez JA, et al. Dislipemia diabética: Documento de consenso de la Sociedad Española de Diabetes y la Sociedad Española de Arterioesclerosis. *Av Diabetol* 1998;14: 33-43.

29. Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: too many tests, too much conflicting data. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;353-68.

Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behcet's disease in Eastern Spain and their association with thrombotic events

Enviado a publicar a *Thrombosis and Haemostasis*

Factor de impacto: 3,413

José M^a Ricart, Amparo Vayá*, José Todolí**, Javier Calvo***, Piedad Villa*, Amparo Estellés****, Francisco España****, Dolores Corella*****, Justo Aznar*

Sección de Dermatología. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*: Departamento de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia

** : Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario La Fe. Valencia

***: Servicio de Reumatología. Hospital General Universitario. Valencia

****: Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia

*****: Departamento de Medicina Preventiva. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia

Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behçet's disease in eastern Spain and their association with thrombotic events

José M^a Ricart¹, Amparo Vayá², José Todolí³, Javier Calvo⁴, Piedad Villa², Amparo Estellés⁵, Francisco España⁵, Dolores Corella⁶, Justo Aznar².

¹Dermatology Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

²Hemorheology and Trombosis Unit, Department of Clinical Pathology, La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

³Internal Medicine Service, La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

⁴Rheumatology Service, General University Hospital, Valencia, Spain.

⁵Research Center, La Fe University Hospital, Valencia, Spain.

⁶Department of Preventive Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain.

Running title: Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behçet's disease

Corresponding author:

Amparo Vayá MD, PhD.

Hemorheology and Thrombosis Unit, Department of Clinical Pathology.

La Fe University Hospital.

Avda. Campanar 21.

Valencia 46009, Spain.

Tel.: 34 96 3862714

Fax: 34 96 1973109

E-mail: vaya_amp@gva.es

This work was supported by research grants from Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III, FIS, PI020125) and Fundación Mutua Madrileña, Madrid, Spain.

Summary

Behçet's disease (BD) is a chronic inflammatory disorder in which thrombosis occurs in about 30% of patients. The prothrombotic mechanisms are unknown. Thrombophilic defects and hyperhomocysteinaemia may be involved in the pathogenesis of thrombotic events, although results have been controversial. Moreover, no information is available on this issue for eastern Spain. We studied the prevalence of inherited and acquired thrombophilic risk factors in 79 patients with BD (43 men, 36 women) who had ($n = 23$) or did not have ($n = 56$) thrombosis, and in 84 healthy control subjects (42 men, 42 women). Risk factors examined were antithrombin, protein C and protein S levels, factor V Leiden, the prothrombin G20210A mutation, the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, and acquired thrombophilic risk factors, including anticardiolipin antibodies, lupus anticoagulant, and serum homocysteine levels. There were no differences between patients and controls in any of the parameters studied. When we studied BD patients with and without thrombotic events, the only thrombophilic defect that differed was the prothrombin G20210A mutation: Three of 23 patients with thrombosis were carriers, compared with none of 56 patients without thrombosis ($p = 0.022$). Two of the three carriers developed catastrophic or recurrent thrombotic episodes; one was a homozygous carrier of the G20210A prothrombin mutation and the other was doubly heterozygous for the G20210A prothrombin mutation and factor V Leiden. A meta-analysis demonstrated an association of factor V Leiden and prothrombin mutation with thrombosis in BD. When studies from Turkey were excluded from the meta-analysis, only the prothrombin G20210A mutation was associated with thrombosis.

Keywords: Behçet's disease, hyperhomocysteinaemia, thrombophilic risk factors, thrombosis, meta-analysis.

Introduction

Behçet's disease (BD) is a chronic systemic vasculitis characterized by recurrent oral and genital ulcers and uveitis (1). In BD, 25%-30% of patients develop venous or arterial thrombotic events of unknown aetiology (2, 3). Superficial thrombophlebitis and involvement of the deep veins of the extremities are the most common vascular lesions (2).

Vasculitis underlies the thrombotic tendency in BD, but it is unclear why some patients present with thrombosis and others do not. Impaired coagulation (4-9), defective fibrinolysis and endothelial injury or dysfunction (10), as well as rheological changes (11) have all been proposed as contributors.

Regarding hypercoagulability, the role played by deficiencies in natural anticoagulants such as antithrombin (AT), protein C, and protein S, as well as anticardiolipin antibodies (ACAs) and lupus anticoagulant (LA), have been suggested to contribute to thrombosis in BD, although results have been conflicting (12,13) and little information is available about this issue in Spain (14). Data are also conflicting regarding the role played by the most prevalent thrombophilic defects in the development of thrombotic events, such as factor V (FV) Leiden and the prothrombin G20210A (PTG20210A) mutation. Some authors have found that FV Leiden increases thrombotic risk in patients with BD (9,15-17), as does the PTG20210A mutation (16), whereas other authors found no association between thrombotic events and FV Leiden (3,4,14,18-21) or the PTG20210A mutation (3,4,9,14,18-20).

The possible association between homozygosity for the C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and thrombotic events has been scarcely investigated in BD (3,14,18,22). Moreover, whether hyperhomocysteinaemia in BD is largely due to the presence of this mutation (23), with the aforementioned thrombotic manifestations, is debatable (3,8,22,24-27). To our knowledge, there have been only four studies of patients with BD that examined whether the C677T polymorphism of the MTHFR gene is a thrombotic risk factor (3,14,22,18). However, only two of these (3,22) simultaneously determined plasma

homocysteine levels. They found no association between these factors, possibly because the elevation of plasma homocysteine levels is also caused by nutritional deficiencies in folate, vitamin B₁₂, or vitamin B₆, which are involved in homocysteine metabolism (28).

The aim of this study was to determine the prevalence of inherited thrombophilic risk factors, including AT, protein C, protein S, FV Leiden, the PTG20210A mutation, and the homozygous MTHFR 677TT mutation, and acquired risk factors such as ACAs, LA, and serum homocysteine in patients with BD and in a control group; to evaluate the possible association of these thrombophilic defects and serum homocysteine levels with thrombotic events in patients with BD, and to conduct a meta-analysis of studies on the FV Leiden, the PTG2021A mutation and the homozygous 677TT mutation and venous thrombosis in BD.

Methods

Patients and controls

Records of patients with BD recruited from La Fe, General, and Peset University Hospitals in Valencia between 1990 and 2005 were reviewed. From the initial cohort of 115 patients, 12 patients had died, 10 did not meet the inclusion criteria, and 14 were lost to follow-up. Therefore, the patient group comprised 79 patients with BD (43 men and 36 women, aged 45 ± 12 years). All patients fulfilled three or more of the International Study Group criteria for the diagnosis of BD (29). Patients were interviewed and a detailed history was taken. The mean duration of the disease was 9.4 ± 6.3 years (range 1-24 years). Age, sex, body mass index (BMI), disease duration, symptoms, drugs, and past thrombotic events were recorded. Based on their histories and medical records, patients were categorized into those with a history of venous or arterial thrombosis and those with no such history. No subjects were taking drugs that could interfere with the metabolism of vitamin B₁₂ or folic acid, or vitamin supplements, when sampled. Sixteen patients were taking corticosteroids, six immunosuppressives, 14 corticosteroids and immunosuppressives, 12

colchicine, and 30 patients were taking no drugs. None of the patients had malignancies, or renal or hepatic dysfunction.

Of these 79 patients, 22 had suffered deep vein thrombosis and/or phlebitis, and two had also suffered angina pectoris and ischaemic stroke. One patient had suffered an ischaemic stroke but no thrombosis of the venous system. All thrombotic events had been assessed clinically and were confirmed using objective methods (Doppler ultrasonography, venography, computed tomography, or magnetic resonance imaging). Sampling took place at least six months after any thrombotic event, to avoid the reactant phase. The mean time elapsed since the thrombotic events was 6.4 ± 4.1 years (range 1-11 years). Three patients were taking oral anticoagulants for recurrent deep vein thrombosis. They had been previously referred to our unit for a thrombophilia work-up. Therefore, only biochemical tests were performed in these patients. When sampled, the patients were not in an active phase of the disease, or displayed only minimum activity (mild aphantosis and/or arthralgia).

The control group comprised 84 healthy subjects (42 men and 42 women, aged 43 ± 11 years) from the staff at La Fe University Hospital or outpatients from the Dermatology Clinic at La Fe University Hospital with minimal dermatological problems, such as seborrheic keratosis, warts, or pityriasis versicolor. As we knew in advance sex and age of BD patients, consecutive control individuals from the above mentioned sources were recruited to match with BD patients. In these subjects, the absence of previous thrombotic events was confirmed with Frezzato's (30) validated questionnaire.

Controls and patients were from the same geographical area (eastern Spain), were all Caucasians, and sampling and analytical tests were performed at the same time. Informed consent was obtained from all the participants, and the Ethics Committee of our hospital approved the study. Given the influence of cardiovascular risk factors on serum homocysteine levels, these factors were recorded for both groups. Subjects were considered to have a cardiovascular risk factor if they were obese ($BMI > 30 \text{ kg/m}^2$), were smokers (> 1 cigarette/day), or if they had hypertension (diastolic blood pressure > 90 mmHg), hyperlipidaemia (total cholesterol > 220 mg/dl or triglycerides > 175

mg/dl), fasting glucose concentration > 126 mg/dl, or in receipt of pharmacological treatment for hypertension, hyperlipidaemia, or diabetes.

Blood collection

Blood was collected from the antecubital vein with minimum stasis between 08:00 and 10:00 after 12 h fasting, into vacuum tubes with 0.129 trisodium citrate as anticoagulant. Samples were centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min to obtain platelet-poor plasma, which was stored in aliquots at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until tested. Dry tubes were used to collect samples for biochemical analysis, and K3EDTA tubes were used for samples for DNA studies.

Laboratory methods

AT antigen was measured by radial immunodiffusion using a monospecific antiserum to human AT (Behringwerke AG, Marburg, Germany). Anti-Xa activity was measured in the presence of heparin using the Coamatic Antithrombin Kit (Chromogenix AB, Mölndal, Sweden). Protein C activity was determined with Coamate PC (Chromogenix AB). A one-step enzyme immunoassay (Diagnostica Stago, Asnieres, France) was used to measure total protein S and free protein S. The IL Test™ (Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) was used to assess functional protein S. The assay for LA was performed according to the criteria proposed by the Subcommittee for Lupus Anticoagulants of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH, 1995). The ACA titre and IgG and IgM isotypes were analysed using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs; Cheshire Diagnostic Ltd, Chester, UK). Those subjects with ACA titres above 3SD from the upper normal limit were considered positive ($\text{IgG} \geq 25\text{GPL}$ or $\text{IgM} \geq 20\text{MPL}$).

DNA was extracted from whole blood samples using the Genomic Purification System (Promega, Madison, USA) following the manufacturer's protocol. The FV Leiden mutation was detected using polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis of a fragment of FV Leiden DNA (31). The PTG20210A gene variant was detected as reported (32). Based upon the method described by Skibola et al. (33), a 198-bp genomic DNA fragment of

exon 4 of the MTHFR gene was amplified by PCR and genotyped using *Hinf*I restriction enzyme digestion.

Serum homocysteine levels were determined by fluorescence polarization immunoassay (FPIA), and folic acid and vitamin B₁₂ levels by chemiluminescence (Abbott Laboratories, USA). Total cholesterol, triglycerides and glucose were determined by enzymatic techniques and creatinine by a colorimetric technique in a DAX 72 autoanalyser (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY, USA).

Statistical analysis

All continuous variables were evaluated for normality of distribution. Glucose and homocysteine distributions were markedly skewed and these data were logarithmically transformed before statistical analysis. Student's *t* tests for independent groups were used to compare differences in age, BMI, glucose, lipids, and homocysteine concentrations between patients and controls and between BD patients with and without thrombosis. Two standard deviations (SD) above the mean serum homocysteine concentration in the healthy control group (15 µmol/l) was taken as the cut-off value used to classify subjects as having hyperhomocysteinaemia. The Fisher's exact test was used to evaluate differences in the percentage of carriers with inherited (AT, protein C, protein S, FV Leiden, PTG20210A mutation, and homozygous MTHFR C677T polymorphism) or acquired (ACAs, LA, serum homocysteine >15 µmol/l) thrombophilic risk factors between patients and controls or between BD patients with and without thrombosis. A chi-squared test was conducted to evaluate differences in percentage in the other dichotomic variables. Multivariate stepwise logistic regression was used to estimate the odds ratio for the occurrence of thrombosis associated with potential risk factors in subjects with BD. The data are expressed as means ± one SD. A bilateral *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 10) for Windows.

Data sources and statistics for meta-analysis

In addition to our original work, we have carried out a meta-analysis (34) with the inclusion of forest plots for the most prevalent risk factors (FV Leiden, PTG20210A mutation, and the MTHFR C677T polymorphism). Eligible studies for the meta-analyses were identified by searching the electronic literature (MEDLINE and PubMed) for reports analysing the association between these factors and BD published between 1990 and October 2005. We extracted individual risk estimates and standard errors from each study, and then we combined these estimates using a random effects model. For the pooled OR we used the DerSimonian and Laird's random effect model (34). Study results, their relative size, precision, pattern of effects and degree of heterogeneity, were explored visually using forest plots, in which the confidence interval for each study is represented by a horizontal line and the point estimate (OR) is represented by a square. The size of the square corresponds to the relative size of the study in the meta-analysis. The confidence interval for totals is represented by a diamond shape (StatsDirect, version 2.2.0, Cambridge, UK). A statistical test of heterogeneity was also calculated, estimating a Q statistic, which follows a Chi-square distribution with degrees of freedom of $n-1$, n being the number of studies included in the corresponding analysis. A two-tailed P value < 0.05 for this statistic parameter indicates the presence of heterogeneity, which somewhat compromises the validity of the pooled estimates. Then we analysed two sub-groups to prevent heterogeneity.

Results

Table 1 shows the general characteristics of the study participants. No differences in age, gender, or BMI were observed between patients and controls. The only biochemical parameter significantly higher in patients than in controls was serum triglyceride level ($P = 0.003$). No differences in glucose, total cholesterol, serum homocysteine, folic acid, or vitamin B₁₂ were observed. In controls, men had higher homocysteine levels than women: 11.32 ± 2.39 vs 8.98 ± 2.79 , respectively ($P < 0.01$). There was no difference by age ($P = 0.933$; data not shown).

The prevalence of hyperhomocysteinaemia did not differ between patients and controls ($P = 0.302$).

No subjects showed a deficiency in AT, protein C, or protein S. Only one patient presented with LA. There were no differences between patients and controls in the prevalence of FV Leiden, the PTG20210A mutation, or homozygous carriers of the MTHFR C677T polymorphism (Table 1).

Patients had a higher percentage of cardiovascular risk factors such as hyperlipidaemia ($P = 0.003$), hypertension ($P = 0.047$), and diabetes ($P = 0.015$) than controls, whereas no differences were observed in the percentage of smokers ($P = 0.828$) or obesity ($P = 0.156$).

We also analysed the differences in the above factors in patients with BD with and without thrombosis. Table 2 shows the results of these comparisons. Among BD patients, no differences in age, or BMI were observed between those with and without thrombosis, but the risk of thrombosis tended to be higher in men than in women. Similarly, the biochemical parameters analysed did not differ between these groups. In both groups, men had higher homocysteine levels than women (13.41 ± 7.62 vs 9.30 ± 2.68 , respectively; $P = 0.003$), but there were no differences by age ($P = 0.182$; data not shown). No difference in hyperhomocysteinaemia was observed between BD patients with and without thrombosis ($P = 1.000$).

No differences in AT, protein C, protein S, LA, or ACAs were observed between patients with and without thrombosis, nor in the prevalence of FV Leiden (Table 2). Three of the 23 BD patients with thrombosis were carriers of the PTG20210A mutation, whereas none of the 56 patients without thrombosis were carriers. In one of the carriers, the mutation was homozygous and in the other it was associated with FV Leiden (double heterozygosity). There was no difference in the prevalence of the homozygous MTHFR C677T polymorphism in patients with and without thrombosis.

There was no association between the homozygous MTHFR C677T polymorphism and hyperhomocysteinaemia in either the controls or patients. Of the 14 control subjects with the MTHFR 677TT genotype, only two had

hyperhomocysteinaemia ($P = 0.213$); and of the 11 BD patients carrying the MTHFR 677TT genotype, only two had hyperhomocysteinaemia ($P = 0.608$).

When BD patients with and without thrombosis were compared, no differences were observed in the percentage of hyperlipidaemia ($P = 0.538$), hypertension ($P = 0.350$), obesity ($P = 0.719$), or diabetes ($P = 0.426$). The percentage of smokers was higher in BD patients without thrombosis ($P = 0.016$).

The Pearson bivariate test showed a positive correlation between homocysteine and both total cholesterol ($r = 0.196$) and triglycerides ($r = 0.250$) ($P < 0.05$), and with creatinine ($r = 0.424$; $P < 0.01$), and a negative correlation between homocysteine and folic acid ($r = -0.377$) and vitamin B₁₂ ($r = -0.281$) ($P < 0.01$).

As several studies have already addressed the issue of the association between thrombophilic risk factors and thrombosis in BD, we performed a meta-analysis as indicated in Methods, to assess the influence of FV Leiden, PTG20210A mutation and MTHFR 677TT mutation on thrombotic risk in BD patients. We found statistically significant heterogeneity between studies from Turkey, as compared with other studies, when we estimated the risk associated with FV Leiden ($P < 0.05$ for Q statistics). Thus, we analysed two sub-groups (Turkish origin and non-Turkish). Although no statistically significant heterogeneity ($P > 0.05$) was found for PTG20210A and MTHFR 677TT variations, we also present the forest plot stratified for the Turkish origin to compare results. Figure 1 shows the results obtained. Overall, in the pooled analysis, FV Leiden was associated with a 230% (OR 2.3; 95% CI 1.5-3.5) higher risk of thrombosis in BD patients. However, no homogeneity was observed between studies. Thus, In Turkish studies, FV Leiden was significantly associated with a 320% (OR 3.2; 95% CI 1.8-5.8) increased thrombotic risk, whereas in studies carried out elsewhere the mutation did not influence the risk (OR 1.2; 95% CI 0.6-2.3) (Figure 1A). With respect to the PTG20210A mutation, it was almost significantly associated with a higher thrombotic risk in Turkish studies (OR 2.5; 95% CI 1.0-6.5) whereas it significantly increased the risk of thrombosis in studies performed elsewhere

(OR 2.8; 95% CI 1.1-7.2). As no statistically significant heterogeneity was found, in the pooled analysis, the PTG20210A mutation significantly increased the risk of thrombosis in BD patients (OR 2.7; 95% CI 1.4-5.2) (Figure 1B). The presence of the MTHFR 677TT genotype was not associated with an increased risk of thrombosis in overall or in any of the subgroups studied (Figure 1C).

Discussion

Like most earlier studies (12,35,36), we found normal values for protein C, protein S, and AT activity in patients with BD. Only a few cases of BD with venous thrombosis and protein C or protein S deficiency have been reported (6). None of these studies, including ours, could demonstrate an association between a deficiency in these physiological anticoagulant inhibitors and thrombotic events in patients with BD (12,14,35,36). Therefore, congenital deficiencies in these thrombophilic factors seem to have a minor, if any, role in the pathobiology of thrombosis in BD patients.

Most (13,35) but not all studies (37) have reported no correlation between ACAs and LA antibodies and thrombosis in BD patients. In the present study, the prevalence of ACAs and LA in BD patients did not differ from that in controls. Therefore, these acquired thrombophilic defects seem to play no role in the development of thrombotic events in BD.

Although not significant, we observed that men with BD tended to show a higher thrombotic risk than women. This is in agreement with previous reports (4,18,38).

One of the most controversial issues regarding thrombotic tendencies in BD is the role played by the most prevalent procoagulant mutations, such as FV Leiden, the PTG20210A mutation, and the homozygous MTHFR 677TT mutation. Previous reports of an association between FV Leiden and thrombotic events in BD have shown contradictory results, possibly related to the different populations studied with studies favouring (7,9,15-17,24,39) or opposing (3,4,8,14,18-21,35) These discrepancies may have arisen because patients included in some studies (9,15-17,24,39) were of Turkish origin,

where the prevalence of these mutations is high (4,9,15-17). Furthermore, in some studies that supported an association, the number of patients with thrombosis was small (7,17,24,39). Some studies have determined activated protein C (APC) resistance, but not the genetic mutation, so some cases of APC resistance could be acquired (24,39). In our study, the prevalence of FV Leiden in BD was not higher than that in controls, nor did it differ between patients with and without thrombosis. Therefore, FV Leiden does not seem to increase the thrombotic risk in the present series, consistent with most research in our geographical area (14,19,20), as well as in Israel (3).

The PTG20210A mutation has also been investigated in BD patients, with conflicting results regarding thrombotic events. Gul et al. (16) studied this mutation in 64 BD patients, 32% of whom had suffered deep vein thrombosis of the lower extremities. They reported a heterozygous PT20210A mutation in 31.3% of BD patients with thrombosis and in 3.1% of BD patients without thrombosis, indicating that the mutation increases the risk of thrombosis 14-fold. However, other authors found no such association (3,4,9,14,18,20). In the present study, 3 (13%) of BD patients with thrombosis were carriers of the PTG210A mutation, whereas no carrier was found among the BD patients without thrombosis (OR 19.3, 0.9-390.1). The PTG20210A mutation is the most frequent genetic prothrombotic defect in Spain (40), with a prevalence of 4%–5% in eastern Spain (41), which may partly explain this association.

In the present study, the prevalence of the homozygous MTHFR 677TT genotype was not significantly higher in BD patients (14%) than in controls (17%), or higher in BD patients with thrombosis (18%) than in those without thrombosis (13%). The prevalence in controls (17%) is consistent with the finding of a previous study in our geographical area (15.5%) (42). Only four other studies have determined this polymorphism in BD patients (3,14,18,22), and they also found no association between this mutation and thrombotic events in BD patients. Therefore, this polymorphism does not seem to increase thrombotic risk in BD patients. However, whether hyperhomocysteinaemia is a prothrombotic factor in BD remains a highly controversial issue. Levels of homocysteine depend partly on the MTHFR 677TT genotype (23), and on the

effects of environmental factors, primarily folic acid and vitamin B₁₂ levels, deficits in which increase plasma homocysteine levels (43).

Like other authors (3,26,27), we found no difference in the levels of homocysteine in patients with and without thrombosis. However, most studies carried out in Turkey reported higher levels of homocysteine in patients with thrombosis than in those without (22,24,25), as Lee et al. also reported in Koreans (8). Furthermore, a large proportion of the patients in these studies were in the active phase of the disease (22,25,27), which can also increase homocysteine levels (8). Interestingly, Lee et al. (8) found higher homocysteine levels in BD patients with active disease than in those who had suffered thrombotic events. Our patients were not in the active phase of the disease or displayed minimum activity when sampled, and this may account in part for the discrepancies.

On the other hand, not all the studies that reported higher homocysteine levels in BD patients with thrombosis had made the appropriate adjustments for all those factors that can influence homocysteine levels, such as diabetes (44), hyperlipidaemia (45), tobacco (28), folic acid, and vitamin B₁₂ (44). Given that the Mediterranean diet is rich in folic acid and vitamin B₁₂, we found no differences in the levels of these nutrients in patients and controls or in BD patients with and without thrombosis. Another important factor is the time elapsed since the last thrombotic event, which varies within several studies and may also account for discrepancies (26). Lastly, in those studies in which an association was found between hyperhomocysteinaemia and thrombosis, the number of patients with thrombosis were too small to draw the conclusion that hyperhomocysteinaemia constitutes an independent thrombotic risk factor (8,22,24).

The meta-analysis performed in the present study demonstrated an association between the presence of FV Leiden and thrombosis in BD patients that may be attributed to the Turkish studies, since the studies performed elsewhere did not show a significant association between the presence of FV Leiden and thrombosis in BD. On the contrary, in overall studies the PTG20210 mutation was associated with an increased thrombotic risk that was

not significant in Turkish population. Finally, the MTHFR 677TT genotype did not increase the risk of thrombosis in BD.

In conclusion, the results obtained in the present study, regarding thrombotic risk associated with the most frequent thrombophilic defects in BD, agree with those obtained in the meta-analysis when the Turkish studies were excluded, therefore establishing the PTG20210A mutation as a thrombotic risk factor for BD patients.

REFERENCES

1. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behçet disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998; 27: 197–217.
2. Koc Y, Güllü I, Akpek G, et al. Vascular involvement in Behçet's disease. *J Rheumatol* 1992; 19: 402–10.
3. Leiba M, Seligsohn U, Sidi Y, et al. Thrombophilic factors are not the leading cause of thrombosis in Behçet's disease. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1445–9.
4. Ates A, Düzgün N, Ulu A, et al. Factor V gene (1691A and 4070G) and prothrombin gene 20210A mutations in patients with Behçet's disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 157–63.
5. Navarro S, Ricart JM, Medina P, et al. Activated protein C levels in Behçet's disease and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2004; 126: 550–6.
6. Chafa O, Fischer AM, Meriane F, et al. Behçet syndrome associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1992; 67: 1–3.
7. Mammo L, Al-Dalaan A, Bahabri SS, et al. Association of factor V Leiden with Behçet's disease. *J Rheumatol* 1997; 24: 2196–8.
8. Lee YJ, Kang SW, Yang JI, et al. Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behçet's disease. *Thromb Res* 2002; 106: 19–24.
9. Gurgey A, Balta G, Boyvat A. Factor V Leiden mutation and PAI-1 gene 4G/5G genotype in thrombotic patients with Behçet's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 121–4.
10. Kiraz S, Ertenli I, Öztürk MA, et al. Pathological haemostasis and prothrombotic state in Behçet's disease. *Thromb Res* 2002; 105: 125–33.
11. Demiroglu H, Yalcin S, Buyukasik Y, et al. Increased erythrocyte aggregation as an indicator for an aggressive clinical course in Behçet's disease: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 694–6.
12. Nalcaci M, Pekcelen Y. Antithrombin III, protein C and protein S plasma levels in patients with Behçet's disease. *J Int Med Res* 1998; 26: 206–8.

13. Bang D, Ji HG, Choi YS, et al. Absence of lupus anticoagulants in Behcet's disease. *Yonsei Med J* 1991; 32: 326–9.
14. Espinosa G, Font J, Tassies D, et al. Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002; 112: 37–43.
15. Gul A, Ozbek U, Ozturk C, et al. Coagulation factor V gene mutation increases the risk of venous thrombosis in Behcet's disease. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 1178–80.
16. Gul A, Aslantas AB, Tekinay T, et al. Procoagulant mutations and venous thrombosis in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38: 1298–9.
17. Oner AF, Gurgey A, Gurler A, et al. Factor V Leiden mutation in patients with Behcet's disease. *J Rheumatol* 1998; 25: 496–8.
18. Toydemir PB, Elhan AH, Tukun A, et al. Effects of factor V gene G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T, and prothrombin gene G20210A mutations on deep venous thrombogenesis in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2000; 27: 2849–54.
19. Lesprit P, Wechsler B, Piette JC, et al. Activated protein C resistance caused by factor V Arg 506→Gln mutation has no role in thrombotic manifestations of Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 860.
20. Silingardi M, Salvarani C, Boiardi L, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutations in Italian patients with Behcet's disease and deep vein thrombosis. *Arthritis Rheum* 2004; 51: 177–83.
21. Verity DH, Vaughan RW, Madanat W, et al. Factor V Leiden mutation is associated with ocular involvement in Behcet disease. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 352–6.
22. Canataroglu A, Tanriverdi K, Inal T, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T mutation and plasma homocysteine level in Behcet's disease. *Rheumatol Int* 2003; 23: 236–40.
23. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, et al. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 142–50.

24. Altinbas A, Aytemur K, Tokgozoglu L, et al. Hyperhomocysteinaemia and activated protein C resistance in Behcet's disease. *J Intern Med* 2000; 248: 267–8.
25. Aksu K, Turgan N, Oksel F, et al. Hyperhomocysteinaemia in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 687–90.
26. Korkmaz C, Bozan B, Kosar M, et al. Is there an association of plasma homocysteine levels with vascular involvement in patients with Behcet's syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: S30–4.
27. Feki M, Houman H, Ghannouchi M, et al. Hyperhomocysteinaemia is associated with uveitis but not with deep venous thrombosis in Behcet's disease. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1417–23.
28. Durand P, Prost M, Loreau N, et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; 81: 645–72.
29. International Study Group for Behçet's disease. Criteria for the diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990; 335: 1078–80.
30. Frezzato M, Tosetto A, Rodeghiero F. Validated questionnaire for the identification of previous personal or familial venous thromboembolism. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 1257–65.
31. Gandrille S, Alhenc-Gelas M, Aiach M. A rapid screening method for the factor V Arg506→Gln mutation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 245–8.
32. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698–703.
33. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12810–15.
34. Sutton, AJ.; Abrams, KR.; Jones, DR.; Sheldon, TA.; Song, F. *Methods for meta-analysis in medical research*. London, John Wiley; 2000.
35. Mader R, Ziv M, Adawi M, et al. Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinic manifestations in Behcet's disease. *J Rheumatol* 1999; 11:2404-8.

36. Lenk N, Ozet G, Alli N, et al. Protein C and protein S activities in Behcet's disease as risk factors of thrombosis. *Int J Dermatol* 1998; 37: 124–5.
37. Hull RG, Harris EN, Gharavi AE, et al. Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984; 43: 746–8.
38. Tursen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease. *Int J Dermatol* 2003; 346–351.
39. Kosar A, Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, et al. Activated protein C resistance in Behcet's disease. *Rheumatol Int* 1998; 17: 249–50.
40. Souto JC, Coll I, Llobet D, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998; 80: 366-9.
41. Vayá A, Mira Y, Mateo J, et al. Prothrombin G20210A mutation and oral contraceptive use increase upper-extremity deep vein thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2003; 89: 452-7.
42. Guillen M, Corella D, Portoles, et al. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001; 170: 255-6.
43. Mason JB, Miller JW. The effects of vitamins B₁₂, B₆, and folate on blood homocysteine levels. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 669: 197-203.
44. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 133–8.
45. Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, et al. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995; 75: 132–6.

Table 1. Age, gender, BMI, biochemical parameters, and thrombophilic defects in patients with BD and in the control group.

Variable	BD patients (n = 79)	Control group (n = 84)	P	OR (95% CI)
Age (years)	45 ± 12	43 ± 11	0.330	-
Gender (m:f)	43:36	42:42	0.517	-
Body mass index (kg/m ²)	26 ± 4.4	25 ± 3.4	0.364	-
Glucose (mg/dl)	95 ± 18	98 ± 14	0.109	-
Total cholesterol (mg/dl)	213 ± 38	209 ± 33	0.536	-
Triglycerides (mg/dl)	132 ± 67	102 ± 58	0.003	-
Homocysteine (µmol/l)	11.5 ± 6.2	10.2 ± 2.4	0.112	-
Creatinine (mg/dl)	0.96 ± 0.18	0.93 ± 0.15	0.307	-
Folic acid (ng/ml)	7.2 ± 3.6	6.9 ± 2.9	0.504	-
Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	459 ± 159	458 ± 173	0.962	-
Homocysteine >15 µmol/l (%)	8/77 (10%)	5/84 (6%)	0.302	-
AT, proteins C or S deficiency (%)	0/79 (0%)	0/84 (0%)	-	-
LA (%)	1/79 (1%)	0/84 (0%)	0.975	0.1 (0.0-1.1)
ACA (%)	0/79	0/84	1.000	-
Heterozygous FV Leiden (%)*	3/79 (4%)	3/84 (4%)	1.000	1.1 (0.2-5.4)
Heterozygous PTG20210A (%)*	3/79 (4%)	4/84 (5%)	1.000	0.8 (0.2-3.6)
MTHFR 677TT (%) ^{&}	11/77 (14%)	14/84 (17%)	0.828	0.8 (0.3-2.0)

*One patient was double heterozygous for FV Leiden and PTG20210A and one patient was homozygous for PTG20210A.

[&]The MTHFR C677T polymorphism was not determined in two patients.

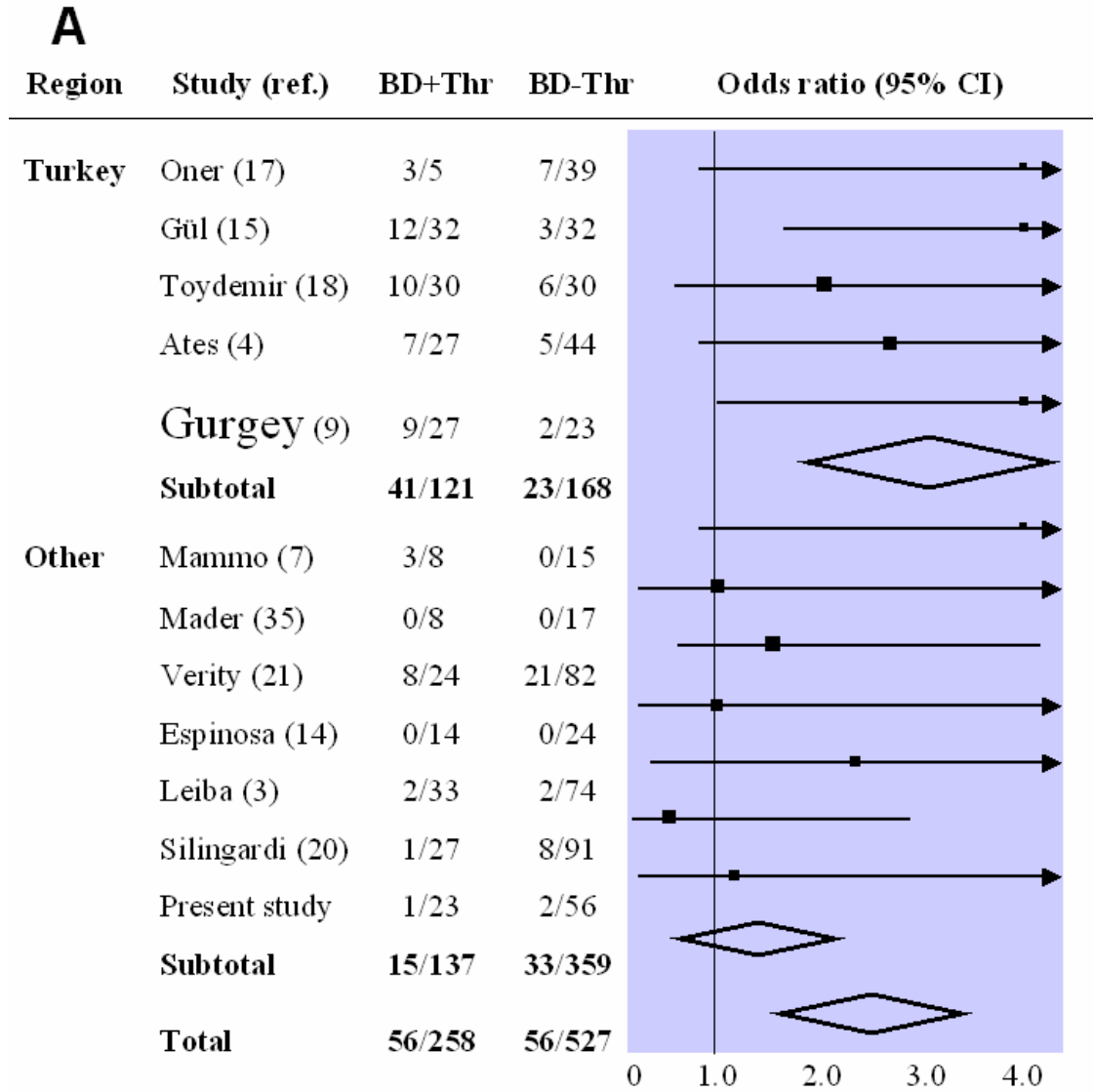
Table 2. Age, gender, BMI, biochemical parameters, and thrombophilic defects in BD patients with and without thrombosis.

Variable	BD with thrombosis (n = 23)	BD without thrombosis (n = 56)	P	OR (95% CI)
Age (years)	48 ± 13	44 ± 12	0.142	-
Gender (m:f)	15:8	28:28	0.197	-
Body mass index (kg/m ²)	26 ± 4.2	26 ± 4.6	0.787	-
Glucose (mg/dl)	94 ± 16	96 ± 19	0.498	-
Total cholesterol (mg/dl)	213 ± 49	241 ± 34	0.946	-
Triglycerides (mg/dl)	129 ± 61	134 ± 34	0.946	-
Homocysteine (µmol/l)	12.7 ± 8.5	11.1 ± 5.0	0.302	-
Creatinine (mg/dl)	0.98 ± 0.19	0.96 ± 0.18	0.582	-
Folic acid (ng/ml)	7.8 ± 4.2	7.1 ± 3.3	0.470	-
Vitamin B ₁₂ (pg/ml)	488 ± 143	448 ± 167	0.351	-
Homocysteine > 15 µmol/l (%)	2/23 (9%)	6/54 (11%)	1.000	-
AT, proteins C or S deficiency(%)	0/23 (0%)	0/56 (0%)	-	-
LA (%)	1/23 (4%)	0/56 (0%)	0.643	7.5 (0.3-192.1)
ACA (%)	0/23	0/56	1.000	-
Heterozygous FV Leiden (%)*	1/23 (4%)	2/56 (4%)	1.000	1.2 (0.1-14.2)
Heterozygous PTG20210A (%)*	3/23 (13%)	0/56 (0%)	0.022	19.3 (0.9-390.1)
MTHFR 677TT (%)&	4/22 (18%)	7/55 (13%)	0.719	1.5 (0.4-5.8)

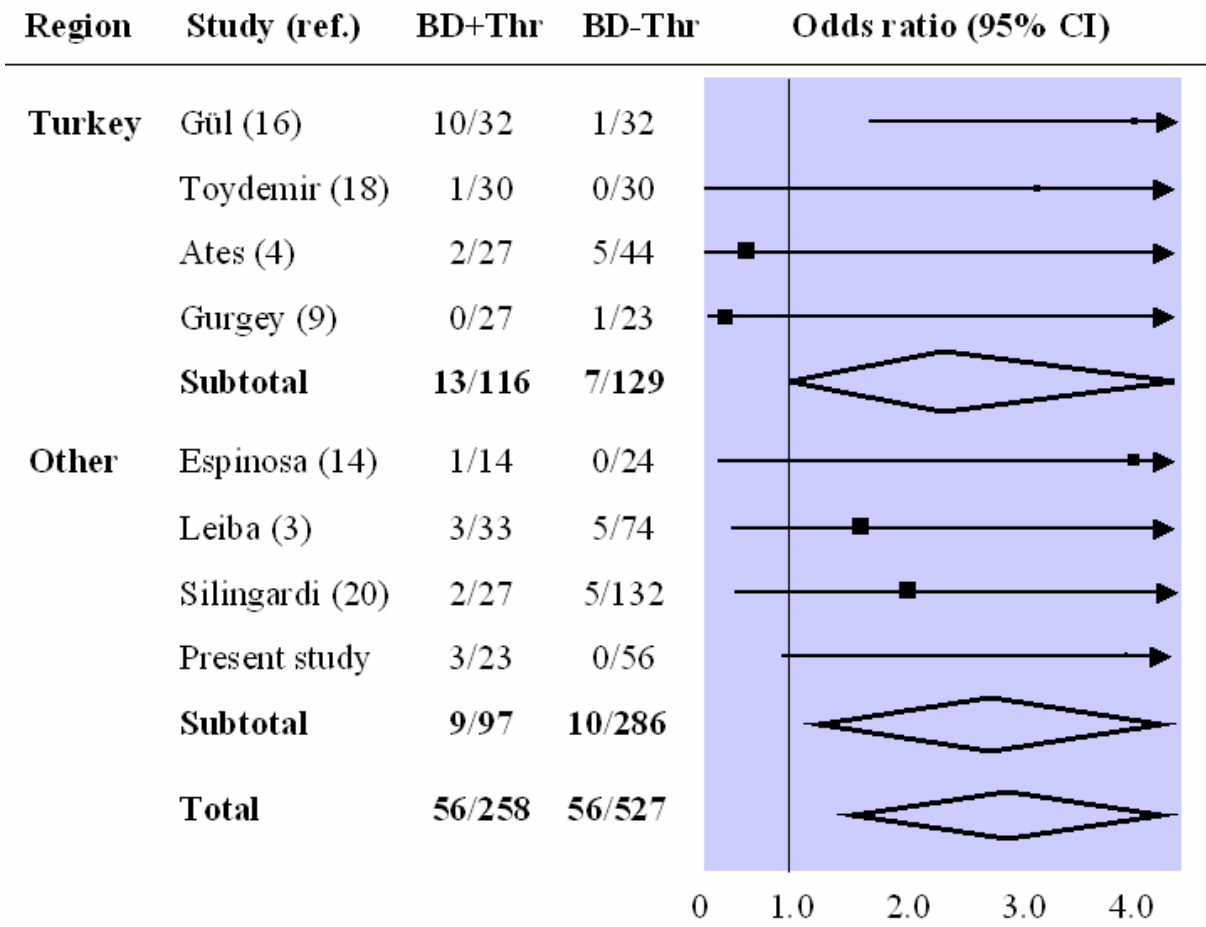
*One patient was double heterozygous for FV Leiden and PTG20210A and one patient was homozygous for PTG20210A.

&The MTHFR C677T polymorphism was not determined in two patients.

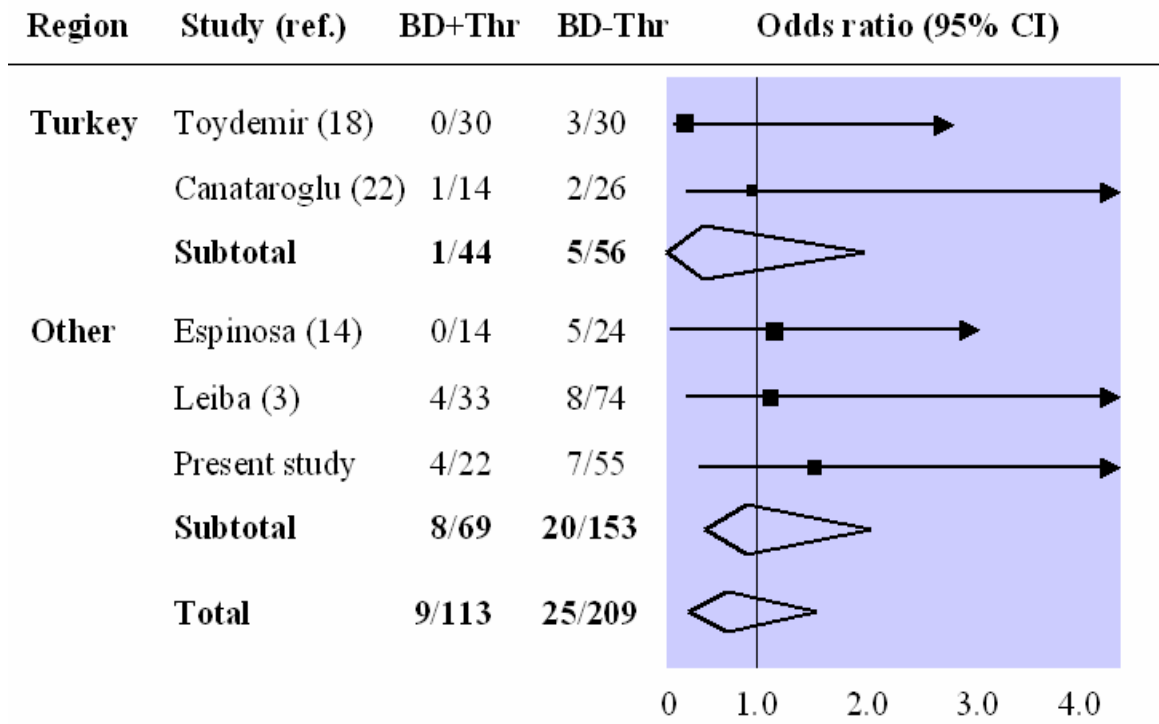
Figure 1. Forest plot for meta-analysis of effect of factor V Leiden (A), prothrombin G20210A (B) and methylenetetrahydrofolate reductase 677TT (C) mutations on the thrombotic risk in patients with Behçet's disease.



B



C



IV. DISCUSSION

Uno de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido conocer las características clínicas de los pacientes con EB en la Comunidad Valenciana, especialmente las manifestaciones cutáneas y trombóticas.

La EB es una vasculitis sistémica caracterizada por la presencia de aftas orales, aftas genitales y lesiones cutáneas, que se acompañan de manifestaciones oculares, vasculares, del SNC y gastrointestinales, entre otras.

Uno de los objetivos primordiales del presente trabajo doctoral ha sido la evaluación de las manifestaciones clínicas de la EB en el área geográfica de la Comunidad Valenciana, comparando la frecuencia de las mismas con las de otras áreas geográficas de España y con otros países de la Ruta de la Seda. Para realizar una comparación adecuada, es importante especificar la procedencia de los pacientes analizados, puesto que se aprecia una diferencia sustancial al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes estudiados en la población general con los pacientes procedentes de los archivos hospitalarios. El primer grupo suele presentar aftas orales, aftas genitales y manifestaciones cutáneas, mientras que los pacientes hospitalarios presentan con mayor frecuencia afectación ocular, vascular o del SNC (263; 264).

Al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes de nuestra área geográfica (Comunidad Valenciana) con las otras áreas geográficas, como Italia (265), Grecia (266), Turquía (267), Alemania (4) y Japón (3), hemos encontrado gran similitud con las manifestaciones clínicas de los trabajos italianos (265), probablemente por tratarse de un área geográfica próxima a la nuestra y porque los pacientes en dicho estudio se obtuvieron de un medio hospitalario. La frecuencia de manifestaciones vasculares en nuestro trabajo ha sido del 28%, similar a la obtenida en el estudio italiano (265), existiendo diferencias con los estudios llevados a cabo en Grecia (266) y Turquía (267). Sin embargo, esto no es de extrañar, ya que tras revisar los trabajos publicados acerca de las manifestaciones vasculares en la EB, destaca una gran heterogeneidad de las mismas en las diferentes áreas geográficas.

Hemos prestado especial atención a la variabilidad intraterritorial de las manifestaciones clínicas en los pacientes con EB. Son escasas las series publicadas en la literatura valorando las manifestaciones clínicas de los pacientes con EB en España. La edad al diagnóstico encontrada en nuestro trabajo es $44,9 \pm 12$ años, similar a la encontrada por Eiroa y cols (268): $45,6 \pm 10,5$ años. Al comparar la frecuencia encontrada para las diferentes manifestaciones clínicas con la de otros estudios (6; 7), sólo se observan algunas diferencias sutiles. Por tanto, podemos concluir que los pacientes con EB estudiados en La Coruña (5), Cataluña (7) y la Comunidad Valenciana (6) presentan manifestaciones clínicas similares. Sin embargo, consideramos que el número de pacientes incluidos en estos estudios es insuficiente y que deberíamos aunar esfuerzos para obtener una base de datos de pacientes con EB de carácter nacional. Ésta nos proporcionaría una información lo suficientemente amplia como para realizar estudios con suficiente poder estadístico. La prevalencia en España de la EB es muy baja, de 5,6 casos por 100.000 habitantes (268), comparada con la de otros países como Turquía (420 casos por 100.000 habitantes), lo que confiere una gran dificultad para la obtención de pacientes. Por este motivo, resulta muy difícil la realización de estudios prospectivos. Del mismo modo, no en todos los estudios publicados los pacientes cumplen criterios de EB (5), lo que dificulta en gran medida la evaluación y comparación de los resultados obtenidos, siendo recomendable incluir exclusivamente aquellos pacientes que cumplan criterios de EB, aunque la serie de pacientes sea menor.

Respecto a las manifestaciones vasculares en la EB, los diferentes estudios muestran datos discordantes respecto a la frecuencia de las manifestaciones venosas y arteriales. Mientras algunos autores refieren un claro predominio de las manifestaciones venosas frente a las arteriales (3; 27), otros encuentran una mayor frecuencia de afectación arterial (34). Es destacable que la presencia de manifestaciones arteriales en nuestro estudio fue de 4,1%, siendo de las más bajas referidas en la literatura, con un claro

predominio de las manifestaciones venosas frente a las arteriales, en línea con la mayoría de autores. Hay que destacar en dos pacientes la localización trombótica venosa inusual y la gravedad del cuadro clínico, afectando la vena cava, aurícula y ventrículo derecho en un caso, y los senos venosos cerebrales sagital, transverso y sigmoide en el otro paciente.

Muchos autores han analizado la existencia de asociaciones entre diferentes manifestaciones clínicas, buscando así factores predictores de la evolución de la enfermedad. Así, Demiroglu y cols (41) proponen que el desarrollo de trombosis en pacientes con EB predice la afectación ocular, Hamza y cols (40) afirman que el desarrollo de TVP se asocia a la presencia de eritema nodoso o pseudofoliculitis, y Tohme y cols (30) concluyen que los pacientes que desarrollan manifestaciones vasculares presentan con más frecuencia alteraciones digestivas. En nuestro estudio, no hemos podido encontrar ninguna de las citadas asociaciones, quizá debido a que el tamaño muestral no era suficiente.

La EB es más frecuente en el sexo femenino en países como los Estados Unidos, Corea y Brasil (270-272), mientras que en Asia, Medio Este, y en los países de la cuenca del Mediterráneo, es más frecuente en el sexo masculino (3; 273-275). En nuestro país, el estudio realizado por Eiroa y cols (268) refiere una mayor prevalencia de la EB en el sexo masculino. Los factores pronósticos más importantes de la EB son la afectación ocular y del SNC. Las causas principales de mortalidad son la afectación cardiovascular, pulmonar y gastrointestinal (47). En diferentes trabajos publicados, el sexo masculino presenta una mayor prevalencia de afectación ocular, de SNC, pulmonar, de TVP, tromboflebitis y test de patergia positivo. Teniendo en cuenta estos resultados, es de esperar que los pacientes varones tengan un curso más grave de la enfermedad (48). Algunos autores han propuesto que las mujeres desarrollan con más frecuencia que los varones aftas genitales (48; 277) y eritema nodoso (278; 279), mientras que los varones desarrollan con mayor frecuencia que las mujeres lesiones pápulo-pustulosas (277), tromboflebitis

(277-279), TVP (276; 278), afectación ocular (41; 278), neuro-Behect (47; 280; 281) y afectación pulmonar (282).

En nuestra serie de pacientes, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre sexos en ninguna de las manifestaciones cutáneas, probablemente a causa del tamaño de la muestra. La única diferencia que encontramos entre sexos fue la presencia de manifestaciones gastrointestinales más frecuentes en el sexo femenino ($p < 0,002$). En este sentido, los diversos trabajos publicados no han observado diferencias entre ambos sexos (279; 283). No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manifestaciones oculares ni trombóticas. Sin embargo, los cuadros clínicos oculares y trombóticos más graves ocurrieron en pacientes de sexo masculino; de hecho, tres varones desarrollaron ceguera total a causa de su enfermedad, mientras que ninguna mujer la desarrolló.

En ningún trabajo se ha evaluado sistemáticamente la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en la EB, por lo que consideramos que podría tener interés dada la asociación de los factores de riesgo cardiovascular con la trombosis arterial, y posiblemente de algún factor de riesgo cardiovascular como obesidad o hiperlipemia con la TVP (284; 285). Al comparar a los pacientes con EB que habían padecido trombosis con aquellos que no la habían padecido, no se observaron diferencias en el porcentaje de diabetes, hipertensión arterial o hiperlipemia. Esto sugiere que los factores de riesgo cardiovascular clásicos no parecen estar implicados en la patogenia de los eventos trombóticos en la EB, siendo este hecho congruente con que la mayor parte de eventos trombóticos en la presente serie han afectado al área venosa, donde el papel patogénico de estos factores es discutible (286).

Por lo tanto, respecto a las manifestaciones clínicas de la EB en nuestros pacientes, hemos observado que la frecuencia de éstas ha sido similar a la observada en otras provincias españolas, así como en otras áreas geográficas (Turquía, Grecia, Alemania, Italia). Las mujeres con EB han

presentado alteraciones digestivas con mayor frecuencia que los hombres. Las manifestaciones trombóticas y la uveítis posterior han afectado a hombres y mujeres en igual proporción, si bien la gravedad clínica ha sido mayor en los primeros. Adicionalmente, la mayor parte de eventos trombóticos han afectado al área venosa, constituyendo la presencia de eventos arteriales una rareza en la presente serie. En lo que se refiere a los factores de riesgo cardiovascular, la hiperlipemia, la hipertensión arterial y la diabetes no se han relacionado con la presencia de trombosis.

Asociación de los factores de riesgo tromboticos hereditarios (AT, proteína C, proteína S, F V Leiden, mutación G20210A del gen de la protrombina) y adquiridos (anticuerpos antifosfolípido) con el estado protrombótico de los pacientes con EB

Son múltiples los estudios realizados por diferentes autores para conocer los mecanismos protrombóticos presentes en la EB, pero al analizar todos ellos en su conjunto, pueden obtenerse pocas conclusiones, incluso los estudios que evalúan la trombofilia como principal mecanismo protrombótico encuentran resultados contradictorios. Adicionalmente, los trabajos realizados en este sentido en población española son escasos, a la vez que presentan un pequeño tamaño muestral. Por este motivo, decidimos estimar la prevalencia de defectos trombofílicos hereditarios (AT, PC, PS, F V Leiden, mutación G20210A del gen de la protrombina) y adquiridos en la EB y compararla con la de un grupo control, así como evaluar el posible papel de estos defectos en la génesis de eventos trombóticos.

La gran mayoría de los estudios publicados hasta el momento que han evaluado el posible papel de la PC, PS y AT en el estado protrombótico de la EB han coincidido en que ninguna de ellas está implicada en el mismo (225; 226; 228; 287). Únicamente se han descrito dos casos aislados de pacientes con EB y déficit de PC o de PS que desarrollaron TVP (229; 230). En ninguna

de las series de pacientes estudiadas (7; 211; 288), como tampoco en nuestro trabajo, se ha encontrado una asociación entre alguno de estos defectos trombofílicos y un mayor riesgo trombótico.

Con respecto a los ACAs, la mayoría de los trabajos no han encontrado una asociación entre su presencia y los fenómenos trombóticos en la EB (272; 289-291), sin embargo, algún trabajo aislado ha encontrado dicha asociación (258). En nuestro estudio, tampoco hemos observado ninguna asociación entre los ACAs y la trombosis en los pacientes con EB. Por ello, pensamos que la presencia de dichos anticuerpos no es responsable del estado protrombótico de la enfermedad, aunque en el caso de estar presentes puedan incrementar el riesgo trombótico de los pacientes con EB.

Uno de los aspectos más controvertidos es el papel que pueden jugar el F V Leiden, la mutación de la protrombina G20210A, y el polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en el estado protrombótico de la EB. El F V Leiden ha sido implicado en numerosos estudios en la patogenia de los eventos trombóticos en la EB (234-238; 244; 292). De hecho, autores como Gul (234) o Gurgey (238) encuentran que la presencia de dicha mutación incrementa el riesgo de trombosis en los pacientes con EB entre cinco y seis veces. Sin embargo, otros estudios no han obtenido los mismos resultados (7; 202; 204; 226; 233; 240; 293; 294). Uno de los motivos que puede explicar las discrepancias es la población en la que se han realizado los diferentes estudios. La gran mayoría de los trabajos que han encontrado asociación se han realizado en pacientes turcos (234; 236-238), donde la prevalencia de F V Leiden es muy elevada (294). Otro motivo que podría explicar las discrepancias radica en el tamaño muestral de los estudios que encontraron asociación, que desde nuestro punto de vista es insuficiente, i.e. 5 casos (236), 7 casos (292), 8 casos (235), 9 casos (237), de manera que las diferencias encontradas podrían ser debidas al azar (error tipo I). Por último, en parte de los citados trabajos en los que se encontró asociación, los autores determinaron la R-PCa, pero no la presencia de la mutación genética, por lo que un

porcentaje de los pacientes podrían padecer una R-PCa adquirida (237; 292). En nuestro estudio, no hemos encontrado una mayor prevalencia de F V Leiden en pacientes con EB con respecto al grupo control ($p=1,000$), ni tampoco en pacientes con EB con antecedentes de trombosis comparados con pacientes con EB sin trombosis ($p=1,000$). Los estudios realizados en nuestra área geográfica, con una prevalencia de F V Leiden similar, encuentran, al igual que nosotros, que el F V Leiden no parece jugar un papel en la tendencia trombótica de los pacientes con EB (7; 233; 293).

La mutación G20210A del gen de la protrombina ha sido evaluada por diferentes autores como posible causa del estado protrombótico de la EB. Del mismo modo que ocurre con otros defectos trombofílicos previamente comentados, los resultados al respecto son discordantes. Mientras Gul y cols encuentran que los pacientes con EB portadores de la mutación presentan un riesgo 14 veces mayor de desarrollar fenómenos trombóticos (244), otros autores concluyen que la mutación de la protrombina G20120A no parece jugar un papel en el estado protrombótico de la EB (7; 204; 232; 233; 238; 294). En el estudio que hemos llevado a cabo, el 13% de los pacientes con EB que desarrollaron trombosis eran portadores de dicha mutación, mientras que no hubo ningún portador en los pacientes con EB sin trombosis ($p=0,022$). Cabe destacar que uno de los pacientes era homocigoto para la mutación G20210A del gen de la protrombina, y en otro paciente dicha mutación se asociaba a F V Leiden (doble heterocigoto). La mutación G20210A del gen de la protrombina es el defecto protrombótico de origen genético más frecuente en la población española (104), con una prevalencia del 4 al 5% (105). Quizá esto explique la asociación encontrada en nuestro estudio. Por tanto, encontramos que la heterocigosidad para la mutación G20210A del gen de la protrombina parece estar implicada en la patogenia trombótica de los pacientes con EB, y que la homocigosidad para dicha mutación o la presencia de defectos trombofílicos combinados se asocia a cuadros trombóticos graves y de localización inusual.

Tras el estudio realizado para valorar la implicación de los defectos trombofílicos en la trombosis venosa de los pacientes con EB en el este de España, podemos concluir que éstos no son más prevalentes en pacientes con EB que han padecido fenómenos trombóticos, y por tanto no pueden explicar la tendencia protrombótica de la EB. Nuestros resultados coinciden con los de Espinosa y cols, que analizan a pacientes con EB pertenecientes al noreste de España (7). La discordancia de estos resultados con estudios realizados en otros países radica probablemente en la variabilidad de los factores trombofílicos en las diferentes áreas geográficas.

El metaanálisis realizado en el presente estudio demuestra una asociación entre la presencia de F V Leiden y la trombosis en la EB. Ésta se debe fundamentalmente a los estudios realizados en la población turca, ya que los llevados a cabo en otras áreas geográficas no muestran una asociación significativa entre la presencia de F V Leiden y trombosis en pacientes con EB. Por otro lado, en el metanaanálisis realizado, la mutación del gen G20210A de la protrombina se asocia a un incremento del riesgo trombótico en los pacientes con EB. Sin embargo, cuando analizamos únicamente los estudios realizados en la población turca, la mutación de dicho gen no se asocia a un incremento de riesgo trombótico. Por tanto, en los estudios realizados en población turca, existe en la EB una asociación entre la presencia de FV Leiden y la tendencia trombótica, mientras que no existe asociación para la mutación del gen G20210A de la protrombina.

Papel de los niveles de homocisteína plasmática y del polimorfismo C677T del gen de la MTHFR en el estado protrombótico y las alteraciones oculares de los pacientes con EB

La homocisteína es un aminoácido derivado de la metionina cuyo grupo sulfhidrilo puede producir citotoxicidad endotelial, inhibición de la glutathion peroxidasa y ON, interferencia con los factores de la coagulación y oxidación de las LDL (128). El piridoxal-5-fosfato, la forma activa de la vitamina B6, interviene en el metabolismo de la homocisteína, y además es necesario para la síntesis de ARNm y de proteínas, así como para la producción de citoquinas inflamatorias. Por tanto, en las enfermedades autoinmunes que cursan con procesos inflamatorios, el consumo de vitamina B6 podría generar un déficit de la misma y secundariamente una hiperhomocisteinemia plasmática. Asimismo, deficiencias nutricionales de cofactores o de sustratos enzimáticos como la vitamina B12 o el ácido fólico favorecen la aparición de niveles elevados de homocisteína. La hiperhomocisteinemia se considera un factor de riesgo independiente para la enfermedad arterial coronaria y para la trombosis venosa (292). El papel que juega la hiperhomocisteinemia en la etiopatogenia del estado protrombótico de la EB no está totalmente aclarado. Podrían estar involucrados varios procesos. La homocisteína puede dañar directamente el endotelio, incrementar el colesterol LDL y la agregación plaquetaria (129). Además, la homocisteína inhibe la activación de la TM, que actúa como cofactor de la PC (131) e inhibe la acción anticoagulante de la AT.

En los diversos trabajos publicados acerca del papel protrombótico de la hiperhomocisteinemia en la EB se han valorado dos aspectos. En primer lugar, se ha evaluado si los pacientes con EB presentan niveles plasmáticos de homocisteína significativamente superiores a los controles. En este sentido, algunos autores han encontrado niveles más elevados de homocisteína en pacientes con EB (248; 249; 251; 292; 295; 296), y otros no (202; 250). En segundo lugar, se ha evaluado si los pacientes con EB que habían desarrollado fenómenos trombóticos tenían niveles plasmáticos de homocisteína

significativamente superiores a los pacientes con EB que no los habían desarrollado. Gran parte de los estudios realizados en pacientes turcos encuentran diferencias estadísticamente significativas (247-249), pero otros estudios realizados también en pacientes turcos no encuentran dichas diferencias (251; 295; 296). Tampoco encuentran diferencias los estudios realizados en pacientes judíos (204) y coreanos (202). En el trabajo llevado a cabo por Lee y cols (202), los niveles de homocisteína en pacientes con EB que habían sufrido fenómenos trombóticos eran superiores a los de los controles, sin embargo, no existieron diferencias entre el conjunto de pacientes con EB y el grupo control, ni entre pacientes con EB y trombosis y pacientes con EB sin trombosis.

En el estudio que hemos llevado a cabo con motivo del presente trabajo, no hemos encontrado diferencias en los niveles de homocisteína entre los pacientes con EB y el grupo control, ni tampoco entre los pacientes con y sin trombosis. Una posible explicación de las discrepancias entre los diferentes trabajos radica en el porcentaje de pacientes que se encontraban en fase activa de la enfermedad cuando se llevó a cabo el estudio, dado que la actividad de la enfermedad, como es conocido, eleva los niveles plasmáticos de homocisteína (202). Los pacientes del presente trabajo no presentaban actividad clínica en el momento del estudio, o ésta era mínima, mientras que en otros estudios el porcentaje de enfermos en fase activa era de 12% (248), 39% (296) y 55% (247). Otro de los factores que podría explicar las discrepancias es que no en todos los trabajos que observaron hiperhomocisteinemia se ajustó por los posibles factores de confusión que pueden aumentar los niveles plasmáticos de homocisteína, como son la diabetes (297), la hiperlipemia (298), el tabaco (128), o el déficit de vitamina B12 (299), factores que han sido considerados en el presente estudio. En el área mediterránea, la dieta es rica en vitamina B6, B12, y ácido fólico, siendo infrecuente el déficit de estos nutrientes, por tanto, a pesar de que los procesos inflamatorios como la EB disminuyen los niveles plasmáticos de B6, la concentración plasmática de los cofactores se mantiene gracias a una dieta rica en los mismos. De hecho, no hemos encontrado

diferencias en los niveles de vitamina B12 al comparar casos y controles. Adicionalmente, los diferentes trabajos publicados al respecto tampoco son comparables en cuanto al tamaño muestral, el tiempo de evolución de la enfermedad, la metodología empleada para la obtención de los valores de homocisteína, o el tiempo transcurrido entre el evento trombótico y la determinación de la homocisteína (251).

Uno de los principales factores que regula los niveles de homocisteína plasmáticos es la enzima MTHFR, que cataliza el paso de homocisteína a metionina (115). La homocigosidad TT para la mutación C677T del gen de la MTHFR se asocia a una disminución de la actividad de dicha enzima, y por tanto a un aumento en los niveles plasmáticos de homocisteína. La causa genética más frecuente de niveles elevados de homocisteína es la mutación de la MTHFR (113). Los pacientes homocigotos para la citada mutación presentan niveles plasmáticos elevados de homocisteína (115). Asimismo, la homocigosidad para dicha mutación ha sido implicada como factor de riesgo para el desarrollo de trombosis (118), aunque no todos los autores apoyan esta hipótesis (120). Por este motivo, y en vista de la posible implicación de la homocigosidad para la mutación C677T del gen de la MTHFR en la patogenia de los fenómenos trombóticos de la EB, decidimos incluirla en nuestro estudio. Sólo hay cuatro trabajos en la literatura revisada que han estudiado la posible implicación de la homocigosidad para la mutación C677T del gen de la MTHFR en el estado protrombótico de la EB (7; 204; 232; 247). En ninguno de los trabajos citados se encontró asociación del genotipo TT con la trombosis venosa en la EB. Del mismo modo, en el presente estudio no hemos encontrado mayor prevalencia de dicho genotipo en los pacientes con EB (14,2%) al compararlos con el grupo control (16,6%), ni tampoco en los paciente con EB que padecieron fenómenos trombóticos (18,1%) al compararlos con los que no los sufrieron (12,7%). La prevalencia en los controles es similar a la referida anteriormente en nuestra área geográfica (117).

En el metanálisis llevado a cabo en el presente estudio, la mutación C677T del gen de la MTHFR no incrementa el riesgo trombótico en pacientes con EB.

Vía de la proteína C en pacientes con EB. Asociación de los niveles de PCa circulante con los eventos trombóticos en estos pacientes

Durante los últimos años se ha acumulado abundante información que demuestra la importancia fisiológica del sistema anticoagulante de la PC. Una revisión de los principales mecanismos fisiopatológicos que subyacen bajo ciertos estados de hipercoagulabilidad hereditaria o adquirida revela que una alteración del sistema de la PC es la causa de la mayoría de estos estados, lo que pone de relieve la importancia de esta vía anticoagulante natural para la prevención de la enfermedad trombótica. Para que se produzca una adecuada activación de la PC, se deben ensamblar perfectamente las moléculas de PC, trombina, TM y EPCR, formando un complejo cuaternario sobre la superficie de la célula endotelial. Por tanto, una alteración de algunas de las regiones de estos componentes podría dar lugar a una deficiente activación de la PC, que se reflejaría con un bajo nivel circulante de PCa y que podría dar lugar a un mayor riesgo trombótico (69).

Hemos encontrado niveles disminuidos de PCa en pacientes con EB respecto al grupo control. Además, entre los pacientes con EB, aquellos con una historia de trombosis tenían niveles de PCa significativamente inferiores que los pacientes sin historia de trombosis. Así, los pacientes con EB con niveles de PCa por debajo de 0,75 ng/ml (percentil 10% del grupo control) tenían cinco veces más riesgo de padecer trombosis venosa que aquellos pacientes con EB con niveles de PCa por encima de este valor. Un bajo nivel de PCa se ha asociado con un incremento en el riesgo de TVP (80), por lo que el hecho de encontrar valores de PCa significativamente inferiores en pacientes con EB que sufrieron eventos trombóticos frente a aquellos que no los

padecieron sugiere que los niveles disminuidos de PCa podrían estar implicados en la etiopatogenia del estado protrombótico de la EB.

Asimismo, los niveles de TM eran significativamente más bajos en el grupo de pacientes con EB que en el grupo control, y estaban más elevados en los pacientes con historia de trombosis que en los pacientes sin historia de trombosis. Gurgey (300) y Demirer (217) también han encontrado niveles de TM significativamente menores en pacientes con EB que en controles. Sin embargo, otros autores han encontrado niveles de TM más elevados en pacientes con EB que en controles sanos (7; 218). Esta diferencia puede deberse, posiblemente, a que los pacientes de las series estudiadas no presentaban el mismo grado de actividad de la EB (7).

La reducción de los niveles de TM y de PCa en los pacientes con EB podría explicarse por la acción de los mediadores proinflamatorios que están aumentados en la EB. El aumento de estos mediadores induce una disminución de la expresión de la TM endotelial, lo que a su vez puede producir una disminución de los niveles plasmáticos de TM soluble (301). Además, la reducción en la expresión de TM conllevará una reducción en la generación de PCa, con lo que los niveles plasmáticos estarán reducidos (302). La correlación positiva entre los niveles de TM y los de PCa en los pacientes apoya la plausibilidad de esta hipótesis. La expresión endotelial de TM puede disminuir por factores exógenos como mediadores proinflamatorios, o bien por mutaciones genéticas. De hecho, ha sido descrita la asociación entre mutaciones en el gen de la TM y un incremento del riesgo de trombosis (74; 75; 303; 304). Entre los mediadores proinflamatorios que pueden disminuir la expresión de TM endotelial están la endotoxina, la IL-1 y el TNF- α (77; 305). Ha sido documentada en la EB la presencia de un proceso inflamatorio crónico evidenciado por un incremento de los niveles plasmáticos de proteína C reactiva, α_1 AT, Fbg y F vW. Por tanto, tenemos dos mecanismos bien definidos que disminuyen la expresión endotelial de TM, y por tanto causan una reducción de la activación endotelial de la PC.

El PCI y la α_1 AT son los inhibidores plasmáticos más importantes de la PCa (306). Se ha descrito que un nivel elevado de α_1 AT puede reducir el nivel de PCa circulante. Sin embargo, aunque en nuestro estudio los pacientes con EB tenían niveles elevados de α_1 AT respecto a los controles, esta diferencia fue de 16%, muy inferior a la que se ha visto necesaria para influir en los niveles de PCa, 200% (78; 307). Además, los pacientes con EB y antecedentes de trombosis no presentaban niveles de α_1 AT más elevados que los pacientes con EB que no sufrieron eventos trombóticos, y tampoco encontramos correlación entre los niveles de PCa circulante y los de α_1 AT, por lo que la reducción de PCa observada en los pacientes con EB no puede ser debida a un aumento de la concentración de α_1 AT.

Por otra parte, un nivel de PCI aumentado también podría dar lugar a niveles reducidos de PCa. Sin embargo, los niveles de PCI eran similares en pacientes y controles, y los pacientes con EB y antecedentes de trombosis y bajos niveles de PCa circulante presentaron los niveles más bajos de PCI. Por tanto, no se pueden atribuir los bajos niveles de PCa en pacientes con EB y trombosis a un aumento del PCI. Para descartar que las concentraciones de los parámetros estudiados pudieran estar modificadas por los diferentes tratamientos prescritos a los pacientes a causa de su enfermedad, se subdividieron en tres grupos en función del tratamiento que recibían: antiinflamatorios, inmunosupresores, o ambos. Los tres grupos mostraron niveles inferiores de PCa al ser comparados con el grupo control. Por tanto, el tratamiento que siguen los pacientes tampoco puede explicar los niveles disminuidos de PCa y de TM en los pacientes con EB.

Nuestros resultados sugieren que los niveles disminuidos de PCa en pacientes con EB pueden estar implicados de la elevada incidencia de procesos trombóticos observada en estos pacientes. Además, el estado de los inhibidores de la PCa en los pacientes con EB apoya la hipótesis de que los niveles disminuidos de PCa observados en nuestros pacientes se deben a una disminución de la activación de la PCa nivel endotelial y no a un incremento de su degradación por los inhibidores plasmáticos. Estos resultados abren una

nueva vía para la investigación en la fisiopatología del estado protrombótico de los pacientes con EB.

Análisis de los parámetros hemorreológicos (VS, VP, Fbg, AE y DE) y su contribución de estos al estado protrombótico de los pacientes con EB

Las alteraciones hemorreológicas incrementan el riesgo de trombosis tanto a nivel arterial como venoso (144; 182), aunque su influencia en el desarrollo de eventos trombóticos en pacientes con EB no está totalmente establecida. Dentro de los diversos parámetros hemorreológicos, se ha sugerido que la hiperagregabilidad eritrocitaria puede jugar un importante papel en el desarrollo de fenómenos trombóticos en pacientes con EB (203). Ningún estudio previo ha valorado la implicación del resto de variables hemorreológicas, es decir, VS, VP y DE, en el estado protrombótico de la EB. Como es conocido, estas variables también juegan un papel crucial en las características del flujo sanguíneo, por lo que podrían contribuir al desarrollo de procesos trombóticos. Uno de los aspectos valorados en el presente trabajo doctoral ha sido la posible contribución de los parámetros hemorreológicos en el desarrollo de los eventos trombóticos en los pacientes con EB. Cuando hemos comparado a los pacientes con EB (n=42) con el grupo control (n=46), hemos observado que los primeros presentan un discreto síndrome de hiperviscosidad caracterizado por un incremento significativo de la VS a hematocrito corregido (p=0,006), de la VP (p=0,002), de la concentración de Fbg (p=0,001) y de la AE tanto en estasis (p=0,001) como a baja velocidad de cizallamiento sanguíneo (p=0,002). Estos resultados son congruentes con el hecho de que la EB es una enfermedad inflamatoria crónica con aumento de la concentración de Fbg (205; 217; 220), y por tanto con aumento de la VP, VS y AE, ya que estos parámetros reológicos dependen en gran medida de los niveles plasmáticos de Fbg. Hay que destacar el hecho de que la DE, valorada en el presente estudio mediante técnicas ectacitométricas, en las que no se manipula al hematíe, no se ha encontrado disminuida a ninguna de las

tensiones de cizallamiento aplicadas, aunque en otras enfermedades vasculares inflamatorias no es infrecuente observar hematíes menos deformables en relación al deterioro sufrido en el árbol vascular (308; 309). Un estudio reciente publicado por Uskuda y cols (310) ha observado una disminución de la DE en 13 pacientes con EB en fase activa al compararla con la de un grupo control. Estos resultados son cuestionables, ya que los autores utilizan técnicas de filtración donde el hematíe es aislado en columnas de algodón Immugard y resuspendido en sistemas tampón, manipulaciones que pueden producir alteraciones morfológicas del mismo. Asimismo, los leucocitos remanentes pueden también por su mayor tamaño taponar los poros de policarbonato (311). Por este motivo, actualmente se cuestiona la utilidad de las técnicas de filtración para determinar este parámetro reológico.

En nuestro estudio las alteraciones reológicas encontradas, es decir, aumento de VP, VS y AE han estado presentes a pesar de que los pacientes no se encontraban en una fase activa de la enfermedad, y tampoco se han visto relacionadas con la duración de la misma. Sin embargo, al clasificar a los pacientes en base a que hubiesen padecido eventos trombóticos o no, ninguno de los mencionados parámetros hemorreológicos mostró diferencias significativas entre ambos grupos, lo que sugiere que las alteraciones hemorreológicas, aunque presentes en la EB como corresponde a su naturaleza de enfermedad inflamatoria crónica, no parecen contribuir al desarrollo de eventos trombóticos en estos pacientes.

Un estudio reológico llevado a cabo en pacientes con EB es el publicado por Demiroglu y cols (203), donde se determina la AE mediante el agregómetro de Myrenne (310). En este un estudio prospectivo de 38 pacientes con EB se observó que aquellos que desarrollaron fenómenos trombóticos (12 pacientes) mostraron mayor AE que los que no los presentaron, sugiriendo que este parámetro reológico podría ser un marcador de riesgo trombótico. El seguimiento de los pacientes se realizó durante 13 meses. Este diseño de estudio no se puede llevar a cabo en nuestro medio debido a la baja

prevalencia de la EB en España. Hay que destacar el escaso número de pacientes del mencionado estudio, a la vez que se incluyeron en el grupo de fenómenos trombóticos aquellos pacientes con EB que habían padecido uveítis, lo que desde un punto de vista fisiopatológico es inadecuado, ya que la uveítis es un fenómeno inflamatorio no necesariamente relacionado con la trombosis. En nuestro estudio tampoco se observaron diferencias en la AE ni en el resto de parámetros hemorreológicos al comparar a los pacientes con uveítis con aquellos sin uveítis, sugiriendo que si los pacientes con uveítis se hubieran incluido en el grupo de pacientes con trombosis, los resultados hubiesen sido los mismos. Otro de los motivos que puede explicar las discrepancias entre ambos resultados puede radicar en que en el trabajo de Demiroglu y cols (203) no se indica la actividad clínica de los pacientes en el momento de su inclusión en el estudio, lo que en gran medida puede modificar la AE, ya que ésta fundamentalmente depende de los niveles de Fbg. En este sentido, en el presente trabajo se observa una correlación significativa entre la AE y los niveles de Fbg, mientras que Demiroglu y cols (203) no encuentran dicha correlación, no pudiendo ofrecer una explicación fisiopatológica al incremento de la AE.

Dados los resultados discordantes entre el presente estudio y el trabajo de Demiroglu y cols (203) acerca del aumento de la AE como factor protrombótico en pacientes con EB, a pesar de que ambos estudios se hayan realizado con el agregómetro Myrene, nos planteamos corroborar nuestros resultados preliminares mediante el agregómetro Sefam. El agregómetro Myrenne sólo mide el índice de agregabilidad, sin embargo, el agregómetro Sefam proporciona más información acerca del proceso de agregación, como el tiempo de agregación (T_a), la extensión de la agregación (IA_{10}), y el umbral de desagregación (γD), es decir, la velocidad de cizallamiento necesaria para desagregar los *rouleaux* formados (167). Hay que destacar que este estudio es el único que se ha llevado a cabo con este agregómetro en pacientes con EB. Se valoró la AE en 77 pacientes con EB (23 con trombosis y 54 sin trombosis) y en 77 controles con ambos agregómetros, analizando la posible asociación de

este parámetro reológico tanto con los eventos trombóticos como con la uveítis. Se han corroborado los resultados obtenidos previamente con el agregómetro Myrenne, encontrando que los pacientes con EB presentan mayor AE que el grupo control, determinada tanto con el agregómetro Myrenne como con el agregómetro Sefam (Ta y IA₁₀: $p < 0,001$; γD : $p = 0,014$). En este segundo estudio, realizado con un mayor tamaño muestral, se observa que el aumento de la AE se debe no sólo al aumento de Fbg ($p < 0,001$), sino también al aumento de triglicéridos ($p = 0,003$), ya que ambos parámetros son capaces de incrementar la AE (287; 311). Sin embargo, la AE determinada con ambos agregómetros no muestra diferencias significativas entre los pacientes con EB que habían padecido eventos trombóticos y los que no los habían padecido, a la vez que tampoco se observan diferencias al comparar a los pacientes con y sin uveítis. Por lo tanto, la AE determinada con dos agregómetros distintos no parece relacionarse con el desarrollo de fenómenos trombóticos ni con la presencia de uveítis en pacientes con EB.

V. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de manifestaciones clínicas encontrada en los pacientes con EB en la Comunidad Valenciana es similar a la observada en otras comunidades autónomas españolas, así como en otras áreas geográficas (Turquía, Grecia, Alemania o Italia).
2. No existen diferencias en la frecuencia de manifestaciones clínicas en los pacientes con EB al compararlas por sexos, excepto para las manifestaciones digestivas, más frecuentes en mujeres. La afectación ocular y los eventos trombóticos no han sido más frecuentes en los hombres que en las mujeres, aunque la gravedad de las mismas fue mayor en los primeros.
3. Los pacientes con EB de nuestra área geográfica presentan una mayor frecuencia de eventos trombóticos en el área venosa que en el área arterial.
4. Los factores de riesgo cardiovascular más comunes (hipercolesterolemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus) no parecen contribuir significativamente a la génesis de eventos trombóticos en pacientes con EB, dado que la mayoría de éstos han afectado al área venosa.
5. La presencia de factores de riesgo trombótico en los pacientes con EB de nuestra área geográfica, tanto hereditarios como adquiridos, no parecen jugar un papel significativo en el desarrollo de los eventos trombóticos en nuestros pacientes. Únicamente la mutación homocigota G20210A del gen de la protrombina, así como la presencia simultánea de varios de estos defectos de riesgo trombótico, se han asociado en nuestros pacientes a cuadros trombóticos graves de localización inusual.

6. El metaanálisis realizado confirma que la mutación G20210A del gen de la protrombina constituye un factor de riesgo trombótico en los pacientes con EB.

7. Los niveles de PCa están significativamente disminuidos en los pacientes con EB comparados con los controles, así como en los pacientes con EB que presentaron fenómenos trombóticos comparados con aquellos que no los presentaron. Por ello, los niveles disminuidos de PCa en estos pacientes podrían estar asociados al desarrollo de cuadros trombóticos. Esta disminución de los niveles de PCa podría deberse a una reducción de la activación de la PC en el endotelio, probablemente debido a una disminución de la expresión de la TM.

8. Los pacientes con EB presentan un discreto síndrome de hiperviscosidad, acorde con la naturaleza inflamatoria de la enfermedad, caracterizado por un aumento de la VS, VP, Fbg y AE, que no parece asociarse al desarrollo de eventos trombóticos ni de manifestaciones oculares.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. O'Duffy JD. Behcet's disease. *Curr Opin Rheumatol* 1994;6:39-43.
2. Kaklamani VG, Vaiopoulos G, Kaklamanis PG. Behcet's Disease. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:197-217.
3. Nakae K, Masaki F, Hashimoto T, Inaba G, Mochizuki M, Sakane T. Recent epidemiological features of Behçet's disease in Japan. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behçet's disease*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993. p.145-51.
4. Zouboulis CC, Kotter I, Djawari D, Kirch W, Kohl PK, Ochsendorf FR, et al. Epidemiological features of Adamantiades-Behcet's disease in Germany and in Europe. *Yonsei Med J* 1997;38:411-22.
5. González-Gay MA, García-Porrúa C, Branas F, López-Lazaro L, Olivieri I. Epidemiologic and clinical aspects of Behcet's disease in a defined area of Northwestern Spain, 1988-1997. *J Rheumatol* 2000;27:703-7.
6. Baixauli A, Calvo J, Tamarit JJ, Campos C, García S, Herrera A. Enfermedad de Behcet: estudio retrospectivo. *An Med Interna* 2001;18:405-10.
7. Espinosa G, Font J, Tassies D, Vidaller A, Deulofeu R, López-Soto A, et al. Vascular involvement in Behcet's disease: relation with thrombophilic factors, coagulation activation, and thrombomodulin. *Am J Med* 2002;112:37-43.
8. Krause I, Uziel Y, Guedj D, Mukamel M, Harel L, Molad Y, et al. Mode of presentation and multisystem involvement in Behcet's disease: the influence of sex and age of disease onset. *J Rheumatol* 1998;25:1566-9.
9. Gurler A, Boyvat A, Tursen U. Clinical manifestations of Behcet's disease: an analysis of 2147 patients. *Yonsei Med J* 1997;38:423-7.

10. Bang D, Lee JH, Lee ES, Lee S, Choi JS, Kim YK, et al. Epidemiologic and clinical survey of Behcet's disease in Korea: the first multicenter study. *J Korean Med Sci* 2001;16:615-8.
11. Fresko I, Soy M, Hamuryudan V, Yurdakul S, Yavuz S, Tumer Z, et al. Genetic anticipation in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1998;57:45-8.
12. Tohme A, el-Khoury I, Ghayad E. [Behcet disease. Genetic factors, immunologic aspects and new therapeutic methods]. *Presse Med* 1999;28:1080-4.
13. Hashimoto T. [Behcet's disease]. *Nippon Rinsho* 1999;57:374-7.
14. Verity DH, Wallace GR, Seed PT, Kondeatis E, Zureikat H, Fayyad F, et al. Soluble adhesion molecules in Behcet's disease. *Ocul Immunol Inflamm* 1998;6:81-92.
15. Triolo G, Accardo-Palumbo A, Triolo G, Carbone MC, Ferrante A, Giardina E. Enhancement of endothelial cell E-selectin expression by sera from patients with active Behcet's disease: moderate correlation with anti-endothelial cell antibodies and serum myeloperoxidase levels. *Clin Immunol* 1999;91:330-7.
16. Matsui T, Kurokawa M, Kobata T, Oki S, Azuma M, Tohma S, et al. Autoantibodies to T cell costimulatory molecules in systemic autoimmune diseases. *J Immunol* 1999;162:4328-35.
17. Kaya TI, Dur H, Tursen U, Gurler A. Association of class I HLA antigens with the clinical manifestations of Turkish patients with Behcet's disease. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:498-501.
18. International Study Group for Behcet's Disease. Criteria for diagnosis of Behcet's disease. *Lancet* 1990;335:1078-80.

19. Cantini F, Salvarani C, Niccoli L, Senesi C, Truglia MC, Padula A, et al. Behcet's disease with unusual cutaneous lesions. *J Rheumatol* 1998;25:2469-72.
20. Ghate JV, Jorizzo JL. Behcet's disease and complex aphthosis. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:1-18.
21. Onder M, Gurer MA. Behcet's disease: an enigmatic vasculitis. *Clin Dermatol* 1999;17:571-6.
22. Sullu Y, Oge I, Erkan D, Arirturk N, Mohajeri F. Cyclosporin-A therapy in severe uveitis of Behcet's disease. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:96-9.
23. Ando K, Fujino Y, Hijikata K, Izawa Y, Masuda K. Epidemiological features and visual prognosis of Behcet's disease. *Jpn J Ophthalmol* 1999;43:312-7.
24. Kotake S, Higashi K, Yoshikawa K, Sasamoto Y, Okamoto T, Matsuda H. Central nervous system symptoms in patients with Behcet disease receiving cyclosporine therapy. *Ophthalmology* 1999;106:586-9.
25. Bhakta BB, Brennan P, James TE, Chamberlain MA, Noble BA, Silman AJ. Behcet's disease: evaluation of a new instrument to measure clinical activity. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:728-33.
26. Koc Y, Gullu I, Akpek G, Akpolat T, Kansu E, Kiraz S, et al. Vascular involvement in Behcet's disease. *J Rheumatol* 1992;19:402-10.
27. Kabbaj N, Benjelloun G, Gueddari FZ, Dafiri R, Imani F. [Vascular involvements in Behcet disease. Based on 40 patient records]. *J Radiol* 1993;74:649-56.
28. Kuzu MA, Ozaslan C, Koksoy C, Gurler A, Tuzuner A. Vascular involvement in Behcet's disease: 8-year audit. *World J Surg* 1994;18:948-53.

29. Le Thi Huong D, Wechsler B, Papo T, Piette JC, Bletry O, Vitoux JM, et al. Arterial lesions in Behcet's disease. A study in 25 patients. *J Rheumatol* 1995;22:2103-13.
30. Tohme A, Aoun N, El-Rassi B, Ghayad E. Vascular manifestations of Behcet's disease. Eighteen cases among 140 patients. *Joint Bone Spine* 2003;70:384-9.
31. Bayraktar Y, Ozaslan E, Van Thiel DH. Gastrointestinal manifestations of Behcet's disease. *J Clin Gastroenterol* 2000;30:144-54.
32. Harper CM Jr, O'Neill BP, O'Duffy JD, Forbes GS. Intracranial hypertension in Behcet's disease: demonstration of sinus occlusion with use of digital subtraction angiography. *Mayo Clin Proc* 1985;60:419-22.
33. Malik GH, Sirwal IA, Pandit KA. Behcet's syndrome associated with minimal change glomerulonephritis and renal vein thrombosis. *Nephron* 1989;52:87-9.
34. Lakhanpal S, Tani K, Lie JT, Katoh K, Ishigatsubo Y, Ohokubo T. Pathologic features of Behcet's syndrome: a review of Japanese autopsy registry data. *Hum Pathol* 1985;16:790-5.
35. Mogulkoc N, Burgess MI, Bishop PW. Intracardiac thrombus in Behcet's disease: a systematic review. *Chest* 2000;118:479-87.
36. O'Connor GR. Epidemiology and pathogenesis of the ocular and cerebral forms of Behcet's disease. En: *International symposium on Behcet's disease*. Tokyo: University of Tokyo Press; 1982. p. 155.
37. Kosar F, Sahin I, Gullu H, Cehreli S. Acute myocardial infarction with normal coronary arteries in a young man with the Behcet's disease. *Int J Cardiol* 2005;99:355-7.

38. Krespi Y, Akman-Demir G, Poyraz M, Tugcu B, Coban O, Tuncay R, et al. Cerebral vasculitis and ischaemic stroke in Behcet's disease: report of one case and review of the literature. *Eur J Neurol* 2001;8:719-22.
39. James DG, Thomson A. Recognition of the diverse cardiovascular manifestation in Behcet's disease. *Am Heart J* 1982;103:457-8.
40. Hamza M. Maladie de Behçet. En: Kahn MF, editor. *Maladies et syndromes systémiques*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2000. p. 883-924.
41. Demiroglu H, Barista I, Dundar S. Risk factor assessment and prognosis of eye involvement in Behcet's disease in Turkey. *Ophthalmology* 1997;104:701-5.
42. Park JH, Chung JW, Joh JH, Song SY, Shin SJ, Chung KS, et al. Aortic and arterial aneurysms in Behcet disease: management with stent-grafts--initial experience. *Radiology* 2001;220:745-50.
43. Houman MH, Hamzaoui-B'Chir S, Ben Ghorbel I, Lamloum M, Ben Ahmed M, Abdelhak S, et al. [Neurologic manifestations of Behcet's disease: analysis of a series of 27 patients]. *Rev Med Interne* 2002;23:592-606.
44. Serdaroglu P. Behcet's disease and the nervous system. *J Neurol* 1998;245:197-205.
45. Moore PM, Richardson B. Neurology of the vasculitides and connective tissue diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;65:10-22.
46. Erkan F, Kiyani E, Tunaci A. Pulmonary complications of Behcet's disease. *Clin Chest Med* 2002;23:493-503.
47. Dilsen N, Konice M, Aral O. Risk factor for vital organ involvement in Behcet disease. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behçet's disease*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993. p.165-169.

48. Prokaeva T, Madanat W, Yermakova N. Sex dimorphism of Behcet disease. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993. p.182-189.
49. España F, Ratnoff OD. Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases. *J Lab Clin Med* 1983;102:31-45.
50. España F, Ratnoff OD. The role of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen in the contact activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents. *J Lab Clin Med* 1983;102:487-99.
51. Stubbs MT, Bode W. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem Sci* 1995;20:23-8.
52. Carrell RW, Pemberton PA, Boswell DR. The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1987;52:527-35.
53. Lawrence DA. The serpin-proteinase complex revealed. *Nat Struct Biol* 1997;4:339-41.
54. Abildgaard U. Binding of thrombin to antithrombin III. *Scand J Clin Lab Invest* 1969;24:23-7.
55. Villa P, Aznar J, Vayá A, España F, Ferrando F, Mira Y, et al. Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;82:1011-4.
56. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74:90-3.
57. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 2004;114:409-14.

58. Stief TW, Radtke KP, Heimbürger N. Inhibition of urokinase by protein C-inhibitor (PCI). Evidence for identity of PCI and plasminogen activator inhibitor 3. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1987;368:1427-33.
59. Kruithof EK. Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* 1988;40:113-21.
60. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
61. Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler Thromb* 1992;12:135-45.
62. Fulcher CA, Gardiner JE, Griffin JH, Zimmerman TS. Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. *Blood* 1984;63:486-9.
63. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269:26486-91.
64. Stern DM, Nawroth PP, Harris K, Esmon CT. Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C-protein S-mediated inactivation of factor Va. *J Biol Chem* 1986;261:713-8.
65. España F, Gruber A, Heeb MJ, Hanson SR, Harker LA, Griffin JH. In vivo and in vitro complexes of activated protein C with two inhibitors in baboons. *Blood* 1991;77:1754-60.
66. Heeb MJ, Griffin JH. Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. *J Biol Chem* 1988;263:11613-6.

67. Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH. Identification of divalent metal ion-dependent inhibition of activated protein C by alpha 2-macroglobulin and alpha 2-antiplasmin in blood and comparisons to inhibition of factor Xa, thrombin, and plasmin. *J Biol Chem* 1991;266:17606-12.
68. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 1998;92:2353-8.
69. España F, Medina P, Navarro S, Estellés A, Aznar J. Inherited abnormalities in the protein C activation pathway. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:241-4.
70. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina, RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996;76:824-34.
71. Ohlin AK, Marlar RA. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease. *Blood* 1995;85:330-6.
72. Biguzzi E, Merati G, Liaw PC, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, et al. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001;86:945-8.
73. Ohlin AK, Marlar RA. Thrombomodulin gene defects in families with thromboembolic disease--a report on four families. *Thromb Haemost* 1999;81:338-44.
74. Le Flem L, Picard V, Emmerich J, Gandrille S, Fiessinger JN, Aiach M, et al. Mutations in promoter region of thrombomodulin and venous thromboembolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1098-104.

75. Le Flem L, Mennen L, Aubry ML, Aiach M, Scarabin PY, Emmerich J, et al. Thrombomodulin promoter mutations, venous thrombosis, and varicose veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:445-51.
76. Kunz G, Ohlin AK, Adami A, Zoller B, Svensson P, Lane DA. Naturally occurring mutations in the thrombomodulin gene leading to impaired expression and function. *Blood* 2002;99:3646-53.
77. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987;79:124-30.
78. Mezzano D, España F, Panes O, Medina P, Pais E, Marshall G, et al. Increased activation of protein C, but lower plasma levels of free, activated protein C in uraemic patients: relationship with systemic inflammation and haemostatic activation. *Br J Haematol* 2001;113:905-10.
79. Vicente V, España F, Tabernero D, Estellés A, Aznar J, Hendl S, et al. Evidence of activation of the protein C pathway during acute vascular damage induced by Mediterranean spotted fever. *Blood* 1991;78:416-22.
80. España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, et al. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:1368-73.
81. España F, Zorio E, Medina P, Osa A, Estellés A, Palencia M, et al. Low levels of circulating activated protein C are a risk factor for myocardial infarction. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32:61(Abstract).
82. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.

83. Esmon CT, Fukudome K. Cellular regulation of the protein C pathway. *Semin Cell Biol* 1995;6:259-68.
84. Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:463-78.
85. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:395-403.
86. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM, Briet E. Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 1993;341:134-8.
87. Horellou MH, Conard J, Bertina RM, Samama M. Congenital protein C deficiency and thrombotic disease in nine French families. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289:1285-7.
88. Koster T, Rosendaal FR, Briet E, van der Meer FJ, Colly LP, Trienekens PH, et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). *Blood* 1995;85:2756-61.
89. Tait RC, Walker ID, Reitsma PH, Islam SI, McCall F, Poort SR, et al. Prevalence of protein C deficiency in the healthy population. *Thromb Haemost* 1995;73:87-93.
90. Zoller B, Hillarp A, Berntorp E, Dahlback B. Activated protein C resistance due to a common factor V gene mutation is a major risk factor for venous thrombosis. *Annu Rev Med* 1997;48:45-58.
91. García-Gala JM, Álvarez V, Pinto CR, Soto I, Urgelles MF, Menéndez MJ, et al. Factor V Leiden (R506Q) and risk of venous thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. *Clin Genet* 1997;52:206-10.

92. Zoller B, García de Frutos P, Hillarp A, Dahlback B. Thrombophilia as a multigenic disease. *Haematologica* 1999;84:59-70.
93. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995;85:1504-8.
94. Koeleman BP, Reitsma PH, Bertina RM. Familial thrombophilia: a complex genetic disorder. *Semin Hematol* 1997;34:256-64.
95. Leblanc ES, Laws A. Benefits and risks of third-generation oral contraceptives. *J Gen Intern Med* 1999;14:625-32.
96. Zuber M, Toulon P, Marnet L, Mas JL. Factor V Leiden mutation in cerebral venous thrombosis. *Stroke* 1996;27:1721-3.
97. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V, et al. Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1324-8.
98. Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9-13.
99. Ryan DH, Crowther MA, Ginsberg JS, Francis CW. Relation of factor V Leiden genotype to risk for acute deep venous thrombosis after joint replacement surgery. *Ann Intern Med* 1998;128:270-6.
100. Pihusch R, Danzl G, Scholz M, Harich D, Pihusch M, Lohse P, et al. Impact of thrombophilic gene mutations on thrombosis risk in patients with gastrointestinal carcinoma. *Cancer* 2002;94:3120-6.

101. Fijnheer R, Paijmans B, Verdonck LF, Nieuwenhuis HK, Roest M, Dekker AW. Factor V Leiden in central venous catheter-associated thrombosis. *Br J Haematol* 2002;118:267-70.
102. Demarmels Biasiutti F, Merlo C, Furlan M, Sulzer I, Binder BR, Lammle B. No association of APC resistance with myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995;6:456-9.
103. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 1998;79:706-8.
104. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Rio E, Oliver A, Mateo J, et al. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998;80:366-9.
105. Vayá A, Mira Y, Mateo J, Falcó C, Villa P, Estellés A, et al. Prothrombin G20210A mutation and oral contraceptive use increase upper-extremity deep vein thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2003;89:452-7.
106. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
107. Chamouard P, Pencreach E, Maloisel F, Grunebaum L, Ardizzone JF, Meyer A, et al. Frequent factor II G20210A mutation in idiopathic portal vein thrombosis. *Gastroenterology* 1999;116:144-8.
108. Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci PM. High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives. *N Engl J Med* 1998;338:1793-7.

109. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa MV, et al. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med* 2000;343:1015-8.
110. 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 20210A. *Circulation* 1998;97:1037-41.
111. Eikelboom JW, Baker RI, Parsons R, Taylor RR, van Bockxmeer FM. No association between the 20210 G/A prothrombin gene mutation and premature coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998;80:878-80.
112. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *JAMA* 1997;277:1775-81.
113. Rosendaal FR. Risk factors for venous thrombosis: prevalence, risk, and interaction. *Semin Hematol* 1997;34:171-87.
114. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
115. Seshadri N, Robinson K. Homocysteine, B vitamins, and coronary artery disease. *Med Clin North Am* 2000;84:215-37.
116. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
117. Guillén M, Corella D, Portolés O, González JI, Mulet F, Saiz C. Prevalence of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T mutation in the Mediterranean Spanish population. Association with cardiovascular risk factors. *Eur J Epidemiol* 2001;17:255-61.

118. Margaglione M, D'Andrea G, d'Addetta M, Giuliani N, Cappucci G, Iannaccone L, et al. The methylenetetrahydrofolate reductase TT677 genotype is associated with venous thrombosis independently of the coexistence of the FV Leiden and the prothrombin A20210 mutation. *Thromb Haemost* 1998;79:907-11.
119. Gemmati D, Serino ML, Trivellato C, Fiorini S, Scapoli GL. C677T substitution in the methylenetetrahydrofolate reductase gene as a risk factor for venous thrombosis and arterial disease in selected patients. *Haematologica* 1999;84:824-8.
120. Tosetto A, Missiaglia E, Frezzato M, Rodeghiero F. The VITA project: C677T mutation in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and risk of venous thromboembolism. *Br J Haematol* 1997;97:804-6.
121. Sie P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B. Constitutional heparin co-factor II deficiency associated with recurrent thrombosis. *Lancet* 1985;2:414-6.
122. Tran TH, Marbet GA, Duckert F. Association of hereditary heparin co-factor II deficiency with thrombosis. *Lancet* 1985;2:413-4.
123. Bertina RM, van der Linden IK, Engesser L, Muller HP, Brommer EJ. Hereditary heparin cofactor II deficiency and the risk of development of thrombosis. *Thromb Haemost* 1987;57:196-200.
124. Bernardi F, Legnani C, Micheletti F, Lunghi B, Ferraresi P, Palareti G, et al. A heparin cofactor II mutation (HCII Rimini) combined with factor V Leiden or type I protein C deficiency in two unrelated thrombophilic subjects. *Thromb Haemost* 1996;76:505-9.
125. Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam SI, McCall F. Isolated familial plasminogen deficiency may not be a risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost* 1996;76:1004-8.

126. Goodnough LT, Saito H, Ratnoff OD. Thrombosis or myocardial infarction in congenital clotting factor abnormalities and chronic thrombocytopenias: a report of 21 patients and a review of 50 previously reported cases. *Medicine (Baltimore)* 1983;62:248-55.
127. Lodi S, Isa L, Pollini E, Bravo AF, Scalvini A. Defective intrinsic fibrinolytic activity in a patient with severe factor XII-deficiency and myocardial infarction. *Scand J Haematol* 1984;33:80-2.
128. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001;81:645-72.
129. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354:407-13.
130. Dudman NP, Temple SE, Guo XW, Fu W, Perry MA. Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both cultured human cells and rats *In vivo*. *Circ Res* 1999;84:409-16.
131. Monnerat C, Hayoz D. [Homocysteine and venous thromboembolism]. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127:1489-96.
132. De Loughery, T.G. Síndrome de anticuerpos antifosfolípido, trombosis y hemostasia. Barcelona: Edika Med; 2001. p.175-6.
133. Koster T, Blann AD, Briet E, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet* 1995;345:152-5.
134. Kraaijenhagen RA, in't Anker PS, Koopman MM, Reitsma PH, Prins MH, van den Ende A, et al. High plasma concentration of factor VIIIc is a major risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2000;83:5-9.

135. Wells PS, Langlois NJ, Webster MA, Jaffey J, Anderson JA. Elevated factor VIII is a risk factor for idiopathic venous thromboembolism in Canada - is it necessary to define a new upper reference range for factor VIII? *Thromb Haemost* 2005;93:842-6.
136. O'Donnell J, Mumford AD, Manning RA, Laffan M. Elevation of FVIII:C in venous thromboembolism is persistent and independent of the acute phase response. *Thromb Haemost* 2000;83:10-3.
137. van Hylekama Vlieg A, van der Linden IK, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2000;95:3678-82.
138. Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, Bertina RM, Rosendaal FR. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 2000;342:696-701.
139. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000;95:2855-9.
140. Reutelingsperger CP. Annexins: key regulators of haemostasis, thrombosis, and apoptosis. *Thromb Haemost* 2001;86:413-9.
141. Rand JH. "Annexinopathies"--a new class of diseases. *N Engl J Med* 1999;340:1035-6.
142. 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.

143. Lowe GD. Blood viscosity and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1992;67:494-8.
144. Demiroglu H. The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology: considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders. *Blood* 1997;89:4236.
145. Chien S. Present state of blood rheology. En: Messmer K, Schmid-Schönbein H, editores. *Hemodilution: Theoretical Basis and Clinical Application*. Basel: Eds. S Karger, 1972;1-24.
146. Chien S. Blood rheology and its relation to flow resistance and transcapilar exchange with special reference to shock. *Adv Microcirc*. 1969;2:89-94.
147. Deng LH, Barbenel JC, Lowe GD. Influence of hematocrit on erythrocyte aggregation kinetics for suspensions of red blood cells in autologous plasma. *Biorheology* 1994;31:193-205.
148. Mohandas N, Chasis JA, Shohet SB. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties and shape. *Semin Hematol* 1983;20:225-30.
149. La Celle PL. Pathologic erythrocytes in microcirculation. *Blood Cells* 1975;1:269-76.
150. Mel HC, Yee JP. Erythrocyte size and deformability studies by resistive pulse spectroscopy. *Blood Cells* 1975;1:391-5.
151. Cokelet GR, Meiselman HJ. Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science* 1968;162:275-7.
152. Cook GM, Heard DH, Seaman GV. Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature* 1961;191:44-7.
153. Chien S, Sung LA, Simchon S, Lee MM, Jan KM, Skalak R. Energy balance in red cell interactions. *Ann N Y Acad Sci* 1983;416:190-206.

154. Reinhart WH, Singh A, Straub PW. Red blood cell aggregation and sedimentation: the role of the cell shape. *Br J Haematol* 1989;73:551-6.
155. Reinhart WH, Singh A. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *Eur J Clin Invest* 1990;20:458-62.
156. Nash GB , Meishelman HJ. Red cell aging: changes in deformability and other possible determinants of in vivo survival. *Microcirculation* 1981;1:255-62.
157. Hessel E, Agren JJ, Paulitschke M, Hanninen O, Hanninen A, Lerche D. Freshwater fish diet affects lipid composition, deformability and aggregation properties of erythrocytes. *Atherosclerosis* 1990;82:37-42.
158. Thoghi H, Yamanouchi H, Murakami M. Importance of the hematocrit as a risk factor in cerebral infarction. *Stroke* 1978;4:369-74.
159. Copley AL. On erythrocyte aggregation and disaggregation. *Clin Hemorheol* 1987;7:3-8.
160. Agosti R, D'Ettore M, Cherubini P. New aspects of erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol* 1988;8:603-10.
161. Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO. Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 1996;271:H2346-52.
162. Imaizumi K, Shiga T. Effect of immunoglobulins and IgG-fragments on the human erythrocyte aggregation, studied by a rheoscope combined with image analyzer. *Biorheology* 1983;20:569-77.
163. Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993;72:119-26.
164. Razavian SM, Atger V, Giral P, Cambillau M, Del-Pino M, Simon AC, et al. Influence of HDL subfractions on erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic men. PCVMETRA Group. *Arterioscler Thromb* 1994;14:361-6.

165. Assayag EB, Bornstein N, Shapira I, Mardi T, Goldin Y, Tolshinski T, et al. Inflammation-sensitive proteins and erythrocyte aggregation in atherothrombosis. *Int J Cardiol* 2005;98:271-6.
166. Schechner V, Shapira I, Berliner S, Comaneshter D, Hershcovici T, Orlin J, et al. Significant dominance of fibrinogen over immunoglobulins, C-reactive protein, cholesterol and triglycerides in maintaining increased red blood cell adhesiveness/aggregation in the peripheral venous blood: a model in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest* 2003;33:955-61.
167. Doolittle RF. Fibrinogen and fibrin. *Sci Am* 1981;245:92-101.
168. Nieuwenhuizen W. Biochemistry and measurement of fibrinogen. *Eur Heart J* 1995;16:6-10.
169. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993;118:956-63.
170. Folsom AR. Fibrinogen and cardiovascular risk markers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10:S13-6.
171. Grant PJ. Polymorphisms of coagulation/fibrinolysis genes: gene environment interactions and vascular risk. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:473-7.
172. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.
173. Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ, Sibershatz H, Tofler GT. Long-term influence of fibrinogen on initial and recurrent cardiovascular events in men and women. *Am J Cardiol* 1996;78:90-2.
174. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1477-82.

175. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, et al. Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA* 2005;294:1799-809.
176. Lawlor DA, Smith GD, Rumley A, Lowe GD, Ebrahim S. Associations of fibrinogen and C-reactive protein with prevalent and incident coronary heart disease are attenuated by adjustment for confounding factors. British Women's Heart and Health Study. *Thromb Haemost* 2005;93:955-63.
177. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation* 1991;83:836-44.
178. Yarnell JW, Patterson CC, Sweetnam PM, Lowe GD. Haemostatic/inflammatory markers predict 10-year risk of IHD at least as well as lipids: the Caerphilly collaborative studies. *Eur Heart J* 2004;25:1049-56.
179. Sweetnam PM, Thomas HF, Yarnell JW, Beswick AD, Baker IA, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity and the 10-year incidence of ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1996;17:1814-20.
180. Koenig W, Sund M, Filipiak B, Doring A, Lowel H, Ernst E. Plasma viscosity and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA-Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:768-72.
181. Resch KL, Ernst E, Matrai A, Paulsen HF. Fibrinogen and viscosity as risk factors for subsequent cardiovascular events in stroke survivors. *Ann Intern Med* 1992;117:371-5.

182. Lowe GD, Lee AJ, Rumley A, Price JF, Fowkes FG. Blood viscosity and risk of cardiovascular events: the Edinburgh Artery Study. *Br J Haematol* 1997;96:168-73.
183. Danesh J, Collins R, Peto R, Lowe GD. Haematocrit, viscosity, erythrocyte sedimentation rate: meta-analyses of prospective studies of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2000;21:515-20.
184. Lowe G, Rumley A, Norrie J, Ford I, Shepherd J, Cobbe S, et al. Blood rheology, cardiovascular risk factors, and cardiovascular disease: the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Thromb Haemost* 2000;84:553-8.
185. De Backer TL, De Buyzere M, Segers P, Carlier S, De Sutter J, Van de Wiele C, et al. The role of whole blood viscosity in premature coronary artery disease in women. *Atherosclerosis* 2002;165:367-73.
186. Aarts PA, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood. *Blood* 1984;64:1228-33.
187. Vayá A, Martínez M, Aznar J. Erythrocyte deformability in patients with an ischemic pathology. *Thromb Res* 1990;57:669-71.
188. Tanahashi N, Gotoh F, Tomita M, Shinohara T, Terayama Y, Mihara B, et al. Enhanced erythrocyte aggregability in occlusive cerebrovascular disease. *Stroke* 1989;20:1202-7.
189. Mchedlishvili G, Shakarishvili R, Momtselidze N, Gobejishvili L, Aloeva M, Mantskava M. Comparative values of erythrocyte aggregability versus other indices of hemorheological disorders in patients with ischemic brain infarcts. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;22:9-15.

190. Fisher M, Meiselman HJ. Hemorheological factors in cerebral ischemia. *Stroke* 1991;22:1164-9.
191. Ernst E, Matrai A, Marshall M. Blood rheology in patients with transient ischemic attacks. *Stroke* 1988;19:634-6.
192. Rainer C, Norris S, Haywood LJ, Meiselman HJ. Blood rheology and RBC aggregation in patients with angina pectoris and a prior history of myocardial infarction. *Clin Hemorheol* 1989;9:923-34.
193. Demiroglu H, Barista I, Dündar S. Erythrocyte aggregability in patients with coronary heart disease. *Clin Hemorheol* 1996;16:313-7.
194. Dormandy JA, Edelman JB. High blood viscosity: an aetiological factor in venous thrombosis. *Br J Surg* 1973;60:187-90.
195. Koppensteiner R, Hofmann S, Atteneder M, Minar E, Ehringer H. Blood rheology in acute deep venous thrombosis. Follow-up to one year after the acute event under conventional antocoagulant treatment. *Clin Hemorheol* 1992;12:495 (Abstract).
196. Mira Y, Vayá A, Martínez M, Villa P, Santaolaria ML, Ferrando F, et al. Hemorheological alterations and hypercoagulable state in deep vein thrombosis. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;19:265-70.
197. Vayá A, Mira Y, Martínez M, Villa P, Ferrando F, Estellés A, et al. Biological risk factors for deep vein thrombosis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002;26:41-53.
198. Alt E, Banyai S, Banyai M, Koppensteiner R. Blood rheology in deep venous thrombosis--relation to persistent and transient risk factors. *Thromb Res* 2002;107:101-7.
199. Krieger E, van Der Loo B, Amann-Vesti BR, Rousson V, Koppensteiner R. C-reactive protein and red cell aggregation correlate with late venous function after acute deep venous thrombosis. *J Vasc Surg* 2004;40:644-9.

200. Koster T, Rosendaal FR, Reitsma PH, van der Velden PA, Briet E, Vandenbroucke JP. Factor VII and fibrinogen levels as risk factors for venous thrombosis. A case-control study of plasma levels and DNA polymorphisms--the Leiden Thrombophilia Study (LETS). *Thromb Haemost* 1994;71:719-22.
201. Balendra R, Rumlev A, Orr M, Lennie S, McColl P, Lowe GDO. Blood lipids, coagulation, fibrinolysis and rheology in spontaneous proven deep vein thrombosis. *Brit J Haematol* 1991;77:83(Abstract).
202. Lee YJ, Kang SW, Yang JI, Choi YM, Sheen D, Lee EB, et al. Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behcet's disease. *Thromb Res* 2002;106:19-24.
203. Demiroglu H, Yalcin S, Buyukasik Y, Ozcebe OI, Dundar S. Increased erythrocyte aggregation as an indicator for an aggressive clinical course in Behcet's disease: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 1998;57:694-6.
204. Leiba M, Seligsohn U, Sidi Y, Harats D, Sela BA, Griffin JH, et al. Thrombophilic factors are not the leading cause of thrombosis in Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1445-9.
205. Ozatli D, Sayinalp N, Buyukasik Y, Karakus S, Haznedaroglu IC, Kirazli S, et al. Unchanged global fibrinolytic capacity despite increased factor VIIa activity in Behcet's disease: evidence of a prethrombotic state. *Rheumatol Int* 2002;21:137-40.
206. Tunc SE, Aksu K, Keser G, Oksel F, Doganavsargil E, Pirildar T, et al. Platelet-activating factor and P-selectin activities in thrombotic and nonthrombotic Behcet's patients. *Rheumatol Int* 2005;25:326-31.
207. Polat G, Eskandari G, Kaya TI, Tursen U, Bagdatoglu O, Ikizoglu G, et al. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T/G873A gene polymorphism and thrombosis in Behcet patients. *Haematologia (Budap)* 2002;32:121-8.

208. Hizli N, Sahin G, Sahin F, Kansu E, Duru S, Karacadag S, et al. Plasma prostacyclin levels in Behcet's disease. *Lancet* 1985;1:1454.
209. Haznedaroglu IC, Dundar S, Kiraz S. Eicosanoids in the prethrombotic state of Behcet's disease. *Thromb Res* 1995;80:445-6.
210. Cervera R, Navarro M, López-Soto A, Cid MC, Font J, Esparza J, et al. Antibodies to endothelial cells in Behcet's disease: cell-binding heterogeneity and association with clinical activity. *Ann Rheum Dis* 1994;53:265-7.
211. Ozoran K, Dugun N, Gurler A, Tutkak H, Tokgoz G. Plasma von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and antithrombin III levels in Behcet's disease. *Scand J Rheumatol* 1995;24:376-82.
212. Haznedaroglu IC, Ozdemir O, Ozcebe O, Dundar SV, Kirazli S. Circulating thrombomodulin as a clue of endothelial damage in Behcet's disease. *Thromb Haemost* 1996;75:974-5.
213. Ertenli I, Kiraz S, Celik IC, Haznedaroglu C, Erman M, Calguneri M, et al. Changes in the concentration and distribution of tissue factor pathway inhibitor in Behcet's disease and systemic lupus erythematosus: effect on the prethrombotic state. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1149-51.
214. Akarsu M, Demirkan F, Ozsan GH, Onen F, Yuksel F, Ozkan S, et al. Increased levels of tissue factor pathway inhibitor may reflect disease activity and play a role in thrombotic tendency in Behcet's disease. *Am J Hematol* 2001;68:225-30.
215. Kiraz S, Ertenli I, Calguneri M, Ozturk MA, Haznedaroglu IC, Altun B, et al. Interactions of nitric oxide and superoxide dismutase in Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:S25-9.

216. Ohdama S, Takano S, Miyake S, Kubota T, Sato K, Aoki N. Plasma thrombomodulin as a marker of vascular injuries in collagen vascular diseases. *Am J Clin Pathol* 1994;101:109-13.
217. Demirer S, Sengul N, Yerdel MA, Tuzuner A, Ulus AT, Gurler A, et al. Haemostasis in patients with Behcet's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:570-4.
218. Haznedaroglu IC, Ozcebe OI, Ozdemir O, Celik I, Dundar SV, Kirazli S. Impaired haemostatic kinetics and endothelial function in Behcet's disease. *J Intern Med* 1996;240:181-7.
219. Haznedaroglu IC, Ozcebe O, Celik I, Dundar SV, Kirazli S. Haemostatic markers of procoagulant imbalance in Behcet's disease. *Eur J Haematol* 1996;57:107-8.
220. Hampton KK, Chamberlain MA, Menon DK, Davies JA. Coagulation and fibrinolytic activity in Behcet's disease. *Thromb Haemost* 1991;66:292-4.
221. Aitchison R, Chu P, Cater DR, Harris RJ, Powell RJ. Defective fibrinolysis in Behcet's syndrome: significance and possible mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1989;48:590-3.
222. Undas A, Pinis G. [Subclinical pro-thrombotic state in a relapse of Behcet's disease--case report]. *Pol Arch Med Wewn* 1996;96:258-62.
223. Asbeck F, Meyer-Boernecke D, van de Loo J. Inhibition of the fibrinolytic system in Behcet's disease? *Haemostasis* 1977;6:303-9.
224. Donmez A, Aksu K, Celik HA, Keser G, Cagirgan S, Omay SB, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in Behcet's disease. *Thromb Res* 2005;115:287-92.
225. Nalcaci M, Pekcelen Y. Antithrombin III, protein C and protein S plasma levels in patients with Behcet's disease. *J Int Med Res* 1998;26:206-8.

226. Mader R, Ziv M, Adawi M, Mader R, Lavi I. Thrombophilic factors and their relation to thromboembolic and other clinical manifestations in Behcet's disease. *J Rheumatol* 1999;26:2404-8.
227. Sengul N, Demirer S, Yerdel MA, Terzioglu G, Akin B, Gurler A, et al. Comparison of coagulation parameters for healthy subjects and Behcet disease patients with and without vascular involvement. *World J Surg* 2000;24:1584-8.
228. Lenk N, Ozet G, Alli N, Coban O, Erbas S. Protein C and protein S activities in Behcet's disease as risk factors of thrombosis. *Int J Dermatol* 1998;37:124-5.
229. Shehto NM, Ghosh K, Abdul Kader B, al Assad HS. Extensive venous thrombosis in a case of Behcet's disease associated with heterozygous protein C deficiency. *Thromb Haemost* 1992;67:283.
230. Chafa O, Fischer AM, Meriane F, Chellali T, Sternberg C, Otmani F, et al. Behcet syndrome associated with protein S deficiency. *Thromb Haemost* 1992;67:1-3.
231. Bayraktar Y, Soylu AR, Balkanci F, Gedikoglu G, Cakmakci M, Sayek I. Arterial thrombosis leading to intestinal infarction in a patient with Behcet's disease associated with protein C deficiency. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2556-8.
232. Toydemir PB, Elhan AH, Tukun A, Toydemir R, Gurler A, Tuzuner A, et al. Effects of factor V gene G1691A, methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T, and prothombin gene G20210A mutations on deep venous thrombogenesis in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2000;27:2849-54.

233. Silingardi M, Salvarani C, Boiardi L, Accardo P, Iorio A, Olivieri I, et al. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutations in Italian patients with Behcet's disease and deep vein thrombosis. *Arthritis Rheum* 2004;51:177-83.
234. Gul A, Ozbek U, Ozturk C, Inanc M, Konice M, Ozcelik T. Coagulation factor V gene mutation increases the risk of venous thrombosis in behcet's disease. *Br J Rheumatol* 1996;35:1178-80.
235. Mammo L, Al-Dalaan A, Bahabri SS, Saour JN. Association of factor V Leiden with Behcet's disease. *J Rheumatol* 1997;24:2196-8.
236. Oner AF, Gurgey A, Gurler A, Mesci L. Factor V Leiden mutation in patients with Behcet's disease. *J Rheumatol* 1998;25:496-8.
237. Kosar A, Haznedaroglu IC, Buyukasik Y, Kirazli S, Dundar SV. Activated protein C resistance in Behcet's disease. *Rheumatol Int* 1998;17:249-50.
238. Gurgey A, Balta G, Boyvat A. Factor V Leiden mutation and PAI-1 gene 4G/5G genotype in thrombotic patients with Behcet's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:121-4.
239. Kiraz S, Ertenli I, Ozturk MA, Haznedaroglu IC, Celik I, Calguneri M. Pathological haemostasis and "prothrombotic state" in Behcet's disease. *Thromb Res* 2002;105:125-33.
240. Verity DH, Vaughan RW, Madanat W, Kondeatis E, Zureikat H, Fayyad F, et al. Factor V Leiden mutation is associated with ocular involvement in Behcet disease. *Am J Ophthalmol* 1999;128:352-6.
241. Salvarani C, Calamia K, Silingardi M, Ghirarduzzi A, Olivieri I. Thrombosis associated with the prothrombin G-->A20210 mutation in Behcet's disease. *J Rheumatol* 2000;27:515-6.

242. Batioglu F, Atmaca LS, Karabulut HG, Beyza Sayin D. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutations in ocular Behcet disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81:283-5.
243. Chen Y, Stanford MR, Wallace GR, Vaughan RW, Kondeatis E, Fortune F. Factor V Leiden mutation does not correlate with retinal vascular occlusion in white patients with Behcet's disease. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1048-9.
244. Gul A, Aslantas AB, Tekinay T, Konice M, Ozcelik T. Procoagulant mutations and venous thrombosis in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:1298-9.
245. Tursen U, Kaya TI, Eskandari G, Gunduz O, Yazar M, Ikizoglu G, et al. Association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation with Behcet's disease. *Arch Dermatol Res* 2001;293:537-9.
246. Vayá A, Forner MJ, Estellés A, Villa P, Mira Y, Ferrando F, et al. Intracardiac thrombosis in a case of Behcet's disease associated with the prothrombin 20210G-A mutation. *Haematologica* 2000;85:425-8.
247. Canataroglu A, Tanriverdi K, Inal T, Seydaoglu G, Arslan D, Ozbek S, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T mutation and plasma homocysteine level in Behcet's disease. *Rheumatol Int* 2003;23:236-40.
248. Aksu K, Turgan N, Oksel F, Keser G, Ozmen D, Kitapcioglu G, et al. Hyperhomocysteinaemia in Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:687-90.
249. Ates A, Aydintug O, Olmez U, Duzgun N, Duman M. Serum homocysteine level is higher in Behcet's disease with vascular involvement. *Rheumatol Int* 2005;25:42-4.

250. Calikoglu E, Oztas M, Sengul N, Adam B, Gurer MA. Serum homocysteine level in Behcet's disease. *Haematologia (Budap)* 2002;32:219-24.
251. Korkmaz C, Bozan B, Kosar M, Sahin F, Gulbas Z. Is there an association of plasma homocysteine levels with vascular involvement in patients with Behcet's syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:S30-4.
252. Laraqui A, Bennouar N, Meggouh F, Allami A, Kadiri NE, Benkouka F, et al. [Homocysteine, lipoprotein (a): risk factors for coronary heart disease]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2002;60:549-57.
253. Kircher T, Sinzinger H. Homocysteine--relevant for atherogenesis? *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:523-32.
254. Okka M, Ozturk M, Kockar MC, Bavbek N, Rasier Y, Gunduz K. Plasma homocysteine level and uveitis in Behcet's disease. *Isr Med Assoc J* 2002;4:931-4.
255. El-Ageb EM, Al-Maini MH, Al-Shukaily AK, Al-Farsi Y, Richens ER. Clinical features of Behcet's disease in patients in the Sultanate of Oman; the significance of antiphospholipid antibodies? *Rheumatol Int* 2002;21:176-81.
256. Musabak U, Baylan O, Cetin T, Yesilova Z, Sengul A, Saglam K, et al. Lipid profile and anticardiolipin antibodies in Behcet's disease. *Arch Med Res* 2005;36:387-92.
257. Bergman R, Lorber M, Lerner M, Brik R, Friedman-Birnbaum R. Anticardiolipin antibodies in Behcet's disease. *J Dermatol* 1990;17:164-7.
258. Hull RG, Harris EN, Gharavi AE, Tincani A, Asherson RA, Valesini G, et al. Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behcet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984;43:746-8.

259. Zouboulis CC, Buttner P, Tebbe B, Orfanos CE. Anticardiolipin antibodies in Adamantiades-Behcet's disease. *Br J Dermatol* 1993;128:281-4.
260. Vayá A, Falcó C, Reganón E, Vila V, Martínez-Sales V, Corella D, et al. Influence of plasma and erythrocyte factors on red blood cell aggregation in survivors of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2004;91:354-9.
261. Ernst E, Hein A, Meurer M, Ruzicka T. Blood rheology in lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1991;50:710-2.
262. Rosenson RS, Shott S, Katz R. Elevated blood viscosity in systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 2001;31:52-7.
263. Azizlerli G, Kose AA, Sarica R, Gul A, Tutkun IT, Kulac M, et al. Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey. *Int J Dermatol* 2003;42:803-6.
264. Yurdakul S, Hamuryudan V, Yazici H. Behcet syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:38-42.
265. Pipitone N, Boiardi L, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, Malatesta R, et al. Clinical manifestations of Behcet's disease in 137 Italian patients: results of a multicenter study. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22:S46-51.
266. Zouboulis CC, Vaiopoulos G, Marcomichelakis N, Palimeris G, Markidou I, Thouas B, et al. Onset signs, clinical course, prognosis, treatment and outcome of adult patients with Adamantiades-Behcet's disease in Greece. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:S19-26.
267. Tursen U, Gurler A, Boyvat A. Evaluation of clinical findings according to sex in 2313 Turkish patients with Behcet's disease. *Int J Dermatol* 2003;42:346-51.
268. Eiroa P, Sánchez J, Rosales M. Estudio epidemiológico de la Enfermedad

- de Behcet en el área Sanitaria de La Coruña. *Rev Esp Reumatol* 1991;18:285-7.
269. Lakhanpal S, Tani K, Lie JT, Katoh K, Ishigatsubo Y, Ohokubo T. Pathologic features of Behcet's syndrome: a review of Japanese autopsy registry data. *Hum Pathol* 1985;16:790-5.
270. Davis GL, Brissett D. Experiencing Behçet's Disease: a view from 245 patients. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behçet's disease*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993. p.211-4.
271. Scherer MA, Vitral N, Orefice F. Clinical study of Behçet's Disease in Brazil. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behçet's disease*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1993. p.181-4.
272. Bang D, Yoon KH, Chung HG, Choi EH, Lee ES, Lee S. Epidemiological and clinical features of Behcet's disease in Korea. *Yonsei Med J* 1997;38:428-36.
273. Benamour S, Bennis R, Amraoui A. A study of 285 cases of Behçet's disease. En: O'Duffy JD, Kökmen E, editors. *Behcet's disease basic and clinical aspects*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1991. p.259-67.
274. Valesini G, Pezzi PP, Catarinelli G. Clinical Manifestations of Behçet's disease in Italy: Study of 155 patients at Rome University. En: O'Duffy JD, Kökmen E, editors. *Behcet's disease basic and clinical aspects*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1991. p.279-89.
275. Gharibdoost F, Davatchi F, Shahram F. Clinical Manifestations of Behçet's Disease in Iran Analysis of 2176 cases. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behcet's disease*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 153-8.
276. Dilsen N, Konice M, Aral O. Risk factor for vital organ involvement in Behcet disease. En: Godeau P, Wechsler B, editors. *Behcet's disease*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 165-9.

277. O'Neill TW, Rigby AS, McHugh S. Regional differences in clinical manifestations of Behçet's disease. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 159-63.
278. Yazici H, Tuzun Y, Pazarli H, Yurdakul S, Ozyazgan Y, Ozdogan H, et al. Influence of age of onset and patient's sex on the prevalence and severity of manifestations of Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984;43:783-9.
279. Zouboulis ChC, Djawari D, Kirch W. Adamatiades-Behçet's Disease in Germany. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 193-6.
280. Hentati F, Fredj M, Gharbi N. Clinical and biological aspects of Neuro-Behçet's in Tunisia. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 415-8.
281. Bohlega SAI, Kawi MZ, Omer S. Neuro-Behçet's syndromes and prognosis. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 429-33.
282. Dilsen N, Çavdar T, Aral O. Pulmonary involvement in Behçet's Disease in Turkey. En: O'Duffy JD, Kökmen E, editors. Behçet's disease basic and clinical aspects. New York: Marcel Dekker Inc.; 1991. p.195-203.
283. Assad-Khalil S, Abou-Seif M, Abou-Seif S. Neurological involvement in Behçet's Disease: clinical, genetic and computed tomographic study. En: Godeau P, Wechsler B, editors. Behçet's disease. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 409-14.
284. Abdollahi M, Cushman M, Rosendaal FR. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 2003;89:493-8.

285. Vayá A, Mira Y, Ferrando F, Contreras M, Estellés A, España F, et al. Hyperlipidaemia and venous thromboembolism in patients lacking thrombophilic risk factors. *Br J Haematol* 2002;118:255-9.
286. Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: too many tests, too much conflicting data. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;353-68.
287. Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993;72:119-26.
288. Guermazi S, Hamza M, Dellagi K. Protein S deficiency and antibodies to protein S in patients with Behcet's disease. *Thromb Res* 1997;86:197-204.
289. Karmochkine M, Boffa MC, Wechsler B, Piette JC, Godeau P. Absence of antiphospholipid antibodies in Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 1993;52:623.
290. Kang HJ, Lee YW, Han SH, Cho HC, Lee KM. Anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I antibodies in Behcet's disease. *J Korean Med Sci* 1998;13:400-4.
291. Priori R, Conti F, Pittoni V, Garofalo T, Sorice M, Valesini G. Is there a role for anti-phospholipid-binding protein antibodies in the pathogenesis of thrombosis in Behcet's disease? *Thromb Haemost* 2000;83:173-4.
292. Altinbas A, Aytemur K, Tokgozoglul L, Ozturk M, Kosar A, Haznedaroglu IC, et al. Hyperhomocysteinaemia and activated protein C resistance in Behcet's disease. *J Intern Med* 2000;248:267-8.
293. Lesprit P, Wechsler B, Piette JC, Du-Boutin LT, Godeau P, Alhenc-Gelas M, et al. Activated protein C resistance caused by factor V Arg 506-->Gln mutation has no role in thrombotic manifestations of Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 1995;54:860.

294. Ates A, Duzgun N, Ulu A, Tiryaki AO, Akar N. Factor V gene (1691A and 4070G) and prothrombin gene 20210A mutations in patients with Behcet's disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;33:157-63.
295. Houman H, Feki M, Ghorbel IB, Gadhoun H, Hsairi M, Omar S, et al. Does hyperhomocysteinemia increase the risk of thrombosis in Behcet's disease? *Adv Exp Med Biol* 2003;528:413-7.
296. Feki M, Houman H, Ghannouchi M, Smiti-Khanfir M, Hamzaoui K, Matri LE, et al. Hyperhomocysteinaemia is associated with uveitis but not with deep venous thrombosis in Behcet's disease. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1417-23.
297. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Beks PJ, Mackaay AJ, Jakobs C, Bouter LM, et al. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:133-8.
298. Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, Tracy T, Sieve-Smith L, Wang Y. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 1995;75:132-6.
299. Mason JB, Miller JW. The effects of vitamins B12, B6, and folate on blood homocysteine levels. *Ann N Y Acad Sci* 1992;669:197-203.
300. Gurgey A, Gurler A, Oner AF, Mesci L, Kirazli S. Thrombomodulin levels in Behcet's disease with and without the factor V Leiden mutation. *Clin Rheumatol* 1998;17:186-8.

301. Archipoff G, Beretz A, Freyssinet JM, Klein-Soyer C, Brisson C, Cazenave JP. Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochem J* 1991;273:679-84.
302. Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-García L, Folsom AR, Juneja H, et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet* 1999;353:1729-34.
303. Norlund L, Zoller B, Ohlin AK. A novel thrombomodulin gene mutation in a patient suffering from sagittal sinus thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78:1164-6.
304. Ohlin AK, Norlund L, Marlar RA. Thrombomodulin gene variations and thromboembolic disease. *Thromb Haemost* 1997;78:396-400.
305. Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 1988;8:5588-92.
306. Heeb MJ, Espana F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989;73:446-54.
307. España F, Zuazu I, Vicente V, Estellés A, Marco P, Aznar J. Quantification of circulating activated protein C in human plasma by immunoassays--enzyme levels are proportional to total protein C levels. *Thromb Haemost* 1996;75:56-61.
308. Cortinovis A, Crippa A, Crippa M. [Factor VIII/Ag (von Willebrand) and protein C. Erythrocyte deformability and aggregability. The risk parameters of retinal vein occlusion]. *Minerva Med* 1994;85:211-9.

309. Lau CS, Saniabadi AR, Belch JJ. Reduced red blood cell deformability in patients with rheumatoid vasculitis. Improvement after in vitro treatment with dipyridamole. *Arthritis Rheum* 1995;38:248-53.
310. Uskudar O, Erdem A, Demiroglu H, Dikmenoglu N. Decreased erythrocyte deformability in Behcet's disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005; 33: 89-94.
311. Stuart J, Stone PCS, Bareford D. Evaluation of leukocyte removal methods for studies of erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1985;5:137.
312. Schmid-Schönbein H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H, Daver V, Heilmann L. New hemorrheological techniques for the routine laboratory. *Clin Hemorrheol* 1983;2:93-105.
313. Falcó C, Vayá A, Simó M, Contreras T, Santaolaria M, Aznar J. Influence of fibrinogen levels on erythrocyte aggregation determined with the Myrenne aggregometer and the Sefam erythro-aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33:145-51.