

Anexina V en pacientes supervivientes de un infarto de miocardio prematuro

Vanessa Roldán^a, Francisco Marín^b, Javier Pineda^b, Pascual Marco^c, Javier Corral^d, Vicente Climent^b, Amaya García^b, Juan G. Martínez^b y Francisco Sogorb^b

^aUnidad de Hematología. Hospital de San Vicente. Alicante. Servicios de ^bCardiología y de ^cHematología. Hospital General Universitario de Alicante. ^dServicio de Hematología. Hospital Morales Meseguer. Murcia. Javier Corral es un contratado «Ramón y Cajal» de la Universidad de Murcia. España.

Introducción. La anexina V presenta un importante efecto anticoagulante *in vitro* debido a su habilidad para desplazar las proteínas de la coagulación de la superficie de los fosfolípidos. Se cree que uno de los mecanismos patogénicos de los anticuerpos antifosfolípidos (AAF) podría ser debido a un desplazamiento de la anexina V de la superficie de los fosfolípidos de membrana. Hemos estudiado la concentración de anexina V analizando su relación con los factores de riesgo cardiovascular y diferentes marcadores hematológicos.

Pacientes y método. Se estudiaron 62 pacientes que habían sufrido un infarto de miocardio prematuro y 23 sujetos control. Se determinó la concentración plasmática de anexina V y la presencia de los siguientes anticuerpos: AAF, anti- $\beta 2$ glucoproteína I ($\beta 2$ -GPI), anti- $\beta 2$ -GPI/unidos a fosfolípidos y anti-anexina V. Se determinaron los valores de colesterol, colesterol HDL, triglicéridos, activador tisular del plasminógeno y su inhibidor, ambos antigénicos, factor von Willebrand y fibrinógeno.

Resultados. El grupo de pacientes presentó una concentración significativamente menor de anexina V respecto al grupo control: 0,640 (0,520-0,818) frente a 1,570 ng/ml (1,140-2,390); $p < 0,01$. Sólo 2 pacientes presentaron anticuerpos anti- $\beta 2$ -GPI/unidos a fosfolípidos y otros 2, anticuerpos antianexina. No se detectó ninguna positividad a los AAF o anti- $\beta 2$ -GPI. No se encontró ninguna asociación entre los valores de anexina V y los otros marcadores estudiados.

Conclusiones. La menor concentración de anexina V en pacientes que han sufrido un infarto prematuro podría expresar una tendencia protrombótica. Su papel protrombótico no parece estar relacionado con la presencia de AAF.

Palabras clave: Infarto de miocardio. Trombosis. Anticuerpos.

VER EDITORIAL EN PÁGS. 1223-5

Correspondencia: Dr. F. Marín.
Servicio de Cardiología.
Hospital General Universitario de Alicante.
Pintor Baeza. s/n. 03010 Alicante. Spain.
Correo electrónico: fcomarino@hotmail.com

Recibido el 11 de diciembre de 2001.
Aceptado para su publicación el 15 de julio de 2002.

Annexin V Levels in Survivors of Early Myocardial Infarction

Introduction and objectives. Annexin V has an anticoagulant effect *in vitro* that derives from its ability to displace coagulation proteins from phospholipid surfaces, prolonging phospholipid-dependent coagulation reactions. Antiphospholipid antibodies (APL) and annexin V have an affinity for anionic phospholipids, so it has been hypothesized that one of the thrombotic mechanisms of APL may be due to displacement of annexin V from phospholipid surfaces. We studied plasma annexin V levels and analyzed its relationship to risk factors and several blood markers.

Patients and method. We studied 62 patients < 45 years old who had suffered myocardial infarction. The control group comprised 23 healthy subjects of similar age and sex. We analyzed the presence of APL, anti- $\beta 2$ glycoprotein I ($\beta 2$ -GPI), anti- $\beta 2$ -GPI/phospholipid complexes and anti-annexin V antibodies. We determined plasma annexin V levels. Cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, antigenic tissue plasminogen activator and its inhibitor, von Willebrand factor, and fibrinogen levels were measured.

Results. We detected only 2 patients with positive anti- $\beta 2$ -GPI/phospholipid complexes and 2 patients with positive anti-annexin V antibodies. We did not detect any positive APL or anti- $\beta 2$ -GPI antibodies. In the control group there was only 1 patient with positive APL and anti- $\beta 2$ -GPI antibodies. The myocardial infarction group showed significantly lower levels of annexin V than the control group: 0.640 ng/ml (0.520-0.818 ng/ml) vs 1.570 ng/ml (1.140-2.390 ng/ml), $p < 0.01$. There were no statistical associations between annexin V levels and other variables.

Conclusions. The low levels of annexin V in young myocardial infarction patients could indicate a procoagulant trend. This hypercoagulable state was unrelated to the presence of APL.

Key words: Myocardial infarction. Thrombosis. Antibodies.

Full English text available at: www.revespcardiol.org

ABREVIATURAS

IM: infarto de miocardio.
ANV: anexina V.
AAF: anticuerpos antifosfolípido.
ELISA: enzoinmunoanálisis.
t-PA: activador tisular del plasminógeno.
PAI-1: inhibidor del t-PA.

INTRODUCCIÓN

La aparición de un infarto de miocardio (IM) es fruto de la interrelación entre los factores medioambientales y la predisposición individual de cada paciente. Aquellos que sufren un IM en edad prematura han estado expuestos durante un menor tiempo a los factores de riesgo cardiovascular y presentan, además, una menor afección arteriosclerótica en el estudio angiográfico¹. Por ello, el papel de los factores protrombóticos podría tener una mayor relevancia en esta población. El estudio de estos factores en el IM prematuro permitiría conocer la posible implicación de un estado de hipercoagulabilidad en la patogenia de los síndromes coronarios agudos.

La elevación de determinados factores hemostáticos parece desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de los síndromes coronarios. Varios factores protrombóticos y marcadores de daño endotelial se han asociado con un aumento del riesgo de infarto de miocardio, entre ellos el fibrinógeno², el activador tisular del plasminógeno (t-PA)²⁻⁴ y el factor von Willebrand^{2,3}.

La anexina V (ANV) es una glucoproteína dependiente del calcio con una potente capacidad anticoagulante *in vitro*⁵, debida fundamentalmente a su gran afinidad por los fosfolípidos de membrana cargados negativamente, inhibiendo los complejos protrombinasa y X-asa, y reduciendo la adhesión y agregación plaquetarias⁶. La ANV circulante podría ser liberada de células presentes en la pared vascular (células endoteliales, musculares lisas) o células secretoras del hígado o bazo, y una vez en el plasma se uniría a las células sanguíneas (plaquetas y eritrocitos) o a las células endoteliales⁷. La ANV parece formar un «escudo antitrombótico» alrededor de los fosfolípidos, desplazando los factores de la coagulación de la superficie de éstos⁸, siendo capaz de inhibir los complejos protrombinasa y X-asa, así como reducir la adhesión y agregación plaquetarias⁷. Además, la ANV posee alta afinidad por células apoptóticas, ya que éstas exponen gran cantidad de fosfolípidos, sobre todo fosfatidilserina⁹.

Por otro lado, se ha propuesto que la ANV podría desempeñar un papel fundamental en los mecanismos trombogénicos de los anticuerpos antifosfolípido

(AAF)⁹. Fracciones de IgG de pacientes con AAF reducen la presencia de ANV en cultivos de células trofoblásticas y endoteliales⁸, produciendo un incremento en la cantidad de fosfolípidos aniónicos capaces de activar la coagulación⁵. Es conocido que la presencia de AAF se ha asociado con un estado de hipercoagulabilidad¹⁰ y, aunque la aparición de un IM como manifestación del síndrome antifosfolípido es poco frecuente, se ha propuesto que se estudie de forma sistemática la presencia de AAF en todo paciente joven que sufre un IM¹¹. Sin embargo, la verdadera importancia de los AAF en el IM es muy controvertida.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado cómo un cambio de citosina por timina, en la secuencia Kozak del gen que codifica la ANV, es un factor protector independiente para el desarrollo de un infarto de miocardio prematuro¹². Dicho polimorfismo condiciona una mayor eficacia en la traducción proteica, con valores más elevados de ANV en el plasma.

Nuestro objetivo fue estudiar la concentración plasmática de ANV en pacientes que habían sufrido un infarto prematuro y analizar su relación con los factores de riesgo cardiovascular, presencia de AAF, así como con otros marcadores hematológicos.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes

Se estudiaron 62 pacientes consecutivos procedentes de un seguimiento periódico en nuestras consultas (60 varones y 2 mujeres, con una edad de $47,7 \pm 5,9$ años) que habían sufrido un infarto de miocardio antes de los 45 años. Los criterios de exclusión del estudio fueron: a) cirugía, infección aguda o enfermedad inflamatoria en los últimos 3 meses; b) enfermedad neoplásica; c) haber recibido tratamiento anticoagulante en el último año; d) angina, inestabilidad hemodinámica o deterioro de la clase funcional en los 3 meses previos al estudio; e) infarto de miocardio o revascularización coronaria en el año previo al estudio; f) fibrilación auricular permanente o paroxística, y g) valvulopatía de gravedad superior a ligera. Se registró la presencia de factores de riesgo cardiovascular en todos los pacientes. Como grupo control se utilizó a 23 voluntarios sanos de edad y sexo similares, trabajadores del hospital, sin antecedentes cardiovasculares previos pero que presentaban factores de riesgo cardiovascular clásicos en una frecuencia similar a los pacientes.

Métodos

Se realizó una extracción sanguínea a primera hora de la mañana, tras ayuno de al menos 12 h y reposo de 20 min. La extracción se realizó de forma no traumática por personal entrenado que empleó jeringas precargadas con citrato trisódico (0,011 mol/l de concentra-

ción final). El plasma, pobre en plaquetas, fue obtenido mediante centrifugación a 4 °C y 2.200 g, durante 20 min y almacenado a -20 °C para su posterior procesamiento.

Se determinó la concentración de ANV plasmática mediante técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Annexin V, Diagnostica STAGO, Francia). Se estudió la presencia de AAF, anti- β 2 glucoproteína I, complejos anti- β 2 glucoproteína I/fosfolípidos y anticuerpos anti-ANV, usando técnicas ELISA (Anti-phospholipid, anti- β 2 glycoprotein I, anti- β 2 glycoprotein I/phospholipid complexes and anti-annexin V antibodies, Diagnostica STAGO, Francia). Se determinó la presencia de anticoagulante lúpico mediante la técnica de neutralización de plaquetas (Staclo PNP, Diagnostica STAGO, Francia).

Se estudió, además, la concentración del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y su inhibidor (PAI-1) antigénicos, mediante técnica ELISA (Asserachrom kit, Boehringer-Mannheim, Alemania). Se determinó la concentración plasmática de factor von Willebrand mediante técnica inmunológica automatizada en coagulómetro STA4 (LIA-VW test, Boehringer-Mannheim, Alemania). Se analizó el valor plasmático de fibrinógeno, según el método von Claus (Boehringer-Mannheim, Alemania). Se determinaron los valores de colesterol total, cHDL y triglicéridos mediante pruebas enzimáticas. Los valores de cLDL se estimaron mediante la fórmula de Friedewald.

Análisis estadístico

Se estudió si las variables analizadas seguían una distribución normal mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La concentración de ANV no siguió una distribución normal, de ahí que sus valores se expresen mediante la mediana y entre paréntesis los percentiles 25 y 75. Las variables discretas se expresan mediante porcentajes. Para el estudio de asociación entre una variable continua y una discreta se utilizó la prueba de la U de Mann-Whitney. La correlación entre dos variables cuantitativas se estudió mediante la prueba de Spearman. Para el estudio de asociación entre dos variables discretas se utilizó la prueba de la χ^2 . Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Las características de los pacientes y controles se expresan en la tabla 1.

El grupo de pacientes que habían sufrido un infarto prematuro presentó valores inferiores de ANV respecto al grupo control, 0,640 ng/ml (0,520-0,818) frente a 1,570 ng/ml (1,140-2,390), $p < 0,01$ (fig. 1). Sólo detectamos a 2 pacientes con positividad IgG para los complejos anti- β 2 glucoproteína I/fosfolípidos y otros dos con positividad IgG para anticuerpos anti-ANV.

TABLA 1. Resumen de los datos demográficos y clínicos de los pacientes y controles

	Pacientes (n = 62)	Controles (n = 23)	p
Datos demográficos			
Edad (años)	47,7 $\pm$ 5,9	44,5 $\pm$ 6,1	NS
Sexo (varones/mujeres)	60/2	21/2	NS
Datos clínicos			
Diabetes	9	4	NS
Hipertensión	17	7	NS
Tabaquismo	13	8	0,19
Dislipemia	35	10	NS

NS: estadísticamente no significativo, $p > 0,20$.

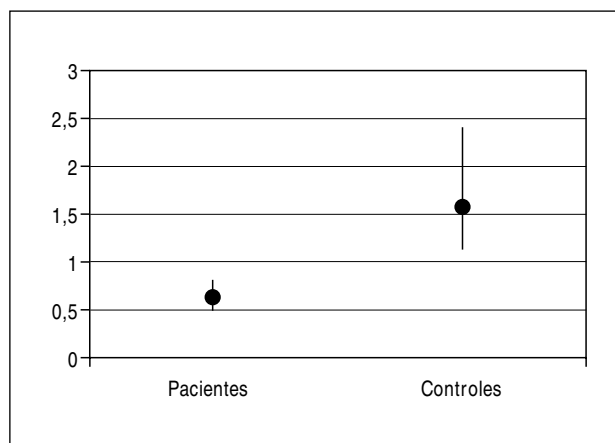


Fig. 1. Valores de anexina V plasmática en pacientes que han sufrido un infarto prematuro y en controles, 0,640 ng/ml (0,520-0,818) frente a 1,570 ng/ml (1,140-2,390); $p < 0,01$. Se expresa como mediana (percentiles 25-75).

No se detectó a pacientes positivos para AAF o para anticuerpos anti- β 2 glucoproteína I. En el grupo control sólo un paciente presentó positividad para AAF y anticuerpos anti- β 2 glucoproteína I. Ninguno de los pacientes o los controles presentó positividad para el test del anticoagulante lúpico. Los 2 pacientes con positividad para los anticuerpos anti-ANV presentaron unos valores plasmáticos de ANV de 0,55 y 0,64 ng/ml, similares a la mediana encontrada en el grupo valorado globalmente.

Los datos analíticos de los pacientes se resumen en la tabla 2. Se observó una correlación estadísticamente significativa, aunque débil, entre la edad de los pacientes y el valor de la ANV ($r = 0,27$; $p < 0,05$). No se encontró ninguna asociación entre la ANV y la presencia de los diferentes factores de riesgo cardiovascular analizados (tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia). No se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los valores de ANV y el perfil lipídico. Los valores de ANV plasmáticos no se correlacionaron de forma significativa con la concentración de t-PA ni PAI-1 antigénicos. Tampoco

TABLA 2. Resumen de los datos analíticos de pacientes con infarto de miocardio prematuro

Parámetro	
Anexina V (ng/ml)	0,640 (0,520-0,818)
t-PA antigénico (ng/ml)	14,6 (11,7-16,2)
PAI-1 antigénico (ng/ml)	66,5 (33,9-94,2)
Fibrinógeno (mg/dl)	315,1 ± 98,5
Factor von Willebrand (%)	109,6 ± 32,6
Colesterol total (mg/dl)	227,9 ± 75,3
cHDL (mg/dl)	45,2 ± 11,8
cLDL (mg/dl)	149,3 ± 65,4
Triglicéridos (mg/dl)	142 (108-194)

Los valores se expresan como media ± desviación estándar, exceptuando los valores de anexina V, t-PA, PAI-1 y triglicéridos que, al no seguir una distribución normal, se expresan como mediana y entre paréntesis los percentiles 25 y 75. t-PA: activador tisular del plasminógeno; PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad.

co se encontró una correlación con los valores del factor von Willebrand ni con el fibrinógeno.

DISCUSIÓN

Apenas existen series que estudien los valores de ANV en el IM, pero se han descrito concentraciones elevadas en la fase aguda del infarto, las cuales parecen normalizarse a las pocas horas¹³. En el presente estudio hemos encontrado concentraciones disminuidas de ANV en aquellos pacientes que han padecido un IM prematuro, pasado el acontecimiento agudo, lo que podría condicionar un estado hipercoagulable. La ANV es una potente molécula antitrombótica ya que, gracias a su alta afinidad por fosfolípidos cargados negativamente, es capaz de inhibir los complejos protrombina-sa y X-asa y reducir la adhesión y agregación plaquetarias⁷.

La ANV posee una alta afinidad por las células apoptóticas, gracias a que éstas exponen gran cantidad de fosfolípidos, sobre todo fosfatidilserina⁶, como han demostrado diversos estudios, tanto *in vitro*¹⁴ como *in vivo*¹⁵. Además de servir como elemento de reconocimiento para que las células fagocitarias eliminen las células apoptóticas, la fosfatidilserina desempeña un papel fundamental en las fases iniciales de la coagulación, ya que incrementa la actividad del complejo factor tisular/factor VIIa¹⁶. Se ha demostrado un aumento de expresión de factor tisular en las placas ateroscleróticas humanas, que ejercen un papel importante en la trombogenicidad de la placa¹⁷. La fosfatidilserina propiciada por las células musculares lisas apoptóticas presentes en la placa aterosclerótica¹⁸ puede regular la actividad del factor tisular; por tanto, al unirse la ANV a ella podría reducir la trombogenicidad de la placa¹⁹. Este hecho sugiere que la unión de ANV a células apoptóticas a través de la fosfatidilserina podría ser una de las causas de la baja

concentración de ANV encontrada en nuestros pacientes. En contra de esta teoría está el hecho de que se hayan descrito valores «normales» de ANV en un grupo de pacientes con antecedentes de IM no seleccionados por su edad joven¹³.

Se ha propuesto que los AAF podrían causar fenómenos trombóticos mediante el desplazamiento de la ANV de las superficies celulares procoagulantes⁹. Nuevos datos experimentales apoyan la falta de asociación de la ANV con el síndrome antifosfolípido. Así, se ha comprobado que la alta afinidad de la ANV para unirse a la superficie de las membranas no se ve afectada por la presencia de los anticuerpos anti-β₂ glucoproteína I²⁰. Se ha encontrado que la actividad protrombinasa no se encuentra afectada cuando los AAF y la ANV están presentes; más aún, incluso se ha demostrado que la ANV es capaz de desplazar a los AAF²¹. Por tanto, el papel potencial de los títulos bajos de ANV encontrados en nuestros pacientes no parece estar relacionado con la presencia de AAF. Además, en nuestra serie hemos encontrado una muy baja prevalencia de AAF u otros anticuerpos relacionados. Los AAF no se presentan de forma constante en el tiempo en el plasma de los pacientes²², e incluso se ha llegado a plantear si su detección podría ser más un epifenómeno que un factor de riesgo independiente en aquellos pacientes con recurrencia de fenómenos trombóticos. Así, en un estudio de cohortes, tras un análisis multivariante ajustado para los factores de riesgo cardiovascular clásicos, la presencia de AAF no fue un factor de riesgo independiente para mortalidad, nuevo infarto o ictus no hemorrágico²³.

Nuestro grupo ha demostrado recientemente¹² cómo el polimorfismo -1c > T en la región Kozak, frecuente en población mediterránea, condiciona una mayor eficacia en la traducción, incrementando en casi 6 veces la capacidad de síntesis de la proteína. El estudio del genotipo en 166 pacientes que habían sufrido un infarto prematuro reveló que el porcentaje de pacientes con el alelo mutado era significativamente inferior a la población general estudiada. El análisis multivariante, tras el ajuste con el sexo, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipemia, demostró que este polimorfismo ejerce un efecto protector independiente para el desarrollo de un infarto de miocardio prematuro. Estos hallazgos han sido confirmados en pacientes con enfermedad cerebrovascular²⁴.

La falta de asociación con los factores de riesgo cardiovascular clásicos, así como la ausencia de correlación estadísticamente significativa con los otros marcadores estudiados²⁻⁴, sugiere la importancia de una base genética sobre la concentración de ANV plasmática.

Presentamos el primer estudio que analiza la concentración de ANV en pacientes jóvenes que han sufrido un infarto. Nuestros datos sugieren que los valores bajos de ANV plasmática, en estos pacientes con IM prematuro, podría expresar la existencia de un estado

hipercoagulable, el cual no parece estar relacionado con el síndrome antifosfolípido.

No se puede descartar la existencia de un sesgo de selección en el presente estudio, ya que sólo se han analizado pacientes supervivientes de un infarto. Se precisaría de series más amplias que confirmaran la relación sugerida entre genotipo y fenotipo y profundizaran en el papel fisiopatológico de esta potente molécula antitrombótica.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a José Llorca su valiosa ayuda en el procesamiento técnico de las muestras, así como a Sara Molina, Carmen Giménez y María Dolores Pérez su colaboración en la extracción de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, NG G. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). *J Am Coll Cardiol* 1995;26:654-61.
2. Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, Van de Loo JCW. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
3. Jansson JH, Nilsson TK, Jonson O. Von Willebrand factor, tissue plasminogen activator, and dehydroepiandrosterone sulphate predict cardiovascular death in a 10 year follow up of survivors of acute myocardial infarction. *Heart* 1998;80:334-7.
4. Fernández P, Marco P, Marín F, Roldán V, Sogorb F. The role of tissue plasminogen activator on the progression of the coronary disease. *Eur Heart J* 2002;23:88.
5. Rand JH, Wu X, Andree HAM, Ross JBA, Rusinova E, Gascon-Lema MG, et al. Antiphospholipid antibodies accelerate plasma coagulation by inhibiting annexin-V binding to phospholipids: a «lupus procoagulant» phenomenon. *Blood* 1998;5:1652-60.
6. Reutelingsperger CPM. Annexins: key regulators of haemostasis, thrombosis and apoptosis. *Thromb Haemost* 2001;86:413-9.
7. Van Heerde WL, De Groot PG, Reutelingsperger CPM. The complexity of the phospholipid binding protein annexin V. *Thromb Haemost* 1995;73:172-9.
8. Rand JH. «Annexinopathies» a new class of diseases. *N Engl J Med* 1999;340:1035-6.
9. Rand JH, Wu X. Antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a new mechanism for thrombosis in the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1999;82:649-55.
10. Hughes GRV. The antiphospholipid syndrome: ten years on. *Lancet* 1993;342:341-4.
11. Asherson RA, Cervera R. Antiphospholipid antibodies and the Heart. Lessons and pitfalls for the cardiologist. *Circulation* 1991;84:920-3.
12. 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.
13. Kaneko N, Matsuda R, Hosoda S, Kajita T, Ohta Y. Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 1996;251:65-80.
14. Marguet D, Luciani MF, Moynault A, Williamson P, Chimini G. Engulfment of apoptotic cells involves the redistribution of membrane phosphatidyl serine on phagocyte and prey. *Nat Cell Biol* 1999;1:454-6.
15. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* 2000;2:399-406.
16. Bach R, Rifkin DB. Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1990;87:6995-9.
17. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997;95:594-9.
18. Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennet MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 1997;89:4378-84.
19. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential of human atherosclerotic plaques. A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-53.
20. Willems GM, Janssen MP, Comfurius P, Galli M, Zwaal RF, Bevers EM. Competition of annexin V and cardiolipin antibodies for binding to phosphatidylserine containing membranes. *Biochemistry* 2000;39:1982-9.
21. Bevers EM, Janssen MP, Willems GM, Zwaal RFA. No evidence for enhanced thrombin formation through displacement of annexin V by antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 2000;83:792-4.
22. Hamsten A, Norberg R, Björkholm M, De Faire U, Holm G. Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction with recurrent cardiovascular events. *Lancet* 1986;1:113-6.
23. Sletnes KE, Smith P, Abdel Noor M, Arnesen H, Wisloff F. Antiphospholipids antibodies after myocardial infarction and their relation to mortality, reinfarction and non-haemorrhagic stroke. *Lancet* 1992;339:451-3.
24. Llamas P, Meseguer E, Fernández de Velasco M, Rábano J, Campos ML, Oña R, et al. Enfermedad vascular cerebral y polimorfismo C/T -1 en la secuencia Kozak del gen de la anexina V. *Haematologica* 2001;86(Suppl 2):172.