

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS, FIBRINOLÍTICAS
E HIPERCOAGULABILIDAD EN LA OBESIDAD : EFECTO
DE LA PÉRDIDA PONDERAL

EVA SOLÁ IZQUIERDO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de Juliol de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Vicente Alberola Candel
- D. Antonino Jara Albarrán
- D. Joan Lluís Vives Corrons
- D. Eduardo Rocha Hernando
- D^a. Dolores Corella Piquer

Va ser dirigida per:

D. Antonio Hernández Mijares

D^a. Amparo Vayá Montaña

©Copyright: Servei de Publicacions
Eva Solá Izquierdo

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6934-0

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



**ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS,
FIBRINOLÍTICAS E
HIPERCOAGULABILIDAD EN LA OBESIDAD:
EFECTO DE LA PÉRDIDA PONDERAL**

TESIS DOCTORAL

Eva Solá Izquierdo

Valencia, 2007

Dña. **Amparo Vayá Montaña**, Doctora en Medicina y Cirugía y Jefe de Sección de la Unidad de Trombosis y Hemostasia del Departamento de Biopatología Clínica del Hospital Universitario La Fe, y D. **Antonio Hernández Mijares**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de la Universidad de Valencia y Jefe de Sección de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset:

CERTIFICAN:

Que Dña. **Eva Solá Izquierdo**, Licenciada en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra Dirección la presente Tesis Doctoral, titulada: **“Alteraciones hemorreológicas, fibrinolíticas e hipercoagulabilidad en la obesidad: efecto de la pérdida ponderal”**, y mediante este escrito se autoriza su presentación para optar al grado de Doctora en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expedimos y firmamos la presente certificación en Valencia, a 20 de Febrero de 2.007.

Amparo Vayá Montaña

Antonio Hernández Mijares

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

En este duro y largo trabajo han colaborado muchos amigos, sin los cuales hubiera sido imposible acabar. A todos ellos, los que nombro y los que olvido, les agradezco mucho su ayuda.

A Carlos Morillas, por haberme enseñado todo lo que sé acerca del tratamiento y atención al paciente obeso. A mis demás compañeros de la Sección de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset, por remitirme a los pacientes, ayudarme en su seguimiento durante mi baja maternal, y aguantarme en los malos momentos.

A todos los amigos y compañeros que han participado como controles, por dejar que les “sacara la sangre” y les hiciera medidas anatómicas indiscretas.

A todo el equipo del Laboratorio de Hormonas, en especial a M^a Jesús Oliver, por su colaboración. A Marisa Martínez Triguero, Antonio López y María del Monte Jarabo, que tuvieron la paciencia de enseñarme el mundo de las pipetas y los reactivos...

Al personal del Centro de Investigación, en especial a Francisco España y a Amparo Estellés, que me dedicaron muchas horas de su tiempo y mucha paciencia. La ayuda de Paco fue decisiva en un momento crucial. A Marcial Martínez, Edelmiro Reganón y Piedad Villa, que me introdujeron en unas técnicas desconocidas para mí. A las enfermeras Isabel Soria, Amparo Romero y M^a José Sentí, a las que no se pudo resistir ninguna vena... A Dolores Corella, por su disponibilidad y su ayuda, insustituible por su forma única de explicar ese duro campo que es la Estadística. Al Dr. Justo Aznar, por habernos permitido realizar este trabajo en su Servicio.

A mis dos Directores, por la tenacidad que tienen en común. A Antonio Hernández, por introducirme en el mundo de la investigación y empujarme en todo momento a continuar. Por dedicar su tiempo a ayudarme en este proyecto. A Amparo Vayá, por sus mañanas, sus tardes, sus noches, sus fines de semana, sus vacaciones de verano, sus Navidades... Por todo el tiempo que ha dedicado a estar enseñándome y ayudándome. Por aguantar mi mal genio. Sin su incombustible insistencia, hubiera abandonado mil veces.

A mis amigos, que han comprendido y perdonado mis ausencias.

A mis padres y mis suegros, que me ayudaron a sacar más horas al día, me sustituyeron como madre y aguantaron mi mal humor y mi cansancio. A Ana, sin su ayuda, no hubiera podido acabar.

A Jose María, que me ha animado en los momentos malos, encontrando, como siempre, soluciones.

A mi hijo, por darme alegría y paz, y, sobre todo, por esperarme.

I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. OBESIDAD.....	14
I.1.a. Concepto.....	14
I.1.b. Epidemiología	15
I.1.c. Clasificación	16
I.1.d. Etiopatogenia de la obesidad esencial.....	18
I.1.e. Complicaciones	20
I.1.f. Obesidad, resistencia insulínica y síndrome metabólico	22
I.1.f. La obesidad como enfermedad inflamatoria.....	28
I.1.g. Disfunción endotelial y estrés oxidativo en la obesidad	35
I.1.k. Tratamiento	36
I.2. MECANISMOS PROTROMBÓTICOS.....	41
I.2.a. Hemorreología.....	41
I.2.b. Hemostasia	55
I.3.c. Fibrinólisis.....	64
I.3.d. Asociación de la hemorreología, la hemostasia y la fibrinólisis con fenómenos trombóticos.....	71
I.3. LA OBESIDAD COMO ESTADO PROTROMBÓTICO	80
I.3.a. Obesidad y alteraciones hemorreológicas.....	81
I.3.b. Obesidad e hipercoagulabilidad	90
I.3.c. Obesidad e hipofibrinólisis.....	91
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	97
II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	98
II.2. OBJETIVOS	99

III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	102
III.2. SUJETOS DEL ESTUDIO.....	102
III.2.a. Grupo de casos.....	102
III.2.b. Grupo control.....	104
III.2.c. Criterios de inclusión.....	104
III.2.d. Criterios de exclusión.....	104
III.3. MÉTODOS.....	105
III.3.a. Parámetros de la exploración física.....	105
III.3.b. Extracción y procesamiento de las muestras.....	106
III.3.c. Técnicas de laboratorio.....	107
III.3.d. Recogida de datos clínicos y analíticos: fases del estudio.....	121
III.3.e. Análisis estadístico.....	122
IV. RESULTADOS	126
IV.1. ANTROPOMETRÍA, BIOQUÍMICA, HORMONAS Y MARCADORES DE INFLAMACIÓN.....	127
IV.1.a. Descripción de los grupos clínicos.....	127
IV.1.b. Comparación entre casos y controles.....	129
IV.1.c. Efecto de la pérdida de peso.....	131
IV.2. HEMORREOLOGIA.....	134
IV.2.a. Comparación entre casos y controles.....	134
IV.2.b. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico.....	141
IV.2.c. Efecto de la pérdida de peso.....	144
IV.3. HEMOSTASIA.....	150
IV.3.a. Resistencia a la proteína C activada.....	150
IV.3.b. Niveles de proteína C activada.....	153

IV.4. FIBRINOLISIS	158
IV.4.a. Comparación entre casos y controles	158
IV.4.b. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico	163
IV.4.c. Efecto de la pérdida de peso	164
V. DISCUSIÓN.....	169
V.1. ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD.....	170
V.1.a. Fibrinógeno	170
V.1.b. Viscosidad plasmática	172
V.1.c. Deformabilidad eritrocitaria	174
V.1.d. Agregación eritrocitaria	177
V.1.e. Composición de la membrana del hematíe	180
V.1.f. Viscosidad sanguínea	186
V.2. ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD.....	188
V.2.a. Resistencia a la proteína C activada	188
V.2.b. Niveles de proteína C activada	190
V.3. ALTERACIONES DE LA FIBRINOLISIS EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD.....	193
V.3.a. Comparación de los niveles de PAI-1 entre casos y controles	193
V.3.b. Comparación del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 entre casos y controles.....	195
V.3.c. Asociación del PAI-1 en la obesidad con la resistencia insulínica	197
V.3.d. Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de PAI-1 en la obesidad.....	198

VI. CONCLUSIONES 201

VII. BIBLIOGRAFÍA..... 205

ABREVIATURAS

α 1AT:	α -1 antitripsina
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AE:	agregación eritrocitaria
AE ₀ :	agregación eritrocitaria en estasis (agregómetro Myrenne)
AE ₁ :	agregación eritrocitaria a 3 s ⁻¹ (agregómetro Myrenne)
ApoA:	apolipoproteína A
ApoB:	apolipoproteína B
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
C4b-BP:	proteína de unión al componente 4b del complemento
CH II:	cofactor de la heparina II
CHCM:	concentración de hemoglobina corpuscular media
CT:	colesterol total
γ D:	umbral de desagregación (agregómetro Sefam)
EPCR:	receptor endotelial de la proteína C
F Va:	factor V activado
F VIIa:	factor VII activado
F VIIIa:	factor VIII activado
Fbg:	fibrinógeno
FS:	fosfatidilserina
FT:	factor tisular
GBA:	glucemia basal alterada
HCM:	hemoglobina corpuscular media
HDL:	lipoproteínas de alto peso molecular
HOMA:	índice " <i>Homeostasis Model Assessment</i> "
Htc:	hematocrito
IA10:	agregación a los 10 segundos (agregómetro Sefam)
icc:	índice cintura cadera
IE12:	índice de elongación determinado a 12 Pascales
IE30:	índice de elongación determinado a 30 Pascales
IE60:	índice de elongación determinado a 60 Pascales

Ig:	inmunoglobulina
ITG:	intolerancia a la glucosa
IL-6:	interleuquina 6
IMC:	índice de masa corporal
LDL:	lipoproteínas de bajo peso molecular
PAI:	inhibidor del activador del plasminógeno
PAI-1ag:	inhibidor del activador del plasminógeno 1 antigénico
PAI-1fc:	inhibidor del activador del plasminógeno 1 funcional
PC:	proteína C
PCa:	proteína C activada
PCI:	inhibidor de la proteína C activada
PCR:	proteína C reactiva
PDFs:	productos de degradación de la fibrina
R-PCa:	resistencia a la proteína C activada
Rs-PCa:	“ <i>ratio</i> ” de sensibilidad a la proteína C activada
Rsn-PCa:	“ <i>ratio</i> ” de sensibilidad a la proteína C activada normalizado
RCP:	reacción en cadena de la polimerasa
RI:	resistencia insulínica
rpm:	revoluciones por minuto
SM:	síndrome metabólico
SRAA:	sistema renina-angiotensina-aldosterona
t-PA:	activador tisular del plasminógeno
Ta:	tiempo de agregación (agregómetro Sefam)
TAC:	tomografía axial computarizada
TFPI:	inhibidor de la vía del factor tisular 1
TG:	triglicéridos
TGF- β :	“ <i>transforming growth factor</i> ” β
TNF- α :	factor de necrosis tumoral α
TTPA:	tiempo de tromboplastina parcial activada
TVP:	trombosis venosa profunda
u-PA:	activador del plasminógeno tipo uroquinasa
VCM:	volumen corpuscular medio

VLCD: dieta de muy bajo contenido calórico
VLDL: lipoproteínas de muy bajo peso molecular
VP: viscosidad plasmática
VS: viscosidad sanguínea
VSc 230: viscosidad sanguínea a hematocrito corregido a 230 s^{-1}
VSn 230: viscosidad sanguínea a hematocrito nativo a 230 s^{-1}
vs: “*versus*”

I. INTRODUCCIÓN

I.1. OBESIDAD

I.1.a. Concepto

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un exceso de tejido adiposo que origina un aumento de peso corporal. En los hombres, se considera normal un porcentaje de grasa de hasta el 20% del peso corporal, y en mujeres de hasta el 30% (Tabla 1), definiéndose como obesos aquellos sujetos con porcentajes de grasa superiores al 25 y 33% del peso corporal, respectivamente (1).

Tabla 1: Definición de obesidad en función del porcentaje de grasa corporal

	Hombres	Mujeres
Normopeso	12-20%	20-30%
Límite	21-25%	31-33%
Obesidad	>25%	>33%

La medición de grasa corporal puede realizarse mediante tecnología precisa pero, al no encontrarse la misma al alcance de la práctica clínica habitual, se recomiendan estimaciones a partir de determinados datos antropométricos (2; 3). De entre estos datos antropométricos, el índice de masa corporal (IMC) es el más utilizado clínicamente para valorar la presencia de obesidad en adultos (2). Este índice es el cociente entre el peso del individuo, expresado en kilogramos, y su altura, expresada en metros y elevada al cuadrado. Se considera que un determinado paciente padece obesidad si el IMC es superior o igual a 30 kg/m².

I.1.b. Epidemiología

La prevalencia de obesidad varía según el país estudiado. Actualmente, es en Estados Unidos donde dicha prevalencia es mayor, estimándose en el periodo 1.999-2.000 que el 34% de la población estadounidense padecía sobrepeso, el 30,5% obesidad, y el 4,7% obesidad mórbida o extrema (4). Estos porcentajes son el resultado de una tendencia progresiva al aumento en la frecuencia de las tres entidades, dado que en el periodo 1.988-1.994 la prevalencia era de 33%, 22,9% y 2,9%, respectivamente.

En España, según datos del estudio SEEDO'97 (5), un metaanálisis de cuatro estudios independientes llevados a cabo en Cataluña, Madrid, País Vasco y Comunidad Valenciana entre 1.989 y 1.994, la prevalencia de obesidad en sujetos de entre 25 y 60 años en ese periodo era de 13,4% (11,5% de los hombres y 15,2% de las mujeres). El estudio SEEDO'00 (5) recoge datos de estudios llevados a cabo entre los años 1.990 y 2.000 en las mismas comunidades, junto con Galicia, Canarias, Andalucía y Baleares, siendo en este periodo la prevalencia de obesidad de 14,5% (13,4% de los hombres y 15,7% de las mujeres). La comparación de estos dos estudios muestra el progresivo aumento de la prevalencia de obesidad en la población española (ver Tabla 2).

Tabla 2: Evolución de la prevalencia de obesidad en España: estudios SEEDO'97 y SEEDO'00

	SEEDO'97 (5)			SEEDO'00 (6)		
	Hombres	Mujeres	Global	Hombres	Mujeres	Global
Sobrepeso	47,4%	31,6%	39,6%	45%	32%	39%
Obesidad	11,5%	15,2%	13,4%	13,4%	15,7%	14,5%
Obesidad mórbida	0,4%	0,7%	0,5%	0,3%	0,7%	0,5%

I.1.c. Clasificación

La obesidad se puede clasificar mediante diferentes criterios: en función del IMC, en función de la distribución de la grasa corporal, y en función de la etiología.

I.1.c.1) Clasificación en función del índice de masa corporal

Existen diversas clasificaciones de la obesidad según el IMC. En España se utiliza la clasificación de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) del año 2.000, que se muestra en la Tabla 3 (2).

Tabla 3: Clasificación del sobrepeso y la obesidad según el IMC

	IMC (kg/m ²)
Peso insuficiente	< 18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25-26,9
Sobrepeso grado II (pre-obesidad)	27-29,9
Obesidad grado I	30-34,9
Obesidad grado II	35-39,9
Obesidad grado III (mórbida)	40-49,9
Obesidad grado IV (extrema)	≥ 50

IMC: índice de masa corporal

I.1.c.2) Clasificación en función de la distribución de la grasa corporal

Un criterio clínicamente relevante para clasificar la obesidad es el patrón de distribución de la grasa corporal. La grasa se acumula de forma predominante en la mitad superior del cuerpo en la denominada obesidad androide, central o abdominal, y en la mitad inferior en la obesidad ginoide o periférica. En la obesidad central, más frecuente en hombres, la grasa se deposita preferentemente en cara, cuello, tronco, región supraumbilical, y a

nivel intraabdominal (grasa visceral). En la obesidad periférica, más frecuente en mujeres, la grasa se acumula en región infraumbilical, caderas, glúteos y muslos. La diferenciación entre ambos tipos tiene gran importancia clínica, puesto que la obesidad central es la que más se relaciona con complicaciones metabólicas, y por tanto es la que presenta mayor riesgo cardiovascular (6).

Para clasificar la distribución de la grasa, se utilizan distintos parámetros (Tabla 4). Hasta hace pocos años, el parámetro más utilizado era el cociente entre la circunferencia de la cintura y la circunferencia de la cadera (índice cintura-cadera: icc). Sin embargo, se ha demostrado que el parámetro clínico que mejor se correlaciona con la cantidad de tejido adiposo visceral medida por técnicas de imagen como resonancia magnética o tomografía axial computarizada (TAC), es la circunferencia de la cintura (8).

Tabla 4: Clasificación de la obesidad en función de la distribución de la grasa y valores de riesgo de los datos antropométricos (2)

Criterio	Hombres	Mujeres
icc	>1: obesidad central	>0,90: obesidad central
	<1: obesidad periférica	<0,90: obesidad periférica
Perímetro de cintura: valores de riesgo	>96 cm	>82 cm
Perímetro de cintura: valores de riesgo elevado	>102 cm	>90 cm

I.1.c.3) Clasificación en función de la etiopatogenia

La obesidad se puede clasificar en función de su etiología, siendo la obesidad esencial la responsable del 90% de los casos.

- Obesidad esencial: se analiza en el apartado siguiente.

- **Obesidad secundaria:** se debe a otra patología de base, que puede ser endocrinológica (hipotiroidismo, hiperfunción glucocorticoidea, alteraciones hipotalámicas) o genética (síndrome de Prader-Willi, síndrome de Lawrence-Moon-Bield...). También puede ser debida al consumo de determinados fármacos (glucocorticoides, antidepresivos tricíclicos, etc...).

I.1.d. Etiopatogenia de la obesidad esencial

La obesidad esencial es el resultado de un desbalance entre la ingesta calórica y el gasto energético, a favor de la primera (9). Múltiples factores y mecanismos de retroalimentación influyen en la regulación del balance energético, con el objetivo de mantener estables los depósitos de energía. Señales hormonales y neuronales informan al hipotálamo del estado de las reservas grasas, que a su vez condiciona cambios en la respuesta alimentaria y en el gasto energético para restablecer el balance (10). Entre estas señales, en los últimos años se ha concedido especial importancia a la leptina. Se trata de una hormona proteica producida fundamentalmente en el tejido adiposo, y cuyas concentraciones son proporcionales a las reservas grasas del organismo. Actúa fundamentalmente a nivel hipotalámico, regulando la ingesta y el gasto energético, y por tanto el porcentaje de grasa corporal (11). De forma esquemática, en situaciones de balance energético negativo, el descenso de los niveles plasmáticos de leptina provoca una respuesta hipotalámica consistente en un aumento de la ingesta y una disminución del gasto energético (12). Por el contrario, en situaciones de balance energético positivo, el aumento de la concentración plasmática de leptina conduce a una respuesta hipotalámica de disminución de la ingesta y aumento del gasto energético (Figura 1). Sin embargo, en la gran mayoría de sujetos obesos se encuentran niveles elevados de leptina (13), que no ejercen ninguna acción sobre la ingesta o el gasto calórico. Parece existir, pues, una situación de resistencia a la leptina, similar a la resistencia insulínica (RI) de la diabetes mellitus tipo 2.

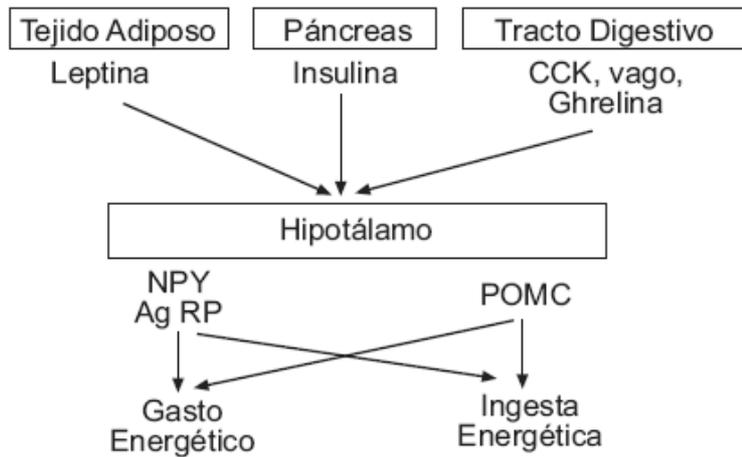


Figura 1: Mecanismos implicados en la regulación del balance energético. CCK: colecistoquinina. NPY: neuropéptido Y. AgRP: proteína relacionada con el Agouti. POMC: proopiomelanocortina

Una alteración en cualquier punto de la regulación del balance energético puede llevar a la obesidad. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos, la alteración es multifactorial y aparece como resultado de la interacción entre la carga genética del individuo y determinados factores ambientales. Sólo en algunos casos aislados de obesidad se ha demostrado una deficiencia de leptina, debida a una alteración del gen que la codifica (14), o del gen que codifica su receptor (15), estando dichas alteraciones englobadas dentro de las obesidades de causa genética. Excluidos estos casos, los factores genéticos explican hasta un 40% de la variabilidad del IMC (16), pero parece claro que el gran aumento de la prevalencia de obesidad en los últimos años se debe a factores ambientales relacionados con el estilo de vida, concretamente al aumento de la ingesta calórica y a la reducción de la actividad física (9). Probablemente, estos factores ambientales hayan resultado especialmente perjudiciales para individuos genéticamente predispuestos a desarrollar obesidad.

I.1.e. Complicaciones

La obesidad se asocia a un incremento importante de la morbimortalidad, que es más elevada cuanto mayor es el IMC. Estudios epidemiológicos han demostrado que el riesgo relativo de muerte por cualquier causa aumenta de forma proporcional al IMC (17), y que, cuando éste supera los 40 kg/m², puede ser 2,5 veces superior al de los individuos con normopeso. Una gran multitud de patologías se asocian a la obesidad. Las complicaciones metabólicas aparecen fundamentalmente en la obesidad abdominal (18), mientras que las complicaciones mecánicas se asocian a ambos tipos de obesidad.

- *Diabetes mellitus tipo 2*: El riesgo de padecer esta enfermedad aumenta en relación con el grado de obesidad y con la distribución del tejido graso, siendo mayor en la obesidad central (19; 20). Los datos del estudio NHANES III muestran que la prevalencia de diabetes aumenta de forma paralela al IMC, llegando a ser de 13% en pacientes con IMC superior a 35 kg/m² (21).
- *Dislipemia aterógena*: La obesidad, especialmente la abdominal, se asocia con un aumento de triglicéridos (TG) (22), una disminución del colesterol HDL (23), y un aumento del colesterol VLDL y de las partículas LDL pequeñas y densas (24). Muchos autores han propuesto que existe asimismo en la obesidad un aumento del colesterol total (CT) y del colesterol LDL (23; 25), aunque otros estudios no han confirmado esta asociación (26).
- *Hipertensión arterial*: El riesgo de hipertensión arterial es mayor conforme aumenta el IMC y en la obesidad abdominal. El estudio Framingham cuantificó hace décadas en 6,5 mmHg el aumento de presión arterial por cada aumento de peso del 10% (27). Otros estudios posteriores han mostrado que la prevalencia de hipertensión arterial es tres veces superior en sujetos obesos que en sujetos con normopeso (28).

- *Hiperuricemia*: Se asocia fundamentalmente a la obesidad abdominal (29).
- *Enfermedades hepatodigestivas*: La obesidad se asocia a litiasis biliar (30) y a esteatohepatitis no alcohólica (31), que puede llevar a cirrosis hepática en el 10% de los casos (32).
- *Alteraciones respiratorias*: Las alteraciones respiratorias asociadas con la obesidad son el síndrome de apneas-hipopneas del sueño (33), y el síndrome de obesidad-hipoventilación o síndrome de Pickwick (34).
- *Artrosis*: Las articulaciones más afectadas son la coxo-femoral y la fémoro-tibial (35).
- *Neoplasias*: Los pacientes con obesidad presentan un riesgo más elevado de padecer las siguientes neoplasias: próstata, recto, colon, mama, endometrio y vesícula biliar (36).
- *Alteraciones psicosociales*: Los pacientes obesos presentan una elevada frecuencia de trastornos depresivos (37), y una mayor dificultad para una integración sociolaboral plena (38).
- *Alteraciones endocrinológicas*: Es frecuente en mujeres obesas la existencia de hiperandrogenismo funcional ovárico (39). Asimismo, la obesidad se asocia a disminución de la secreción de GH, sin repercusiones clínicas dado que el efector hepático, IGF-I, está aumentado a consecuencia del hiperinsulinismo (40).
- *Otras*: Microalbuminuria (41), insuficiencia venosa periférica (42; 43), disfunción ventricular (44), y complicaciones obstétricas (45-47).

La Tabla 5 muestra el riesgo relativo de las principales complicaciones asociadas a la obesidad.

Tabla 5: Riesgo relativo atribuido a la obesidad en el desarrollo de sus principales complicaciones (modificado de Arrizabalaga 2003 et al) (3)

Riesgo relativo > 3	Riesgo relativo 2-3	Riesgo relativo 1-2
Diabetes mellitus tipo 2	Enfermedad coronaria	Neoplasias
Hipertensión arterial	Artrosis	
Dislipemia aterógena	Gota	
Colelitiasis		
Síndrome de apneas del sueño		

I.1.f. Obesidad, resistencia insulínica y síndrome metabólico

I.1.f.1) Introducción

Probablemente, el eje fisiopatológico que enlaza la obesidad con las patologías metabólicas asociadas a la misma sea la RI. La RI es la disminución de la acción biológica de la insulina sobre los tejidos insulín-dependientes: hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. La grasa visceral es más resistente a las acciones de la insulina que la grasa subcutánea, y más sensible a las hormonas lipolíticas (48). El aumento consecuente de la llegada de ácidos grasos libres al hígado a través del sistema porta es responsable de la dislipemia característica de la obesidad, aumentando el sustrato para la síntesis hepática de TG (49), y asimismo contribuye a la RI a nivel hepático, inhibiendo la captación y oxidación de glucosa y la síntesis de glucógeno, y aumentando la liberación hepática de glucosa (50).

El síndrome metabólico (SM) es la coexistencia de diferentes rasgos clínicos, probablemente consecuentes de la RI, en un determinado paciente, que habitualmente padece además obesidad abdominal (51). En la actualidad, existen varias definiciones de SM, algunas de las cuales exigen el diagnóstico bioquímico de RI, mientras que en otras no es un criterio necesario. No existe por el momento acuerdo en la comunidad científica internacional en los

criterios diagnósticos de SM, así como tampoco se ha demostrado que dicho diagnóstico se asocie a un mayor riesgo cardiovascular que la suma de los factores de riesgo que lo componen (52).

I.1.f.2) Diagnóstico de resistencia insulínica

Al igual que no se dispone de un diagnóstico universal de SM, tampoco existe en la actualidad una expresión numérica única clínicamente útil que defina la RI (53). Existen múltiples métodos de valoración de la misma, que se pueden clasificar, en función de la dificultad para su realización, en métodos para muestras reducidas y métodos para un gran número de muestras.

Los principales métodos para muestras reducidas son el “*clamp*” o pinzamiento euglucémico hiperinsulinémico (54), y la prueba de tolerancia intravenosa a la glucosa con análisis mediante modelo mínimo (55). Son los que mejor determinan la RI, pero son complejos, prolongados y caros, por lo que sólo se utilizan en estudios de investigación. Para analizar un gran número de muestras, se dispone de otros métodos, como la insulinemia basal (53; 56) y el método HOMA (“*Homeostasis Model Assessment*”) (57). La determinación de insulinemia basal es el método más sencillo, pero no es posible establecer una única cifra universal a partir de la cual un paciente se defina como resistente a la insulina. Por una parte, existe un solapamiento considerable entre los valores de insulinemia de sujetos sanos y de sujetos con RI. Otro problema es la falta de estandarización del método de laboratorio, con amplias diferencias entre las diversas técnicas, que se deben fundamentalmente a su capacidad de presentar reacciones cruzadas con proinsulina y péptidos proinsulinoides. Con estas limitaciones, se suele utilizar como punto de corte para diagnosticar RI el valor del cuartil superior de insulinemia obtenido en una población no diabética mediante un ensayo determinado, si se dispone de estos datos. Un estudio español ha establecido esta cifra en 16,7 $\mu\text{U/mL}$ (56).

El índice HOMA (57) es un marcador indirecto de RI que se obtiene a partir de la glucemia y la insulinemia basal, mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Índice HOMA} = (\text{insulinemia basal en } \mu\text{U/mL} \times \text{glucemia basal en mmol/L}) / 22,5$$

$$\text{Índice HOMA} = (\text{insulinemia basal en } \mu\text{U/mL} \times \text{glucemia basal en mg/dL} \times 0,05551) / 22,5$$

Los resultados dependen del método de laboratorio utilizado para la determinación de insulina. Por otra parte, el método HOMA presenta un coeficiente de variación intraindividual del 10 al 30% (57; 58). Aunque la imprecisión limita la utilidad práctica del cálculo de RI mediante HOMA en una muestra pequeña, su sencillez y las correlaciones significativas que se encuentran al comparar la RI obtenida por HOMA con la obtenida mediante “*clamp*” euglucémico hiperinsulinémico, respaldan su utilización (59). Los puntos de corte sugeridos para el diagnóstico de RI por HOMA en población española varían entre 3,03 (60) y 3,8 (56), según se utilice como punto de corte para diagnóstico de RI el percentil 75 o el percentil 90 de los valores de HOMA obtenidos en población sana.

I.1.e.3) Diagnóstico de síndrome metabólico

Los diferentes organismos internacionales han establecido distintos criterios para definir el SM.

Criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

La definición propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1.999 (61) exige para el diagnóstico de SM la presencia de intolerancia a la glucosa (ITG) o diabetes mellitus tipo 2 y/o RI (definida como el cuartil inferior de la medición de sensibilidad a la insulina en la población no diabética mediante “*clamp*” euglucémico hiperinsulinémico), junto con al menos dos de los siguientes criterios:

- Obesidad abdominal, definida por $\text{icc} > 0,90$ en hombres y $0,85$ en mujeres, y/o $\text{IMC} > 30 \text{ kg/m}^2$.
- Dislipemia, definida por $\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$, o $\text{HDL} < 35 \text{ mg/dL}$ en hombres y de 39 mg/dL en mujeres.
- Presión arterial $\geq 140/90 \text{ mmHg}$.
- Microalbuminuria (excreción de albúmina urinaria $\geq 20 \text{ } \mu\text{g/min}$ o cociente albúmina/creatinina $\geq 30 \text{ mg/g}$).

Criterios del Grupo Europeo para el Estudio de la Insulinresistencia

La definición del Grupo Europeo para el Estudio de la Insulinresistencia (EGIR) (62) se diseñó para utilizarse exclusivamente en población no diabética, y presenta la ventaja de valorar la RI en función de los niveles de insulina plasmática y no del “*clamp*”. Exige la presencia de hiperinsulinismo (cifras de insulinemia basal mayores al percentil 75 de la población no diabética), junto con dos o más de los siguientes criterios:

- Glucemia basal $\geq 110 \text{ mg/dL}$ (pero no en rango diabético).
- Obesidad abdominal, definida por una circunferencia de cintura $\geq 94 \text{ cm}$ en hombres y $\geq 80 \text{ cm}$ en mujeres.
- Dislipemia: $\text{TG} \geq 180 \text{ mg/dL}$, o $\text{HDL} < 40 \text{ mg/dL}$, o tratamiento para la dislipemia.
- Presión arterial $\geq 140/90 \text{ mmHg}$ o tratamiento antihipertensivo.

Criterios del National Cholesterol Education Program Expert Panel

Las guías del “*National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, Adult Treatment Panel III*” (NCEP ATP III) publicadas en 2.001 (63) simplifican los criterios, al obviar el problema diagnóstico de la RI. Sugieren la identificación clínica del SM en base a la presencia de tres o más de los siguientes criterios:

- Obesidad abdominal, definida por una circunferencia de cintura mayor de 102 cm en hombres y de 88 cm en mujeres.
- TG \geq 150 mg/dL.
- HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres.
- Presión arterial \geq 130/85 mmHg.
- Glucemia plasmática en ayunas \geq 110 mg/dL.

Criterios de la Federación Internacional de Diabetes

En un intento de unificar los diferentes criterios diagnósticos que dificultan, entre otras cosas, la comparación de prevalencias entre diferentes poblaciones, la “*International Diabetes Federation*” (IDF) en su Consenso del año 2.004 propuso una nueva definición, que fue expuesta en el Primer Congreso Internacional de Prediabetes y Síndrome Metabólico en mayo de 2.005 (64). Los criterios propuestos se asemejan bastante a los del NCEP ATP III, pero con un punto de corte de la circunferencia de cintura menor. Estos nuevos criterios exigen la presencia de obesidad abdominal, definida en población caucásica por una circunferencia de cintura mayor de 94 cm en hombres y de 80 cm en mujeres (con variaciones específicas para otras etnias), junto con dos o más de los siguientes criterios:

- TG \geq 150 mg/dL o tratamiento específico de este tipo de dislipemia.
- HDL < 40 mg/dL en hombres y 50 mg/dL en mujeres, o tratamiento específico de este tipo de dislipemia.
- Presión arterial sistólica \geq 130 mmHg o diastólica \geq 85 mmHg, o tratamiento antihipertensivo.
- Glucemia plasmática en ayunas \geq 100 mg/dL o diabetes mellitus tipo 2 previamente diagnosticada.

El Consenso detalla otros parámetros relacionados con el SM que, aunque no aparecen en su definición, se deberían incluir en estudios de investigación con el fin de determinar su valor predictivo para el diagnóstico de enfermedad cardiovascular y diabetes. Entre estos parámetros figura la RI,

valorada mediante insulina, índice HOMA, modelo mínimo, aumento de ácidos grasos libres, o “clamp” euglucémico hiperinsulinémico. También figuran entre estos parámetros la valoración del estado proinflamatorio, mediante proteína C reactiva (PCR), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y adiponectina, y la valoración del estado protrombótico, mediante inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y fibrinógeno (Fbg). La Tabla 6 ofrece una comparación de las cuatro definiciones de SM.

Tabla 6: Comparación de las cuatro definiciones propuestas para el diagnóstico de SM

	OMS (61)	EGIR (62)	NCEP ATP III (63)	IDF (64)
RI	Indispensable excepto DM/IHC, mediante “clamp”	Indispensable, mediante insulinemia basal	No precisa	No precisa
Criterios adicionales	2 o más	2 o más	3 o más	2 o más
Obesidad abdominal	icc > 0,85-0,90 o IMC \geq 30 kg/m ²	Cintura \geq 80-94 cm	Cintura > 88-102 cm	Cintura > 80-94 cm
Glucosa	DM o ITG	\geq 110 mg/dL, no DM	\geq 110 mg/dL	\geq 100 mg/dL
Lípidos	TG \geq 150 mg/dL o HDL < 35-40 mg/dL (único criterio)	TG \geq 180 mg/dL o HDL < 40 mg/dL (único criterio)	TG \geq 150 mg/dL HDL < 40-50 mg/dL (dos criterios)	TG \geq 150 mg/dL HDL < 40-50 mg/dL (dos criterios)
Tensión arterial	\geq 140/90 mmHg	\geq 140/90 mmHg	\geq 130/85 mmHg	\geq 130/85 mmHg
Otros	Microalbuminuria	No	No	No

DM: diabetes mellitus. ITG: intolerancia hidrocarbonada.

I.1.f. La obesidad como enfermedad inflamatoria

I.1.f.1) Introducción

El tejido adiposo se ha considerado durante muchos años como un depósito estático de grasa, pero en los últimos años esta visión ha cambiado, y en la actualidad se sabe que participa de forma activa en la homeostasis energética, considerándose como un órgano endocrino. Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular producidas por el sistema inmunológico cuando ocurre una agresión externa o durante la inflamación, que coordinan las distintas células del sistema inmune, y presentan acciones metabólicas. El término “adipocitoquinas” se ha acuñado para describir a los factores producidos por el tejido adiposo que modulan la función de otros tejidos, como IL-6, TNF- α , leptina, adiponectina, PAI-1, resistina y angiotensinógeno, entre otros (65). Por otra parte, en los últimos años, obesidad y SM se han asociado con marcadores de inflamación crónica de bajo grado (66; 67), sugiriéndose que la obesidad pueda ser una “enfermedad inflamatoria”. Este estado de inflamación probablemente sea consecuencia de la secreción de adipocitoquinas (65). El aumento de determinadas adipocitoquinas (IL-6, TNF- α , PAI-1) y de proteínas de fase aguda (PCR y Fbg) que acontece en la obesidad, se relaciona con la RI, la disfunción endotelial y la arteriosclerosis. Estudios más recientes sugieren que las adipocitoquinas no son segregadas por los adipocitos maduros, sino por células del estroma del tejido adiposo, fundamentalmente macrófagos, cuyo número se encuentra aumentado en la obesidad (68; 69).

Ciertos estímulos extravasculares inducen una activación crónica de bajo grado de la respuesta inflamatoria de fase aguda. Entre estos estímulos, se encuentran la obesidad, el tabaco, las infecciones mucosas (bronquitis, gastritis o periodontitis), y la edad. El resultado final es la activación de la cascada inflamatoria, que se asocia a RI y arteriosclerosis. Hay discrepancia en el momento actual acerca de si los parámetros inflamatorios son marcadores de la

RI y/o de la enfermedad cardiovascular, o mediadores de las mismas, es decir, si aumentan de forma secundaria a la arteriosclerosis concomitante, o si representan la causa directa de la misma (70). Independientemente del factor causal, la relación es bidireccional: cualquier proceso relacionado con la inflamación crónica disminuye la acción de la insulina, fundamentalmente por medio de la IL-6 y el TNF- α . En efecto, en condiciones normales, la insulina modula la cascada inflamatoria disminuyendo la transcripción de IL-6 y de TNF- α , y haciendo que finalice normalmente la reacción de fase aguda (70). Por tanto, la RI conllevaría una disminución de este efecto modulador, y un círculo vicioso con empeoramiento de la inflamación. De este modo, se prolongaría la respuesta inflamatoria, con efectos deletéreos para el organismo. De hecho, se sabe que la reducción de la inflamación es un mecanismo potencial para mejorar la sensibilidad a la insulina (71).

Un estudio prospectivo reciente mostró que los pacientes obesos con niveles más elevados de reactantes de fase aguda presentaban un número significativamente mayor de eventos cardiovasculares (72), por lo que la relación de la obesidad con los marcadores de inflamación puede contribuir al riesgo cardiovascular aumentado de estos pacientes. La Figura 2 ilustra la hipótesis de la relación entre obesidad, inflamación, RI y arteriosclerosis.

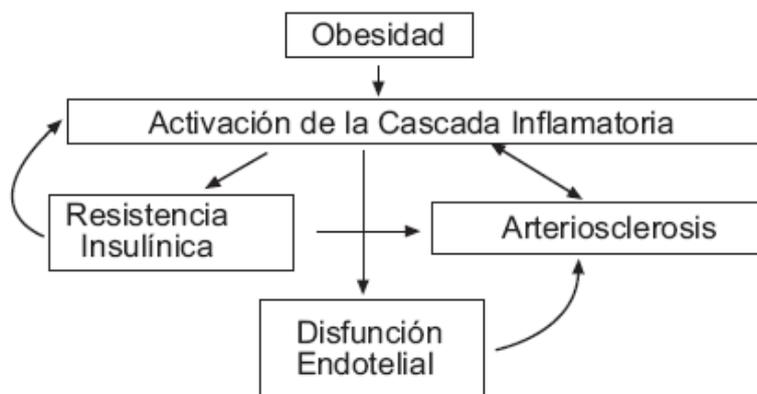


Figura 2: Relación obesidad-inflamación-resistencia insulínica-arteriosclerosis

I.1.f.2) Interleuquina 6

La IL-6 es una adipocitoquina implicada en el metabolismo lipídico y glucídico. Es producida por varios tipos celulares diferentes, incluyendo los leucocitos activados, las células endoteliales, los fibroblastos, y el tejido adiposo subcutáneo, donde se origina el 30% de la IL-6 plasmática (73). Otros estudios han demostrado que la producción de IL-6 es tres veces superior a nivel del tejido adiposo visceral que del subcutáneo (74).

Las citoquinas actúan principalmente de forma autocrina y paracrina, y los niveles circulantes de las mismas pueden no tener ninguna relación con su papel fisiopatológico. Una posible excepción a esta regla es la IL-6 (75), que circula en plasma en cantidades significativas, y actúa a distancia como una hormona, con una vida media inferior a las 6 horas (76). Entre sus efectos metabólicos, se encuentran la disminución de la actividad de la lipoproteinlipasa en el tejido adiposo (77) y la estimulación de la lipólisis (78), con aumento en la concentración de ácidos grasos libres. Induce RI, probablemente debido al aumento de los ácidos grasos libres, aunque otros trabajos apuntan hacia un efecto directo a nivel hepático (79). La IL-6 aumenta la síntesis hepática de proteínas de fase aguda como PCR y Fbg, siendo el principal regulador de la misma (80; 81).

La secreción de IL-6 por el tejido adiposo y sus niveles plasmáticos son proporcionales al IMC, a la masa grasa y a la RI (82). En los pacientes obesos, tanto la secreción de IL-6 por el tejido adiposo (73) como sus niveles plasmáticos (83) se encuentran aumentados. Por otra parte, se ha visto que los niveles plasmáticos de IL-6 son mayores en los pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo 2 asociada (84). Un estudio reciente ha demostrado que los niveles elevados de IL-6 se asocian a un aumento del riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2, aunque esta relación deja de ser significativa al ajustar por IMC (85).

I.1.f.3) Factor de necrosis tumoral α

El sistema TNF- α está formado por el propio TNF- α y los receptores TNFR1 y TNFR2. Las fracciones solubles circulantes de TNFR1 y TNFR2 son el resultado de la rotura de la porción extracelular del receptor que ocurre cuando se une TNF- α , y la determinación de las mismas es una forma de medir la acción de TNF- α (86).

El TNF- α activa la lipólisis (87) e inhibe la lipoproteinlipasa (88), aumentando la concentración de ácidos grasos libres y disminuyendo así la acción de la insulina. Reduce también la sensibilidad a la insulina interrumpiendo la señalización intracelular de su receptor (89), y probablemente disminuyendo la producción de adiponectina por el propio tejido adiposo (90). La adiponectina es otra adipocitoquina que actúa de forma autocrina y paracrina aumentando la sensibilidad a la insulina, y que se encuentra disminuida en la obesidad (91). En resumen, el TNF- α inhibe la acción de la insulina en el adipocito a través de un mecanismo autocrino y paracrino, pero se desconoce si representa una señal endocrina importante (65). Por otra parte, el TNF- α es un potente inductor de la síntesis de IL-6 (92), y participa en la regulación de la fibrinólisis, pues es un importante estímulo para la producción de PAI-1 en el tejido adiposo (93).

La secreción de TNF- α por el tejido adiposo subcutáneo abdominal obtenido mediante biopsia está aumentada en los pacientes con obesidad (94) y se correlaciona con la insulinemia (95). Otros autores han estudiado la producción de TNF- α por dicho tejido “*in vivo*”, midiendo la diferencia arterio-venosa de las concentraciones del mismo a este nivel, y concluyendo que el tejido adiposo no segrega TNF- α a sangre, sin poder descartar que actúe de forma paracrina o autocrina (73). De igual manera que se está observando con otras citoquinas, estudios recientes apuntan hacia una producción extraadipocitaria de TNF- α dentro del tejido adiposo (68).

Varios autores han determinado los niveles de TNF- α en circulación venosa periférica. Un estudio sólo detectó TNF- α en el 10,5% de los pacientes obesos, y en el 11,1% de los sujetos con normopeso, oscilando sus niveles entre 1,2 y 5,1 pg/mL, y siendo indetectables en el resto de los pacientes (95). Sin embargo, múltiples estudios posteriores han encontrado concentraciones detectables de TNF- α tanto en pacientes obesos como en sujetos con normopeso (73; 83; 96; 97). La mayoría de los autores han concluido que los pacientes con obesidad tienen niveles plasmáticos elevados de TNF- α (98-100), aunque no todos (101; 102). No se ha encontrado una correlación entre los niveles plasmáticos de TNF- α y el IMC en los pacientes obesos (103).

I.1.f.4) Proteína C reactiva

La PCR es un reactante de fase aguda producido por los hepatocitos en respuesta a diversos estímulos. Sus niveles son bajos en individuos sanos, pero aumentan mucho en respuesta a la infección, la inflamación y el daño tisular. Recientemente, varios estudios prospectivos han demostrado la utilidad de los niveles de PCR como predictores de riesgo de enfermedad cardiovascular tanto en individuos aparentemente sanos (104; 105) como en individuos con enfermedad cardiovascular establecida (106; 107). Un metaanálisis publicado en 1.998 analizó 7 estudios prospectivos y concluyó que los individuos con valores de PCR en el tercil superior presentaban un riesgo de enfermedad coronaria 1,7 veces mayor que los individuos con valores en el tercil inferior (108). Un estudio recientemente publicado ha mostrado que los niveles de PCR y de IL-6 se asocian con la presencia y la progresión de la arteriosclerosis (109).

Se ha observado de forma consistente niveles elevados de PCR en sujetos con sobrepeso y obesidad (70; 110). En varios estudios realizados en población sana, los niveles de PCR se han asociado de forma independiente a medidas de adiposidad, como el IMC, la cintura, el icc (66; 67; 111), o la grasa

visceral determinada por TAC (112). Asimismo, los niveles de PCR se encuentran asociados a los marcadores de RI. El IRAS (“*Insulin Resistance Atherosclerosis Study*”) fue un estudio multicéntrico diseñado para explorar las relaciones entre la RI y los factores de riesgo cardiovascular. En dicho estudio, se observó una correlación entre la RI y los niveles de PCR, Fbg y PAI-1 (67). Tanto la PCR como el Fbg y el PAI-1 fueron buenos predictores de la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (113). La relación de la PCR con el desarrollo de diabetes parecía mediada por el IMC y/o la RI, ya que disminuía significativamente al ajustar por estas variables. Otros estudios han confirmado la utilidad de los niveles de PCR para predecir el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (85).

El principal regulador de la síntesis hepática de PCR es la IL-6 (80; 81). El TNF- α no induce por sí mismo la síntesis de PCR, pero sí la de IL-6, que es el principal determinante de la respuesta de fase aguda (114). Así, en pacientes con obesidad se ha demostrado que los niveles plasmáticos de PCR se correlacionan con los de IL-6 y TNF- α (115). De igual manera, existe una correlación importante entre los niveles de PCR, IL-6 y TNF- α , y los componentes del SM (66).

I.1.f.5) Efecto de la pérdida de peso sobre los marcadores inflamatorios

Pocos estudios longitudinales han analizado el efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de los marcadores de inflamación en los pacientes con obesidad. En general, la mayoría de los estudios han mostrado que los niveles de PCR disminuyen con la pérdida de peso (84; 97; 100; 116-118), aunque un autor no encontró cambios tras estudiar a 21 mujeres obesas tras una modesta pérdida de peso (83).

Sin embargo, el efecto de la pérdida ponderal sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en pacientes con obesidad es más controvertido. Varios trabajos han

encontrado que los niveles de IL-6 descienden con la pérdida de peso (71; 83; 84; 96; 101; 117; 119-121), mientras que en otros no se han modificado (97; 100). En cuanto a los niveles plasmáticos de TNF- α , la mayoría de los autores no han detectado cambios con la pérdida de peso (71; 83; 84; 97; 100; 117; 119; 122), aunque otros han observado un descenso de los mismos (96; 98; 101; 120). Algunos autores han estudiado la secreción de citoquinas por el tejido adiposo en pacientes con obesidad antes y después de la pérdida de peso, encontrando en general una reducción de la secreción de IL-6 (83; 121), y resultados contradictorios respecto a la de TNF- α (83; 94; 95; 121). Una hipótesis reciente propone que los pacientes con pérdidas de peso rápidas mediante dietas de muy bajo contenido calórico (VLCD) (83; 122) o cirugía (84; 100) no presentan mejoría de los niveles de estas adipocitoquinas debido a la respuesta inflamatoria al estrés metabólico causado por el ayuno relativo, mientras que en las pérdidas de peso más graduales (96; 121; 123) se observaría una disminución de dichos niveles (100).

En resumen, se puede concluir que la pérdida de peso en pacientes con obesidad produce un descenso de los niveles de PCR, pero los resultados respecto a los efectos de la misma sobre los niveles de IL-6 y TNF- α no son concluyentes.

I.1.f.6) Conclusión

La obesidad se asocia a un estado de inflamación crónica de bajo grado, probablemente consecuencia de la secreción de citoquinas proinflamatorias por el tejido adiposo. Estas citoquinas pueden ser la base de muchas de las complicaciones asociadas a la obesidad, así como de la disfunción endotelial y, potencialmente, de la arteriosclerosis y del exceso de riesgo cardiovascular de estos pacientes.

I.1.g. Disfunción endotelial y estrés oxidativo en la obesidad

El estrés oxidativo es un término utilizado para definir el desbalance entre la producción intracelular de radicales libres a través de diferentes procesos celulares, y la capacidad de eliminación de los mismos por parte de la célula (124). Cuando estos radicales libres se acumulan, pueden alterar la integridad de numerosas moléculas, como el ADN y las proteínas. Además, los radicales libres pueden atacar a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos, causando una peroxidación lipídica. Las medidas de peroxidación lipídica, como el malonildialdehído y las partículas LDL oxidadas, se utilizan con frecuencia como marcadores de estrés oxidativo (125). Se ha descrito que los sujetos con obesidad presentan un aumento de la peroxidación lipídica (126-131) y del daño oxidativo a lípidos, proteínas y aminoácidos (123).

Asimismo, se ha descrito en pacientes obesos una activación endotelial crónica, conocida como disfunción endotelial (96; 100; 132; 133), que se expresa mediante el aumento de los niveles plasmáticos de ciertas moléculas producidas por las células endoteliales activadas (ICAM-1, VCAM-1, trombomodulina, P-selectina, etc) (134). La disfunción endotelial juega un importante papel en el desarrollo de la arteriosclerosis y de la enfermedad cardiovascular (135). Puede desencadenarse por diversos estímulos, entre los que se incluyen los radicales libres y las citoquinas. Se ha sugerido que el estrés oxidativo sería el responsable de la disfunción endotelial y de la inflamación crónica asociadas a la obesidad (136), pudiendo contribuir al riesgo cardiovascular de estos pacientes (137).

Algunos estudios han mostrado que tanto el estrés oxidativo (127; 131; 138) como la disfunción endotelial (100; 139) mejoran con la pérdida de peso.

I.1.k. Tratamiento

I.1.k.1) Beneficios de la pérdida de peso

La disminución de peso en los pacientes con obesidad produce una mejoría de muchos de los factores de riesgo asociados a la misma. Una pérdida de 5% del peso corporal asocia una mejoría del control metabólico en los pacientes obesos diabéticos (140). Asimismo, la pérdida de peso se asocia a una reducción de los niveles de TG, CT, LDL, y a un aumento de los de HDL (141). Un metaanálisis de 70 estudios al respecto concluyó que por cada kg de peso perdido, los niveles de CT y de LDL disminuían un 1%, los de TG disminuían un 3%, y los de HDL aumentaban un 1% (142). Además, con la pérdida de peso disminuye la aterogenicidad de las lipoproteínas (143). Las cifras de tensión arterial también disminuyen en el paciente obeso que pierde peso, de forma proporcional a la reducción ponderal (144). Datos del “*Framingham Offspring Study*” demuestran que una pérdida de peso de sólo 2,5 kg mantenida durante 16 años se asocia a una reducción de la suma de factores de riesgo cardiovascular del 48% en hombres y del 40% en mujeres (145). Sin embargo, aunque parece probable que la mejoría de las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad reduzca el riesgo cardiovascular, no existen en la actualidad estudios que demuestren de manera concluyente una reducción en la incidencia de eventos cardiovasculares tras la pérdida de peso en pacientes obesos.

I.1.k.2) Generalidades del tratamiento de la obesidad

El tratamiento de la obesidad requiere un abordaje multidisciplinario que abarque tratamiento dietético, ejercicio físico y modificación de la conducta. En los pacientes con obesidad mórbida, hay que adoptar pautas de actuación más drásticas: VLCD (146) e incluso cirugía bariátrica (147). El consenso de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO) del año 2.000

establece los criterios de intervención terapéutica para los sujetos entre 18 y 65 años, recomendando la pérdida de peso corporal en los siguientes casos (2):

- Pacientes con $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$.
- Pacientes con IMC de 25 a $29,9 \text{ kg/m}^2$ o circunferencia de cintura > 88 cm si es mujer, y > 102 cm si es hombre, con dos o más factores de riesgo cardiovascular asociados.

En pacientes con IMC mayor o igual a 35 kg/m^2 , se debe intentar una pérdida de peso igual o superior al 10%, mediante dieta y actividad física, pudiendo asociarse fármacos. Si ello no se consigue en 6 meses, se debe remitir al paciente a una unidad hospitalaria multidisciplinaria para valorar la posibilidad de otras medidas terapéuticas, como VLCD o cirugía bariátrica (2).

I.1.k.3) Dietas de muy bajo contenido calórico

Composición

Las VLCD se definen como dietas con un aporte calórico inferior a 800 kcal / día, o inferior a 12 kcal / kg de peso ideal (148), enriquecidas en proteínas de elevado valor biológico (0,8-1,5 g / kg de peso ideal / día). Deben aportar las cantidades recomendadas de minerales, vitaminas, electrolitos y ácidos grasos esenciales.

Las VLCD pueden administrarse con una dieta fórmula, que sustituye todas las comidas y aporta una cantidad conocida y fija de macro y micronutrientes, no siendo necesario suplementarla con preparados vitamínicos ni minerales. También puede administrarse una dieta basada en alimentos, pero en este caso el aporte calórico es menos exacto y existe un déficit de micronutrientes, siendo necesario suplementarlas con preparados multivitamínicos y minerales.

La composición de las VLCD de fórmula es la siguiente (149):

- Hidratos de carbono: en general contienen alrededor de 80 g diarios, y pueden aportar hasta 30 g diarios de fibra.
- Proteínas: debido al aumento del catabolismo proteico en el ayuno prolongado, en las VLCD se recomienda un aporte relativo de proteínas mayor al habitual: al menos 1,5 g/kg peso ideal diarios de proteínas de alto valor biológico, con el objetivo de que la pérdida de masa magra sea inferior al 25%. La fuente de las proteínas es la leche o el huevo.
- Grasas: el aporte es mínimo. Se administran aceites que contienen los ácidos grasos esenciales.
- Vitaminas y oligoelementos: aportan las cantidades recomendadas.
- Agua: se deben consumir al menos 2 litros de líquidos acalóricos al día para prevenir la deshidratación asociada a la pérdida de peso.

Efectos fisiológicos y metabólicos

El grado de reducción de peso depende del gasto energético, siendo superior en los hombres y en los pacientes con mayor IMC. El déficit calórico provoca un incremento de la cetogénesis, con aumento en la concentración de cuerpos cetónicos en sangre y en orina (149).

Los resultados respecto a la pérdida ponderal son variables. Habitualmente se produce una pérdida de 1,5 a 2,5 kg semanales, con posterior recuperación en un tiempo variable. Los resultados tras un año de seguimiento son similares a los de la dieta hipocalórica, por lo que hay autores que desaconsejan la VLCD (148). Sin embargo, varios estudios han mostrado el beneficio de este tipo de dietas, logrando pérdidas de peso superiores al 10% (150; 151) y mejoría de los factores de riesgo cardiovascular asociados a la obesidad: RI, hiperglucemia (151; 152), hipertensión arterial (151; 153) y dislipemia aterógena (151; 153).

Indicaciones

Están indicadas en los pacientes con IMC superior a 30 kg/m² que hayan fracasado al tratamiento dietético convencional, fundamentalmente si el IMC es superior a 35 kg/m². Para obtener resultados satisfactorios, se deben prolongar durante 8 a 12 semanas. Hay una serie de situaciones en las que estaría especialmente indicado el uso de una VLCD (154):

- Ante la necesidad de una pérdida de peso rápida, como por ejemplo la necesidad de una intervención quirúrgica.
- En obesidad asociada a factores de riesgo cardiovascular como diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial o dislipemia.

Efectos secundarios

Suelen ser transitorios y leves (155):

- Síntomas generales: fatiga, debilidad, mareos.
- Síntomas digestivos: estreñimiento, diarrea, náuseas.
- Síntomas inespecíficos: caída de pelo, sequedad de piel, fragilidad ungueal, irregularidades menstruales, edema, intolerancia al frío.
- Alteraciones de la conducta: irritabilidad, ansiedad.
- Gota: los cuerpos cetónicos compiten con la excreción renal del ácido úrico, por lo que aumentan los niveles plasmáticos de éste último. Si el paciente tiene antecedentes de gota y/o niveles de ácido úrico mayores de 10 mg/dL, se recomienda tratamiento profiláctico para la hiperuricemia.
- Colelitiasis: la pérdida de peso importante puede favorecer el desarrollo de colelitiasis, cólicos biliares y colecistitis aguda.
- Aumento transitorio de las transaminasas.
- Complicaciones cardiacas: en los años 70, fueron frecuentes las complicaciones cardiacas con muertes súbitas por arritmias malignas, por utilización de proteínas de bajo valor biológico. Con las VLCD actuales no han ocurrido estas complicaciones.

Contraindicaciones (154)

- Edad: la edad superior a 65 años es una contraindicación relativa, ya que hay una mayor pérdida de masa magra. En niños y adolescentes, su uso es experimental y bajo estricta supervisión médica.
- Embarazo: es una contraindicación absoluta, ya que la cetosis puede dañar al feto.
- Lactancia: es una contraindicación absoluta, ya que en ella están aumentados los requerimientos tanto calóricos como proteicos.
- Diabetes mellitus tipo 1: es una contraindicación relativa, por el mayor riesgo de cetosis e hipoglucemia.
- Enfermedad cardíaca: son contraindicaciones absolutas la angina inestable, el infarto agudo de miocardio reciente (menos de 3 meses), las arritmias malignas, los pacientes con síndrome de QT prolongado y los antecedentes de síncope de origen cardiológico.
- Enfermedad catabólica concomitante: son contraindicaciones absolutas las infecciones graves, las neoplasias, y el exceso de glucocorticoides endógeno o exógeno.
- Enfermedad cerebrovascular reciente.
- Insuficiencia renal moderada-grave: es una contraindicación por la alteración en la excreción de productos del catabolismo proteico, electrolitos y agua.
- Insuficiencia hepática grave: es una contraindicación absoluta, pero no lo es el hígado graso con alteraciones leves o moderadas de la función hepática.
- Trastornos psiquiátricos: contraindican el uso de VLCD los trastornos del comportamiento alimentario, el alcoholismo, la drogadicción, la depresión mayor y los trastornos psicóticos.
- Gota, colelitiasis: son contraindicaciones relativas.

I.2. MECANISMOS PROTROMBÓTICOS

En el momento actual, está ampliamente aceptado que el paciente obeso tiene mayor riesgo de padecer fenómenos trombóticos tanto en el área arterial (156) como venosa (157; 158), pero no están establecidos con exactitud los mecanismos responsables de esta asociación.

Se han sugerido diversos mecanismos patogénicos en la génesis de los fenómenos trombóticos en el paciente obeso. Por una parte, pueden influir las alteraciones del flujo sanguíneo o alteraciones hemorreológicas, pero también pueden estar implicados trastornos de la hemostasia, es decir de los mecanismos de coagulación-anticoagulación, y de fibrinólisis-antifibrinólisis.

I.2.a. Hemorreología

La Hemorreología es la ciencia que 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).

I.2.a.1) Fibrinógeno

El Fbg es una glicoproteína simétrica de síntesis hepática y peso molecular de 340.000, compuesta por seis cadenas polipeptídicas de tres tipos: dos $A\alpha$, dos $B\beta$ y dos γ . La unión de estas cadenas se mantiene a través de

puentes disulfuro. Forma un gel de fibrina a través de una serie de reacciones moleculares iniciadas por la acción proteolítica de la trombina (159). El Fbg es una proteína de fase aguda que influye en la hemostasia, la hemorreología, la agregación plaquetar y la función endotelial (160). Su papel preciso en el proceso aterosclerótico no está claramente establecido: se discute si es responsable del mismo, o bien, como reactante de fase aguda, un simple marcador de la enfermedad vascular subyacente (161).

El Fbg se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular, como hipertensión arterial, diabetes mellitus, consumo de tabaco y dislipemia. Las mujeres tienen valores más elevados que los hombres (160). Asimismo, los niveles de Fbg aumentan 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. Los niveles de Fbg están relacionados con los cambios estacionales, incrementándose en invierno (162). También se ha visto que ciertos polimorfismos del gen del Fbg pueden afectar sus niveles plasmáticos (163). La síntesis hepática de Fbg está controlada fundamentalmente por la IL-6 (80).

I.2.a.2) Viscosidad plasmática

El plasma es un fluido *newtoniano*, y por tanto su viscosidad no varía con las condiciones del flujo sanguíneo. La VP depende principalmente de las proteínas plasmáticas. El efecto de una proteína sobre la VP aumenta conforme aumenta su concentración, tamaño y asimetría. Así, el marcado efecto del Fbg sobre la VP se debe a su elevado peso molecular y a su gran asimetría. La albúmina influye escasamente en la VP, debido a su bajo peso molecular y relativa simetría. Las globulinas tienen un efecto intermedio, así como las lipoproteínas LDL y VLDL. Por ello, en condiciones fisiológicas, la VP está fundamentalmente determinada por la concentración de Fbg y de colesterol LDL.

I.2.a.3) Deformabilidad eritrocitaria

La DE es la capacidad que posee el hematíe para cambiar de forma cuando es sometido a un estado tensional. En condiciones de reposo, el hematíe tiene la forma de discocito bicóncavo (Figura 3), siendo ésta el resultado del equilibrio entre las fuerzas externas e internas que actúan sobre él. Durante la circulación, los hematíes cambian constantemente de forma, ya que están expuestos a un amplio rango de fuerzas de cizallamiento (164).

Así, en áreas de la circulación donde las fuerzas de cizallamiento son muy elevadas, el hematíe adopta una forma elíptica que facilita la circulación (Figura 4). Las alteraciones de la DE producen, a nivel macrocirculatorio, un enlentecimiento de la sangre, aumentando el tiempo de contacto de los elementos formes entre sí y con la pared del vaso. 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 5). A nivel microcirculatorio, una disminución de la DE produce una disminución del flujo capilar, que favorece los fenómenos trombóticos y la hipoperfusión tisular.

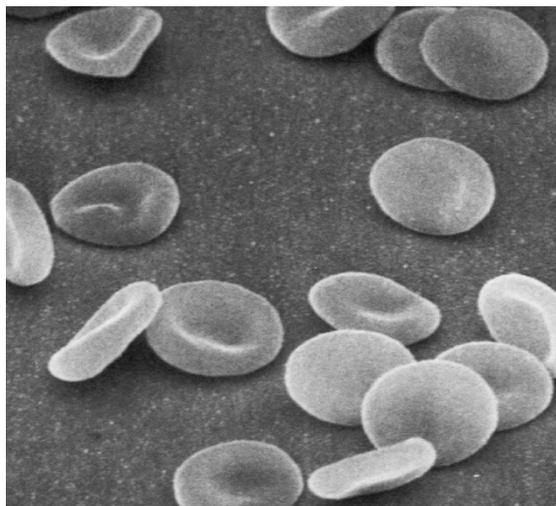


Figura 3: Imagen de hematíes en reposo

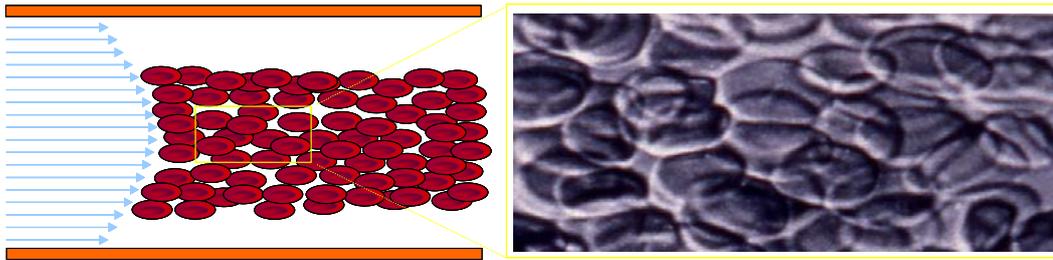


Figura 4: Deformabilidad eritrocitaria en la macrocirculación

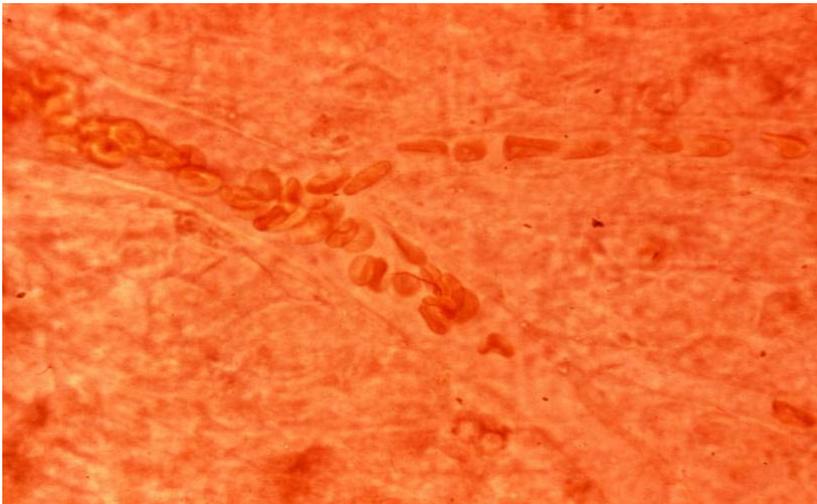


Figura 5: Deformabilidad eritrocitaria en la microcirculación

Factores de los que depende la deformabilidad eritrocitaria

Además de la tensión de cizallamiento, la DE depende de:

1) Geometría celular

El hematíe presenta en reposo forma de discocito bicóncavo. Su superficie es de $140 \mu^2$ y su volumen de $90 \mu^3$, con una relación superficie-volumen alta, lo que le permite sufrir grandes deformaciones en la microcirculación sin aumentar su superficie. En la práctica, dada la dificultad

para calcular la relación superficie-volumen, se utiliza el volumen corpuscular medio (VCM) para valorar la influencia de la misma sobre la DE (165).

2) Viscosidad citoplasmática

Para que el hematíe sea deformable, es necesario que el contenido globular sea muy fluido y que la viscosidad interna eritrocitaria sea baja. La viscosidad del medio interno del hematíe 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 (166). “*In vivo*”, situaciones de hiperosmolaridad pueden aumentar la CHCM, como puede ocurrir en la diabetes mellitus o en la insuficiencia renal.

3) Viscoelasticidad de la membrana

En condiciones normales, la viscoelasticidad de la membrana eritrocitaria es el principal factor determinante de la DE. Como se analizará con detalle en un apartado posterior, la viscoelasticidad de dicha membrana puede modificarse por anomalías cualitativas o cuantitativas de las proteínas del citoesqueleto o de los lípidos que la componen.

I.2.a.4) Agregación eritrocitaria

La AE es un fenómeno fisiológico y reversible que juega un importante papel en las propiedades del flujo sanguíneo, especialmente en áreas de baja velocidad de cizallamiento (167). La AE es el resultado del equilibrio energético entre las fuerzas de atracción y de repulsión existentes entre los hematíes. En condiciones normales, y debido fundamentalmente al contenido en ácido siálico, la membrana eritrocitaria mantiene una carga neta negativa (168), que es la principal responsable de las fuerzas de repulsión entre los hematíes. En oposición, existe una atracción entre los mismos dependiente de

las fuerzas electrodinámicas de Van Der Waal. A su vez, las proteínas plasmáticas tienden a formar puentes macromoleculares intercelulares de unión (169), formando “rouleaux” eritrocitarios (Figuras 6 y 7). La AE es un fenómeno reversible, de manera que, cuando aumenta la fuerza de cizallamiento, los “rouleaux” desagregan.

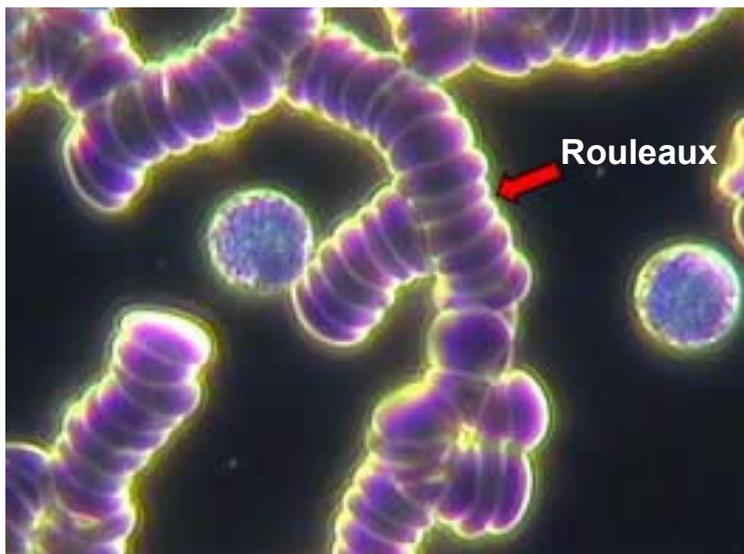


Figura 6: Rouleaux eritrocitarios (I)

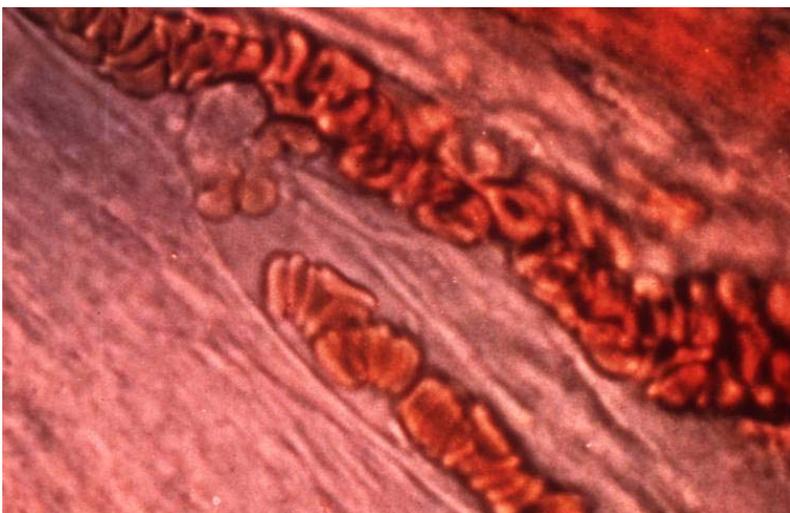


Figura 7: Rouleaux eritrocitarios (II)

Factores determinantes de la agregación eritrocitaria

1) Condiciones del flujo sanguíneo

Bajo condiciones fisiológicas de flujo, la fuerza de cizallamiento es suficientemente alta para producir la desagregación de los hematíes. La mayor fuerza de cizallamiento tiene lugar en los capilares. Esto, unido a su estrecho calibre y al bajo hematocrito (Htc) a este nivel, minimiza la posibilidad de que los hematíes agreguen. En cambio, las áreas de bajo flujo, como las venas de pequeño tamaño y las vénulas postcapilares, son áreas proclives a la formación de agregados eritrocitarios.

2) Propiedades del hematíe

- Geometría celular: El aumento de volumen eritrocitario produce una mayor dificultad para que los hematíes contacten entre sí, dificultando la AE. Por el contrario, una pérdida de volumen facilita la interacción intercelular y por tanto la AE (170).

- Deformabilidad eritrocitaria: La disminución de la DE reduce la AE, dado que los hematíes rígidos presentan una mayor dificultad para ofrecer una superficie de contacto suficiente para interactuar libremente con los hematíes adyacentes (171).

- Composición de la membrana eritrocitaria: Cambios estructurales en las glicoproteínas de superficie o en la composición lipídica de la misma pueden modificar la carga electrostática neta y por tanto la fuerza de repulsión entre los hematíes, favoreciendo la AE (172).

3) Hematocrito

Para que se produzca la AE, los hematíes tienen que estar lo suficientemente cerca para poder interactuar. Así, un menor Htc dificulta esta interacción y suele dar lugar a una menor AE. Del mismo modo, un Htc elevado se asocia con una mayor tendencia a formar “rouleaux”. Dada esta

dependencia, actualmente se recomienda que la determinación de la AE tenga lugar a un Htc fijo de 45% (173).

4) Proteínas plasmáticas

La atracción entre los hematíes en condiciones fisiológicas depende fundamentalmente del Fbg y de las globulinas adsorbidas a su superficie celular. En ausencia de patología, el Fbg es la proteína plasmática con mayor efecto sobre la AE, existiendo una correlación positiva entre sus niveles plasmáticos y la AE (174). Otras proteínas plasmáticas que influyen en el proceso de AE son la α 2-macroglobulina y las inmunoglobulinas (Ig) IgG e IgM (175). Las lipoproteínas plasmáticas también influyen en la AE, observándose una correlación directa tanto con el nivel de LDL como con el de VLDL, e inversa con el de HDL (176; 177). No está establecida la posible influencia que ciertas proteínas de fase aguda distintas al Fbg, como la PCR, podrían ejercer sobre la AE (178-180).

I.2.a.5) Composición de la membrana eritrocitaria

Generalidades

Estructuralmente, la membrana eritrocitaria se compone en un 95% de lípidos y proteínas, que constituyen el 90-95% de su peso seco. El restante 5% lo forman oligosacáridos que se exteriorizan en la superficie formando el glucocálix (Figura 8).

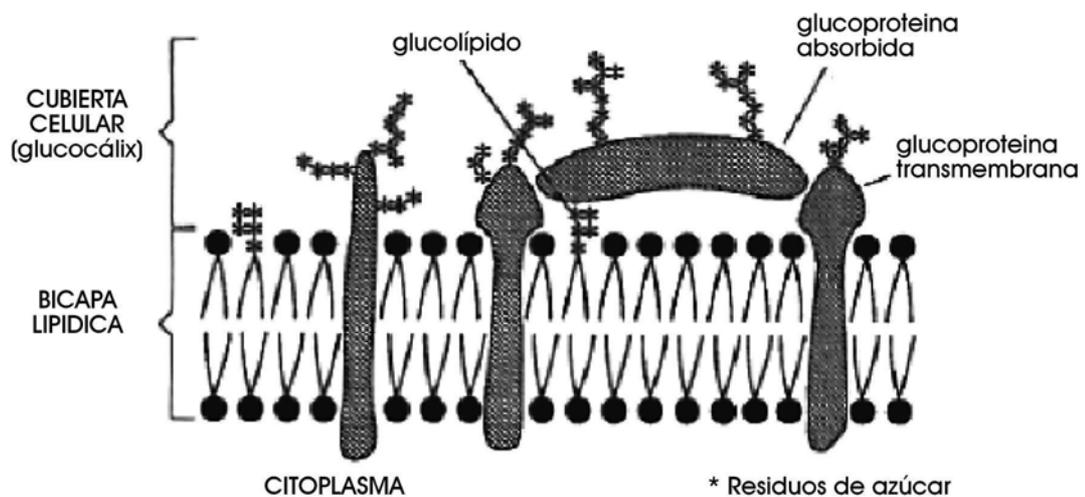


Figura 8: Estructura de la membrana del hematíe

Los lípidos, fundamentalmente fosfolípidos y colesterol, se disponen en doble capa, formando una estructura fluida (181). La composición de la membrana eritrocitaria modula tanto la deformabilidad como la agregabilidad eritrocitarias. Así, la DE puede verse alterada por cambios en la composición lipídica, tales como el aumento del cociente colesterol/fosfolípidos, modificaciones en la composición de los fosfolípidos, y los cambios en el grado de saturación de los ácidos grasos.

Proteínas de la membrana

1) Proteínas del citoesqueleto

Las proteínas del citoesqueleto (espectrina, actina, proteína 4-1, ankirina) son necesarias para mantener la forma del hematíe. Se unen entre sí para formar una malla tridimensional que estabiliza la bicapa lipídica suprayacente.

2) Proteínas integrales o transmembrana

Las proteínas integrales (glicoforina y banda 3) atraviesan la bicapa lipídica, y tienen una función de transporte, siendo además responsables de la antigenicidad expresada en los grupos sanguíneos. Además, la glicoforina contiene un carbohidrato terminal, el ácido siálico, que confiere a la membrana eritrocitaria una carga global negativa (168), siendo responsable de las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre los hematíes, que dificultan la agregación de los mismos.

Lípidos de la membrana

1) Generalidades

La bicapa lipídica de la membrana está constituida predominantemente por fosfolípidos y colesterol no esterificado, prácticamente en iguales proporciones, de manera que el cociente molar colesterol/fosfolípido es en condiciones normales de 1:1. Los fosfolípidos de la membrana son de dos tipos: colínicos y aminados. Los colínicos son la fosfatidilcolina y la esfingomiélin, y los aminados son la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina (FS).

2) Distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana

En condiciones normales, la mayoría de la fosfatidilcolina y de la esfingomiélin se encuentran localizadas en la cara externa de la bicapa, en tanto que la mayoría de la fosfatidiletanolamina y la casi totalidad de la FS se localizan en la cara interna de la misma (Figura 9) (182). Así, los fosfolípidos de la membrana están distribuidos de forma asimétrica entre las dos hojas de la bicapa: la externa está enriquecida en fosfolípidos colínicos (fosfatidilcolina y esfingomiélin), y la interna en fosfolípidos aminados (fosfatidiletanolamina y FS). Los fosfolípidos de la hoja externa presentan una mayor libertad de movimiento o fluidez que los que están ubicados en la hoja interna, confiriendo este hecho mayor DE (183).

La distribución asimétrica de los fosfolípidos en la membrana celular se mantiene en un equilibrio dinámico gracias a la acción de diversas enzimas que transportan fosfolípidos de una capa a la otra. La flipasa, también llamada translocasa de aminofosfolípidos, transporta los fosfolípidos aminados de la hemicapa externa a la interna (182), y es la principal responsable de la ausencia de FS en la hoja externa de la bicapa. La flopasa transporta los fosfolípidos colínicos desde la capa interna hacia el exterior de la membrana (184). La escramblasa puede actuar de forma bidireccional (184). Estas enzimas mantienen, en condiciones normales, la distribución asimétrica de fosfolípidos de la membrana, estando la FS ausente de su capa externa (185). Las proteínas del citoesqueleto también ayudan a mantener la asimetría fosfolipídica, regulando la velocidad de movimiento de fosfolípidos entre las dos hojas de la bicapa (186).

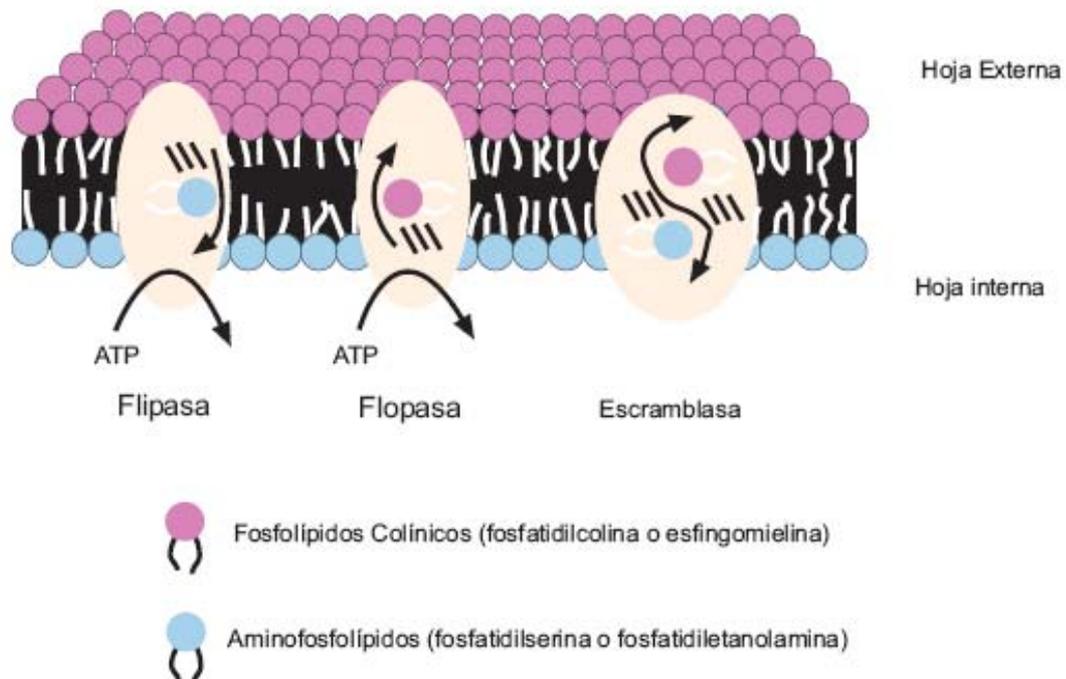


Figura 9: Distribución asimétrica de los fosfolípidos en el seno de la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria (187)

3) Colesterol

El colesterol de la membrana eritrocitaria puede intercambiarse con el colesterol plasmático libre de lipoproteínas. Diversos autores han observado un incremento del cociente colesterol/fosfolípidos cuando se incuban hematíes en un medio rico en colesterol. Igualmente, este incremento también se observa cuando se alimenta a cobayas con dietas hipercolesterolémicas. En ambas situaciones, el incremento del cociente colesterol/fosfolípidos se acompaña de una menor DE (188-192). Otros autores han estudiado a pacientes con hiperlipoproteinemias primarias, y han observado un aumento del colesterol de membrana relacionado con el aumento del colesterol plasmático (193), aunque no está establecido que esta alteración disminuya la DE (194).

Por tanto, determinadas propiedades de la membrana eritrocitaria pueden influir en la AE y DE, y por tanto en la VS. Entre éstas, destacan el contenido de dicha membrana en colesterol y fosfolípidos, así como la distribución de los mismos en la bicapa, y el ácido siálico contenido en las proteínas transmembrana. Las alteraciones cualitativas y cuantitativas de estos componentes pueden alterar las propiedades reológicas de la sangre.

I.2.a.6) Viscosidad sanguínea

Los factores que determinan la VS son el Htc, la VP, la DE, y la AE. 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 o gradiente de velocidad ("*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. Si se toma como unidad de distancia el cm, el

“*shear rate*” se expresa en $s^{-1} = \text{cm/s/cm}$. La fuerza de cizallamiento es la fuerza que actúa paralelamente a la superficie del vaso sobre cada unidad de área de flujo en movimiento, y se expresa en dina/cm^2 . La VS es el cociente entre el “*shear stress*” y el “*shear rate*”. Su unidad es el poise (dina.s/cm^2), aunque habitualmente se utiliza el centipoise (cP).

A baja velocidad de cizallamiento sanguíneo, cuando las fuerzas que actúan sobre los hematíes son pequeñas, se produce un incremento de la VS. A alta velocidad de cizallamiento, por el contrario, los hematíes desagregan y se deforman, cambiando su habitual forma discoidea por una forma oval, lo que favorece el flujo sanguíneo al oponer una resistencia mínima, disminuyendo, por tanto, la VS. En la macrocirculación, la velocidad de cizallamiento es elevada, llegando a valores mínimos en las vénulas postcapilares, donde la AE tiene más posibilidades de producirse, especialmente en las situaciones que se acompañan de bajo flujo (Figura 10) (164).

La VS debe determinarse a 37°C , ya que la temperatura ejerce una gran influencia sobre este parámetro hemorreológico. Puede valorarse a distintas velocidades de cizallamiento, que remedan las existentes en las diversas áreas del árbol vascular, a la vez que puede medirse tanto a Htc como a Htc corregido de 45 %. Ambas medidas son recomendables, ya que la primera refleja la VS real del individuo, y la segunda indica en qué medida las posibles alteraciones de la misma son o no atribuibles al valor Htc, del que en gran medida depende (195). Adicionalmente, la VS a Htc corregido permite comparar los resultados obtenidos entre los diversos laboratorios.

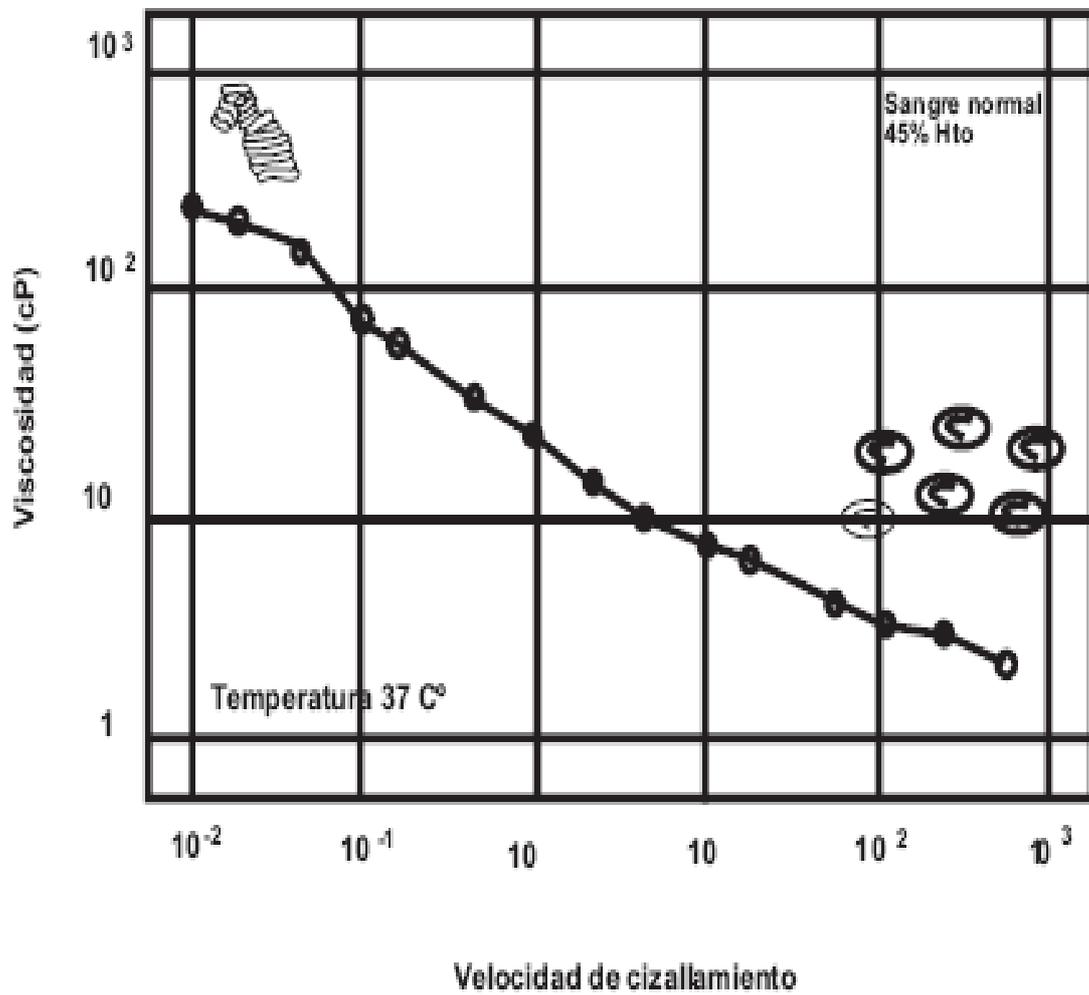


Figura 10: Cambios de la viscosidad sanguínea en función de la velocidad de cizallamiento

I.2.b. Hemostasia

I.2.b.1) Generalidades

La hemostasia es el conjunto de procesos que controlan la fluidez de la sangre y la integridad del sistema vascular. La hemostasia comprende un elevado número de reacciones e interacciones complejas entre los componentes de la sangre y la pared de los vasos, como queda reflejado en la Figura 11. 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 dos restantes, la hemostasia secundaria.

La hemostasia primaria es el conjunto de mecanismos que generan el primer tapón hemostático instantáneo en el vaso dañado, formado por una combinación de vasoconstricción y adhesión y agregación plaquetar. La pared del vaso sanguíneo contiene tres partes bien diferenciadas: la capa íntima, la capa media y la adventicia. La íntima es la capa más interna, y está formada por una monocapa de células endoteliales que están en contacto con la sangre circulante, y que juegan un papel fundamental en la hemostasia. El endotelio vascular sintetiza y libera ciertas sustancias con actividad protrombótica y otras con actividad antitrombótica (196). La integridad del endotelio en todo el sistema circulatorio evita que se formen coágulos sanguíneos en el interior de los vasos, debido a un balance favorable hacia la acción antitrombótica.

Cuando el endotelio vascular se daña, las plaquetas son estimuladas y se adhieren a la superficie del subendotelio, formando un tapón hemostático primario. Concomitantemente, se produce la liberación del contenido de los gránulos densos (adenosín difosfato, adenosín trifosfato, calcio iónico,

serotonina...), necesarios para la agregación plaquetar y para la vasoconstricción, y de los gránulos α plaquetares (Fbg, factor Von Willebrand, factor plaquetar 4, tromboxano...), que inician la cascada de la coagulación.

El tapón plaquetar formado durante la hemostasia primaria no tiene por sí solo la consistencia suficiente para detener la hemorragia, y sólo es capaz de retrasarla unos cuantos segundos. Debe iniciarse la hemostasia secundaria para formar el coágulo de fibrina, más estable y consistente. La hemostasia secundaria está constituida por dos sistemas: la coagulación sanguínea y la fibrinólisis, a su vez controlados por la anticoagulación y la antifibrinólisis (Figura 11). Asimismo, las membranas fosfolípídicas de las plaquetas activadas expresan receptores de Fbg, y además son el lugar donde se ensamblan los complejos enzima-cofactor de la coagulación.

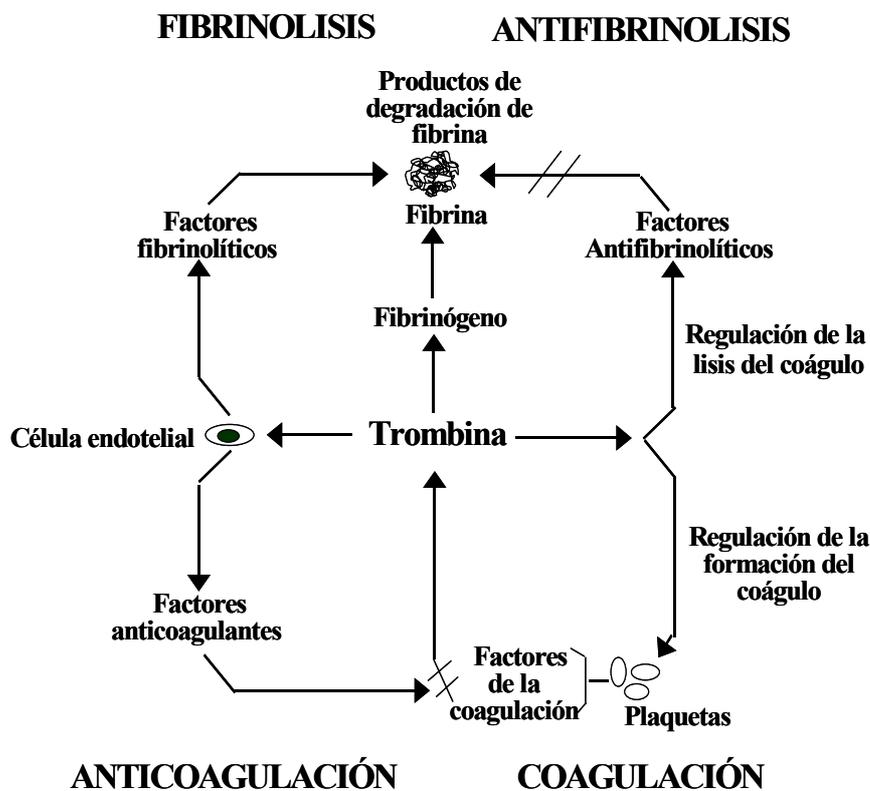


Figura 11: Hemostasia secundaria

I.2.b.2) La coagulación sanguínea

El sistema de la coagulación está formado por diversas proteínas, casi todas enzimas, que circulan como proenzimas inactivos, y que se activan de forma secuencial unas a otras: los factores de la coagulación. La coagulación sanguínea es un proceso que ocurre de forma continua, aunque generalmente a muy baja velocidad, controlada por un exceso de inhibidores circulantes (197). La coagulación sanguínea culmina en la generación de trombina y en la consiguiente formación del coágulo de fibrina. Como puede observarse en la Figura 12, existen dos vías para iniciar la coagulación sanguínea, la vía extrínseca y la vía intrínseca.

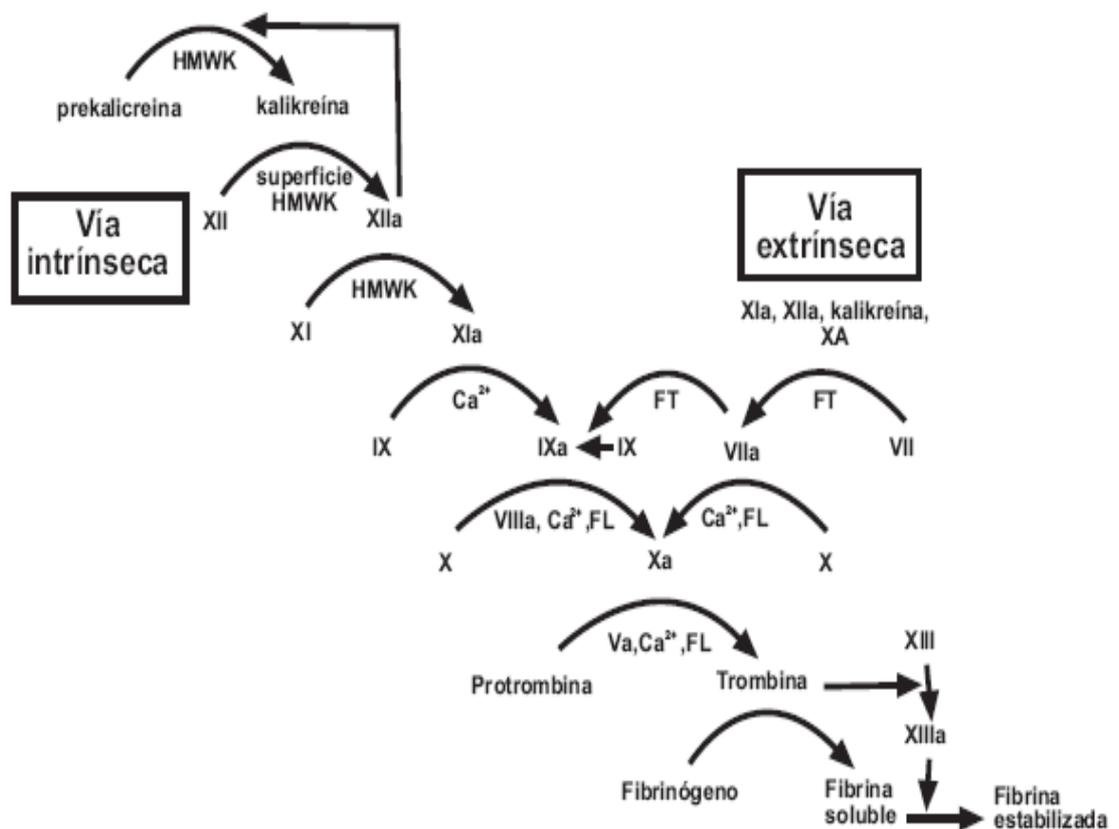


Figura 12: Esquema de la coagulación sanguínea. Ca^{2+} : ion calcio. FL: fosfolípidos. HMWK: kininógeno de alto peso molecular

En la vía extrínseca, la cascada de la coagulación se inicia con la exposición de la sangre a tejidos dañados que expresan el factor tisular (FT) (198). El FT actúa como cofactor del factor VII activado (F VIIa) presente en la circulación, y el complejo factor VIIa-FT activa al factor X. Por el contrario, la vía intrínseca de la coagulación se inicia, generalmente, tras la exposición de la sangre a superficies extrañas cargadas negativamente. Aquí es el factor XII el que se une a dichas superficies, experimentando un proceso de autoactivación e iniciando la cascada de la coagulación. Ambas vías convergen en la activación del factor X, dando lugar a una vía final común, que culmina con la formación de trombina, enzima que convierte al Fbg en fibrina, controlando por tanto la formación del coágulo. El factor XIII activado estabiliza los polímeros de fibrina entrecruzándolos, formándose así una malla de fibrina en la que las plaquetas quedan atrapadas.

Para que el sistema hemostático funcione correctamente, es tan importante la formación del coágulo como su rápida disolución. Por ello, tanto la coagulación como la fibrinólisis deben estar perfectamente reguladas por la anticoagulación y la antifibrinólisis, respectivamente. La trombina controla en última instancia todo el proceso de la hemostasia a diferentes niveles. La trombina modifica las plaquetas para acelerar la coagulación y liberar el PAI-1. A su vez, induce la liberación de activador de plasminógeno tipo tisular (t-PA) por parte de las células endoteliales. Convierte al Fbg en fibrina, y activa al factor XIII, que estabiliza a la fibrina. 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 misma (plaquetas, células endoteliales, Fbg y factor XIII).

I.2.b.3) El mecanismo de anticoagulación

La propia naturaleza de la coagulación sanguínea exige mecanismos de regulación que eviten su propagación y extensión de un modo incontrolado. El

requerimiento de una superficie adecuada limita ya 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. Sin embargo, existe un control directo que limita la actividad de los enzimas de la coagulación: el mecanismo de la anticoagulación.

El mecanismo de la anticoagulación está formado por dos sistemas inhibidores complementarios: el sistema de inhibidores de proteasas y el sistema de la proteína C (PC). Los inhibidores de proteasas son la antitrombina, el cofactor II de la heparina (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. El sistema de la PC está formado por la PC, la proteína S, la trombomodulina, 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 antitrombina, el CH II, la α_1 AT, el C1-inhibidor y el PCI pertenecen al grupo de las serpinas (“*serin protease inhibitor*”), que inhiben los enzimas tipo serina, actuando como falsos sustratos de los mismos (199). El resto de inhibidores de la coagulación, como la α_2 -macroglobulina, el TFPI y el sistema de la PC, actúan mediante mecanismos distintos.

La antitrombina es el principal regulador de la generación de trombina. Es capaz de inhibir a la mayor parte de los factores de la coagulación activados, como los factores IX, X, XI y XII activados, la kalikreína y la trombina, aunque actúa preferentemente sobre los factores II, IX y X activados. El CH II es el inhibidor homólogo de la antitrombina, pero con diferente especificidad (200), que inhibe a la trombina. El TFPI inhibe al factor X activado y al complejo F VIIa-FT, a través de un mecanismo de acción completamente diferente al de los demás inhibidores de la coagulación (201). La α_2 -macroglobulina es un inhibidor de amplio espectro capaz de inactivar a la mayor parte de los factores de la coagulación y fibrinólisis activados. Otro inhibidor que puede participar en el mecanismo anticoagulante es el C1-

inhibidor, un componente del sistema del complemento que es además un inhibidor tipo serpina, capaz de neutralizar a los factores XI y XII activados y a la kalikreína. La α_1 AT es un inhibidor tipo serpina que inhibe al factor XI activado, a la plasmina y a la PC activada (PCa).

Sistema de la proteína C

Durante los últimos años se ha acumulado abundante información que demuestra la importancia fisiológica del sistema anticoagulante de la PC. La activación de la PC conduce a la inactivación de los cofactores de la coagulación activados V (F Va) y VIII (F VIIIa) por degradación proteolítica, deteniendo así la formación de la trombina (202).

El sistema de la PC, a diferencia de otros mecanismos anticoagulantes, funciona como un inhibidor de la coagulación “a demanda”, capaz de amplificar la respuesta anticoagulante a medida que aumentan los mecanismos procoagulantes. La PC se encuentra en la circulación en forma inactiva y, para ejercer su acción anticoagulante, debe ser activada en la superficie de la célula endotelial por la acción de la trombina generada durante el proceso de la coagulación.

La trombina por sí sola no es capaz de activar a la PC: primero debe unirse a la trombomodulina situada en la superficie de la célula endotelial, sufriendo así un cambio conformacional que la transforma en un potente activador de la PC. A su vez, la PC se une a un receptor específico localizado en la superficie endotelial, el EPCR (203), que potencia unas 20 veces la activación de la PC por el complejo trombina-trombomodulina. Una vez la PC se encuentra unida al EPCR, a la trombina y a la trombomodulina, se expone su centro reactivo, siendo activada de manera eficiente por la trombina. La PCa se une a la proteína S, y este complejo permite la disociación de la PCa del EPCR. El complejo PCa - proteína S se une a las superficies fosfolipídicas donde tienen lugar las reacciones de la coagulación, inactivando a los factores

de la coagulación F Va y F VIIIa (204). F Va y F VIIIa son esenciales para la activación de la protrombina por el factor X activado, y para la activación del factor X por el factor IX activado, respectivamente, por lo que su inactivación reduce drásticamente la generación de trombina. De todo ello se deduce que, para que se produzca una adecuada activación de la PC, se deben ensamblar perfectamente las moléculas de PC, trombina, trombomodulina y EPCR, formando un complejo cuaternario sobre la superficie de la célula endotelial (Figura 13).

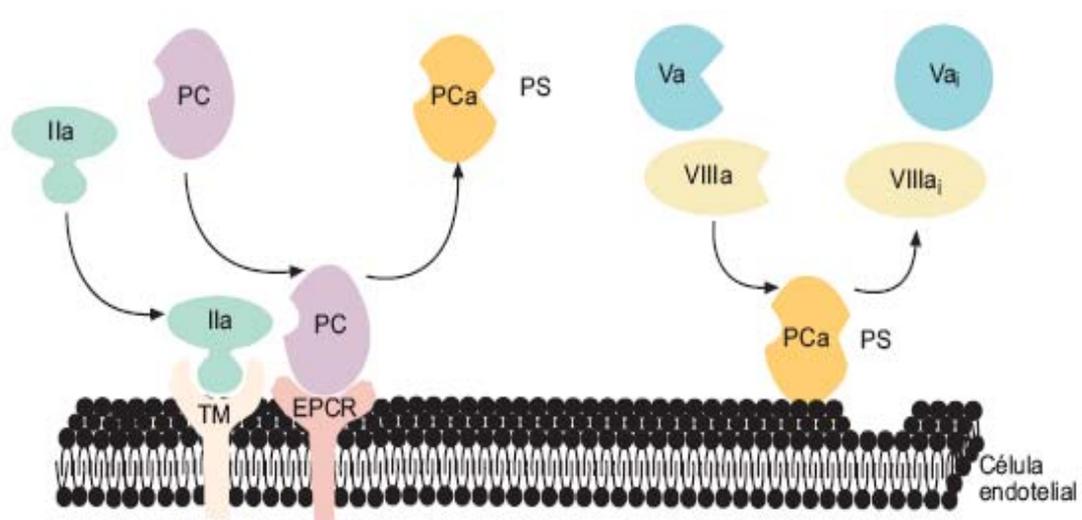


Figura 13: Mecanismo de activación de la PC. TM: trombomodulina. PC: proteína C. PCa: proteína C activada. PS: proteína S. EPCR: receptor endotelial de la proteína C

La antitrombina y el PCI pueden inactivar la trombina unida a la trombomodulina a una velocidad mucho mayor que a la trombina libre. La trombina inhibida se disocia rápidamente de la trombomodulina, regenerándose la superficie endotelial. Así, al cesar la generación de trombina, el complejo de activación de la PC deja rápidamente de generar PCa. Otro regulador del sistema de la PC es el C4b-BP, que forma un complejo con la proteína S e impide su actividad de cofactor de la PCa.

Por lo general, los enzimas proteolíticos generados en la circulación sanguínea tienen una vida media de unos pocos segundos. Una excepción es la PCa, cuya vida media es de aproximadamente 10 minutos (205). La lenta inactivación de la PCa le permite permanecer en la circulación durante un periodo de tiempo relativamente largo, permitiendo que pueda desplazarse hasta las superficies fosfolipídicas procoagulantes de las células donde se encuentran los complejos de la coagulación, inactivándolos y controlando así la propagación de la coagulación. La existencia de complejos PCa:PCI y PCa: α_1 AT en plasma “*in vivo*”, tanto en condiciones basales como en diversas situaciones patológicas, demuestra que la PCa proporciona un mecanismo de anticoagulación sistémica (205).

Una alteración de cualquiera de las regiones de los componentes del sistema de la PC esenciales para su activación podría dar lugar a un bajo nivel circulante de PCa, y a un mayor riesgo trombótico (206). Aunque los niveles reducidos de PCa pueden estar asociados a deficiencias familiares de PC y proteína S (207; 208), también pueden ser debidos a mutaciones en el gen de la trombomodulina (209) o del EPCR (210). Además, las alteraciones endoteliales (211) son otra posible causa de niveles reducidos de PCa. Una disfunción endotelial puede producir una reducción de los niveles de trombomodulina y EPCR en la membrana de la célula endotelial, con la consiguiente reducción en la activación de la PC. Este mecanismo ha sido descrito como causante de trombosis en la insuficiencia renal crónica (212).

I.2.b.4) Resistencia a la proteína C activada

En el año 1.993, se descubrió la R-PCa como una nueva causa de trombofilia hereditaria (213). Se observó que la adición de concentraciones crecientes de PCa en el plasma de un paciente con trombosis no provocaba el esperado alargamiento en el tiempo de coagulación. Sin embargo, la adición de factor V de plasma normal corregía la R-PCa. Estudios posteriores

identificaron la mutación en el gen del factor V causante de la R-PCa (214): el cambio de un nucleótido de guanina por un nucleótido de adenosina en la posición 1691 del gen del factor V da lugar al cambio del aminoácido arginina por glutamina en la posición 506 de la proteína. El factor V mutante se denomina factor V Leiden o factor V:Q⁵⁰⁶. El papel de la PCa, como se ha detallado anteriormente, es la regulación de la coagulación inactivando F Va y F VIIIa. La PCa inactiva al F Va cortando por los enlaces Arg306, Arg506 y Arg679. El corte por Arg506 acelera el corte por las otras dos argininas. Cuando la Arg506 está sustituida por el glutámico, la PCa no puede cortar ese enlace, reduciéndose asimismo la velocidad de rotura de las otras dos argininas, por lo que la inactivación del F Va es mucho más lenta.

Los individuos portadores de esta mutación presentan una mayor tendencia trombótica (215). De hecho, esta mutación se considera en la actualidad el factor de riesgo genético más común de TVP conocido hasta el momento (216). La prevalencia de esta mutación, más frecuente en población caucásica, oscila en la mayoría de los países europeos entre el 2 y el 7% (217).

En los últimos años, se ha acuñado el término de R-PCa adquirida para definir a pacientes que presentan una baja respuesta anticoagulante a la PC, en ausencia de mutaciones conocidas del gen del factor V (218). Distintas situaciones se han implicado en la R-PCa adquirida, como el embarazo, los anticonceptivos orales, el tratamiento hormonal sustitutivo con estrógenos, el aumento del factor VIII, el anticoagulante lúpico, los niveles elevados de CT o TG, la edad, o el sexo femenino, entre otras. La relación de la obesidad con la R-PCa adquirida se analizará más adelante.

I.3.c. Fibrinólisis

I.2.c.1) El sistema fibrinolítico

La fibrinólisis es el conjunto de mecanismos encargados de la degradación de los coágulos de fibrina. Es un proceso de gran importancia para evitar que los trombos lleguen a ser demasiado grandes, para facilitar la cicatrización de las heridas, y para impedir la trombosis en lugares inapropiados.

El sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de un proenzima, el plasminógeno, en un enzima activo, la plasmina, proteasa sérica que degrada la fibrina a sus productos de degradación (PDFs) (Figura 14). La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas: el t-PA, producido por las células endoteliales, y el PA tipo uroquinasa (u-PA), que debe su nombre a su excreción urinaria. Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina, se generan PDFs con residuos de lisina en posición carboxiterminal, a los que se unen de forma simultánea el plasminógeno y el t-PA, aumentando mucho la capacidad de éste último de formar plasmina.

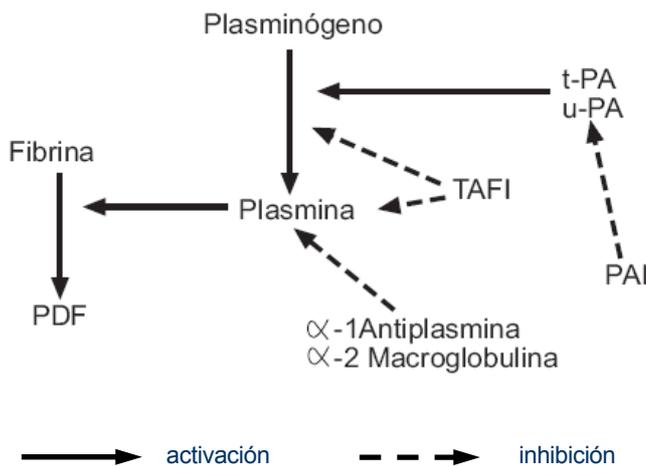


Figura 14: Vía de la fibrinólisis

Existen varios inhibidores de la fibrinólisis que mantienen el sistema en equilibrio (Figura 14). Por una parte, están los PAIs, que 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 (219), y el PAI-3, que más tarde se identificó como el PCI (220), que presenta mayor concentración plasmática pero menor actividad antifibrinolítica (221). Así, 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 o TAFI (222). 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 sobre la plasmina, inhibiendo su actividad proteolítica: la α_2 -antiplasmina y la α_2 -macroglobulina.

Para una correcta hemostasia es imprescindible el equilibrio entre los factores activadores y los inhibidores de la fibrinólisis. Cuando se forma un trombo, se incorporan al coágulo el plasminógeno y el t-PA liberado por las células endoteliales cercanas. La unión simultánea de t-PA y plasminógeno a la fibrina facilita la conversión del plasminógeno en 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 tras un daño vascular. De la misma forma, el exceso de plasmina es degradado por la α_2 -antiplasmina. Así, la fibrinólisis activa queda confinada al coágulo de fibrina (Figura 15). El equilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la fibrinólisis no es un proceso estático, sino que es dinámico y variable según la situación fisiológica o patológica. Por otra parte, estrechamente en relación con este proceso se encuentran los factores de la coagulación, y las plaquetas, que acumulan gran cantidad de PAI-1 y lo liberan tras un daño vascular.

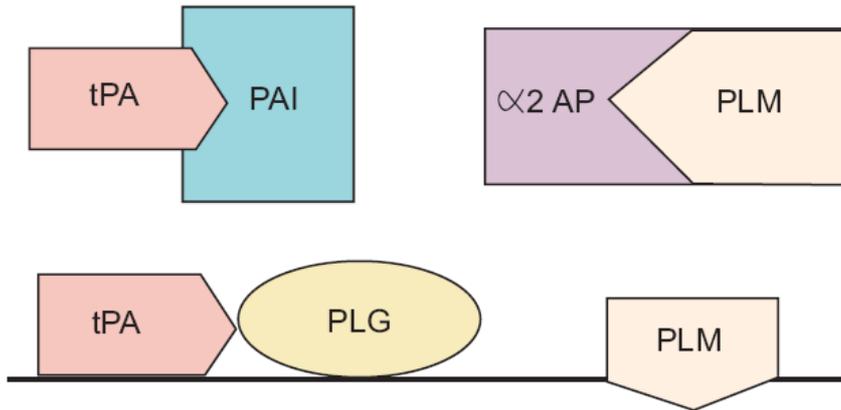


Figura 15: La fibrinólisis fisiológica. *tPA*: activador tisular del plasminógeno. *PLG*: plasminógeno. *PLM*: plasmina. *PAI*: inhibidor del activador tisular del plasminógeno. *α2AP*: α-2 antiplasmina

I.2.c.2) Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

El PAI-1 se considera el principal inhibidor de la fibrinólisis (223), bloqueando el paso de plasminógeno a plasmina. Por tanto, un aumento de los niveles de PAI-1 se traduce por una hipofibrinólisis y una predisposición a los fenómenos trombóticos (224). Por otra parte, la evidencia actual sostiene que el PAI-1 juega un papel crucial en la respuesta inflamatoria, actuando como un reactante de fase aguda (225).

El PAI-1 es una glicoproteína monocatenaria de 379 aminoácidos y 48 kDa de masa molecular que pertenece a las serpinas, superfamilia de inhibidores de serin-proteasas (Figura 16). Se identificó inicialmente en plasma (226) y células endoteliales (227), pero posteriormente se aisló a partir de otros tipos celulares, como plaquetas (228), hepatocitos (229), tejido adiposo (230) y macrófagos (231). Se desconoce cuál es la principal fuente de producción del PAI-1 plasmático en condiciones normales (232). Del total de PAI-1 intravascular, sólo el 8% circula en plasma (alrededor de 10-20 ng/mL), mientras que el 92% restante se encuentra almacenado en las plaquetas.

El PAI-1 presenta tres formas con distinta reactividad frente a los activadores del plasminógeno: la forma activa, la forma latente o inactiva, y la forma degradada. La forma activa inhibe al t-PA, formando complejos irreversibles e inactivos. La forma inactiva, más estable, es parcialmente reactivable mediante sustancias desnaturizantes como el SDS, la guanidina-HCl, y la urea, “*in vitro*”, o los fosfolípidos, “*in vivo*”. La forma degradada es inactiva y no reactivable. El PAI-1 es secretado por las células endoteliales en su forma activa, pero, tras una vida media de una hora, se convierte espontáneamente a la forma latente mediante un cambio conformacional, ocultando así su centro activo e impidiendo la unión de las serin-proteasas (233).

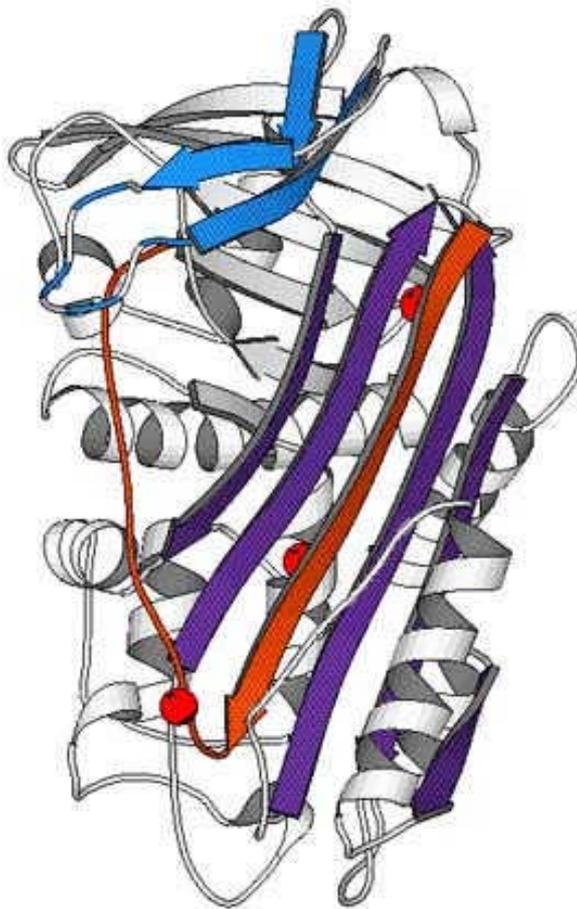


Figura 16: Estructura tridimensional de PAI-1 (modificado de Mottonen J. 1992) (234). Las espirales indican las regiones de hélices, y las flechas las regiones de hojas

I.2.c.3) Polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

El gen del PAI-1 se localiza en el cromosoma 7q21.3-q22. Se han descrito 9 polimorfismos en dicho gen, entre ellos el polimorfismo 4G/5G de su región promotora (235). Este polimorfismo consiste en la delección (4G) o la inserción (5G) de una guanina a 675 pares de bases del inicio de la transcripción. El alelo 4G tiene una secuencia de 4 guaninas y permite la unión de una proteína activadora de la transcripción perteneciente a la familia de los factores nucleares $\kappa\beta$, mientras que el 5G contiene 5 guaninas y posee un lugar adicional de unión a una proteína represora. El resultado es que, en el genotipo 4G, el gen del PAI-1 es activado libremente, mientras que en el 5G el activador ha de competir con el represor, dando lugar a una reducción relativa de la síntesis de ARNm de PAI-1. Así, el polimorfismo 4G/5G podría afectar directamente a los niveles de PAI-1 (Figura 17).

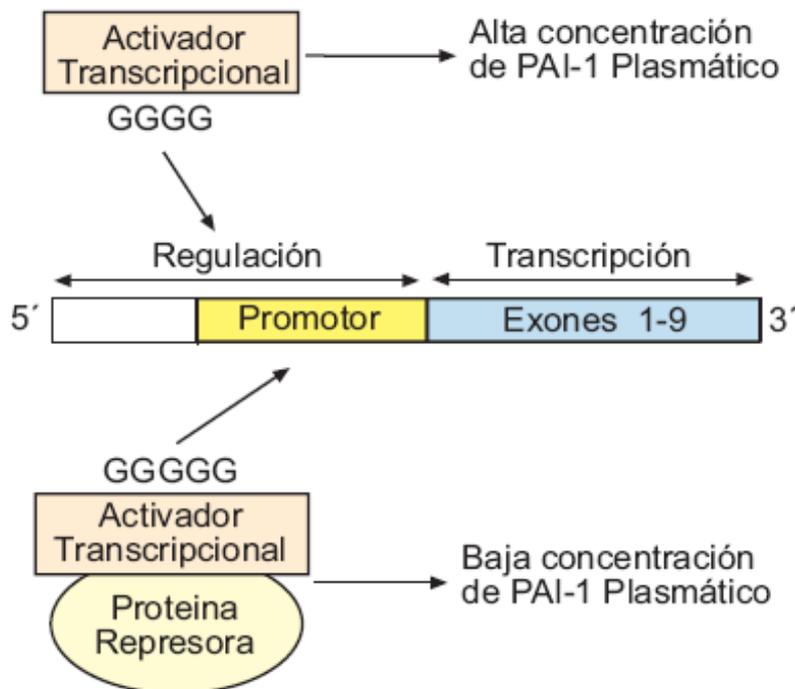


Figura 17: Gen del PAI-1 y su modulación por el polimorfismo 4G/5G. Modificado de Kohler HP. 2000 (236)

I.2.c.4) Regulación de los niveles plasmáticos de PAI-1

Diversos estudios han comprobado que los portadores homocigotos del alelo 4G poseen niveles de PAI-1 más elevados que los homocigotos del alelo 5G, mientras que los heterocigotos muestran niveles intermedios (237; 238). La relación de estos factores genéticos con los niveles de PAI-1 se ha estudiado en diversos grupos de población, como pacientes con diabetes mellitus (239), cardiopatía isquémica (240; 241), o antecedentes de trombosis venosa profunda (TVP) (242; 243). Sin embargo, algunos autores no han confirmado la relación entre el alelo 4G y los niveles elevados de PAI-1 (244; 245).

Se desconoce la contribución relativa de los factores genéticos, entre los que se encuentra el polimorfismo 4G/5G de su región promotora, sobre los niveles de PAI-1. Algunos estudios apuntan a que los factores ambientales son más importantes (246), mientras que otros dan más relevancia a los genéticos (247). La evidencia actual apunta a que, aunque el polimorfismo 4G/5G podría no influir demasiado sobre los niveles de PAI-1, modularía la influencia de los factores ambientales sobre los mismos (248).

Diversos factores ambientales se han visto implicados en la regulación de los niveles de PAI-1. Entre estos factores, se encuentran la edad y el sexo (246), el ritmo circadiano (249), el IMC (250), la actividad física (251), la menopausia (252), el uso de estrógenos (253), el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (254), el consumo de alcohol (255), la RI (255-257), y los lípidos plasmáticos. Se ha sugerido que los niveles de PAI-1 se correlacionan de forma positiva con los de colesterol LDL, colesterol VLDL y TG, y de forma negativa con los de colesterol HDL (258). La hipertrigliceridemia se asocia a incremento de los niveles de PAI-1 (259); sin embargo, el colesterol LDL sólo induce la síntesis “*in vitro*” de PAI-1 a altas concentraciones, o cuando se encuentra oxidado (260). La relación entre PAI-1 y obesidad se analizará en detalle más adelante. La Tabla 7 resume las interacciones ambientales más importantes.

Tabla 7: Resumen de los principales factores ambientales reguladores de los niveles de PAI-1. Modificado de Hoekstra T. 2.004 (261)

Factor ambiental	Efecto	Interacción con 4G/5G	Mecanismo de acción sugerido
Obesidad (central)	Niveles de PAI-1 aumentados (262)	No evidencia consistente	Aumento de producción de PAI-1 por el tejido adiposo (262), o por los hepatocitos (263)
Lípidos	Niveles de PAI-1 aumentados (258)	Interacción con triglicéridos (264)	VLDL: efecto sobre la transcripción del PAI-1 (265) LDL: mecanismo desconocido (260)
Resistencia insulínica	Niveles de PAI-1 aumentados (257)	No evidencia	Insulina y proinsulina estimulan la transcripción (266) Posible efecto de la glucosa (267)
SRAA	Asociación con niveles de ECA y con el polimorfismo del gen de la ECA	Datos limitados	La angiotensina II aumenta la producción de PAI-1
Estrógenos	Disminuyen los niveles de PAI-1	Datos limitados	Disminución en la síntesis o aumento del aclaramiento de PAI-1 Efectos en composición corporal y RI
Alcohol	Aumento en los niveles de PAI-1	No hay datos	Desconocido
Actividad física	Disminución en los niveles de PAI-1	Datos limitados	Aguda: por disminución en el aclaramiento de PAI-1 Crónica: por efectos sobre el peso y los lípidos plasmáticos
Ritmo circadiano	Pico de 00h a 6ham	Más pronunciado en genotipo 4G/4G	Mediado por CLIF
Respuesta de fase aguda	Fuerte efecto positivo sobre los niveles de PAI-1	Respuesta más fuerte para alelo 4G	Estímulo de la transcripción por IL-1, TNF- α y TGF- β

ARN: ácido ribonucleico mensajero; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; CLIF: cycle-like-factor

I.3.d. Asociación de la hemorreología, la hemostasia y la fibrinólisis con fenómenos trombóticos

La formación de un coágulo obstructivo en venas o arterias es el producto final de un desbalance entre factores procoagulantes, fibrinolíticos y anticoagulantes. La trombosis puede ocurrir en arterias o en venas. En el siglo XIX, Virchow postuló las tres causas principales de trombosis: cambios en la pared vascular, cambios en el flujo sanguíneo, y cambios en la composición de la sangre. Sin embargo, estos factores no tienen el mismo peso en las trombosis venosas y en las arteriales, lo que explica que los mecanismos responsables de éstas se superpongan pero sean diferentes. En las trombosis arteriales, los cambios en la pared del vaso (arteriosclerosis) y los factores de riesgo cardiovascular (tabaco, diabetes, hipertensión arterial, hiperlipemia) son los principales. Dada la elevada presión y el elevado flujo sanguíneo arterial, el papel de la estasis sanguínea y de la hipercoagulabilidad es relativamente menor. Sin embargo, éstos últimos constituyen los principales factores de riesgo para la trombosis venosa, y por el contrario los factores de riesgo aterogénico clásicos no parecen predisponer a la misma (268).

I.3.d.1) Asociación con trombosis arterial

Hemorreología

La contribución del Fbg al proceso arteriosclerótico no está aún claramente establecida. Podría contribuir al mayor riesgo cardiovascular, o, como reactante de fase aguda, podría ser sólo un marcador del proceso inflamatorio subyacente a la arteriosclerosis (161).

Diversos estudios epidemiológicos realizados en Suecia (269), Reino Unido (270-272), Alemania (273) y Estado Unidos (274) han investigado la

asociación entre los niveles de Fbg y la enfermedad cardiovascular. Un metaanálisis de seis de estos 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 (160). El estudio Framingham es el único que incluyó a mujeres en su análisis y que estudió la enfermedad cardiovascular en todas sus manifestaciones (275). Los resultados de este estudio mostraron 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 un 20% en ambos sexos, tras ajustar por edad y por otros factores de riesgo cardiovascular. En el estudio ECAT, los niveles de Fbg se identificaron como predictores independientes de infarto de miocardio y muerte súbita coronaria en pacientes con angina de pecho (276). Un metaanálisis de 18 estudios prospectivos publicado en 1.998 concluyó que los individuos con valores de Fbg en el tercil superior presentan un riesgo de enfermedad coronaria 1,8 veces superior que los individuos con valores en el tercil inferior (108). Otros metaanálisis han encontrado resultados similares (277), con 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, algunos autores han observado que estas asociaciones se atenúan mucho al corregir por los posibles factores confundientes (278).

Una parte considerable de la relación del Fbg con la incidencia de eventos cardiovasculares podría atribuirse a sus efectos sobre la VP. En la década de los 90, un estudio prospectivo mostró que la VP era un importante predictor de cardiopatía isquémica en hombres de mediana edad (279), independiente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos. Esta asociación entre VP e incidencia de cardiopatía isquémica se explicaría en parte por el Fbg (280). El análisis de los mismos sujetos 10 años después, recientemente publicado, ha confirmado el valor predictivo de la VP para cardiopatía isquémica (281). Otros dos estudios prospectivos han mostrado la asociación de la VP con la incidencia de cardiopatía isquémica y de accidente

cerebrovascular en hombres y mujeres añosos (282), y con la recurrencia del accidente cerebrovascular (283). El estudio prospectivo MONICA, realizado en hombres de 45 a 64 años, mostró igualmente que la VP se asociaba de forma positiva e independiente a un primer episodio de cardiopatía isquémica, tras ajustar por los demás factores de riesgo cardiovascular (280; 284). Un metaanálisis de 4 estudios prospectivos realizados en población general publicado en el año 2.000 concluyó que los individuos con valores de VP en el tercil superior presentan un riesgo de enfermedad coronaria 1,57 veces superior que los individuos con valores en el tercil inferior (285).

Se han descrito diversos mecanismos a través de los cuales una disminución de la DE puede potenciar el desarrollo de fenómenos aterotrombóticos. A nivel de la microcirculación, puede dar lugar a isquemia por alteraciones del flujo capilar y por favorecer la hipoxia en áreas ateromatosas en desarrollo (286). A nivel de la macrocirculación, se ha descrito que la disminución de la DE produce un incremento de la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular (287), a la vez que causa un aumento de la VS a alta velocidad de cizallamiento. La relación entre las alteraciones de la DE y la patología isquémica es clara en situaciones como hemoglobinopatía S o la talasemia *maior*. Fuera de estas patologías, existe controversia acerca de su papel como factor de riesgo en patología vascular isquémica (288; 289): aunque se ha observado una disminución de la DE asociada a patología isquémica, fundamentalmente en la claudicación intermitente, pero también en patología isquémica cardíaca y cerebral, los estudios han sido retrospectivos, no existiendo estudios prospectivos que confirmen esta posible asociación.

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. Se ha sugerido que dicho incremento puede ejercer una influencia indirecta en la formación del trombo arterial, a través de su interacción con las plaquetas. Asimismo, el desplazamiento de los demás elementos celulares hacia el endotelio vascular es

otro mecanismo propuesto en este sentido. No existen estudios prospectivos que analicen la relación de la AE con la incidencia de patología vascular isquémica, aunque varios estudios observacionales han encontrado una hiperagregabilidad eritrocitaria en pacientes con procesos isquémicos cardíacos o cerebrales (290-293).

La VS también se ha asociado en algunos estudios a arteriosclerosis. Estudios transversales han descrito en hombres una asociación independiente de la VS con la presencia de arteriopatía periférica (294), y con marcadores más precoces de arteriosclerosis, como el engrosamiento íntima-media carotídeo (109). En un estudio prospectivo, se demostró la asociación entre la VS y la incidencia de cardiopatía isquémica y de accidente cerebrovascular en hombres y mujeres añosos (282). Otro estudio prospectivo realizado en el año 2.000 en hombres con hipercolesterolemia mostró una asociación independiente tanto de la VS como de la VP, con la incidencia de cardiopatía isquémica (295). Sin embargo, otros autores no han encontrado que la VS sea un factor de riesgo cardiovascular independiente, sino un marcador de riesgo de enfermedad coronaria asociado a los factores de riesgo clásicos (296). Un metaanálisis de 2 estudios prospectivos realizados en población general publicado en el año 2.000 concluyó que los individuos con valores de VS en el tercil superior presentan un riesgo de enfermedad coronaria 1,24 veces superior que los individuos con valores en el tercil inferior (285).

Hemostasia

El balance alterado de los factores procoagulantes y anticoagulantes juega sin duda un importante papel en la enfermedad coronaria (271; 276) y cerebrovascular (297; 298). La evidencia de una relación entre las concentraciones plasmáticas de factor VII y la enfermedad cardiovascular no está tan establecida como para el Fbg. Algunos estudios prospectivos han mostrado asociación entre los niveles elevados de factor VII y los eventos

cardiovasculares (270; 271; 299), pero otros autores no apoyan esta asociación (300). Varios estudios prospectivos han mostrado igualmente una asociación entre los niveles de factor VIII y los de factor Von Willebrand, y el riesgo de enfermedad cardiovascular (300-304).

La alteración de los inhibidores de la coagulación también se ha propuesto como mecanismo protrombótico. Algunos estudios han sugerido que la R-PCa de causa genética (factor V Leiden) puede ser un factor de riesgo para trombosis arterial (305; 306), aunque otros autores no han encontrado evidencias que apoyen esta afirmación (307-310). Uno de estos trabajos incluyó a pacientes con R-PCa y sin factor V Leiden, encontrando una asociación entre la R-PCa y el riesgo de enfermedad cerebrovascular independiente de la mutación del factor V (311). En dicho estudio, la R-PCa no se asoció a enfermedad coronaria.

Se ha descrito que niveles reducidos de PCa circulante pueden ser un factor de riesgo de infarto de miocardio (312). Estos niveles reducidos de PCa pueden deberse a una alteración de cualquiera de los componentes del sistema de activación de la PC (206).

Fibrinólisis

Numerosos estudios transversales y caso-control han demostrado que los niveles de PAI-1 están aumentados en pacientes con enfermedad cardiovascular (236; 314). Los estudios prospectivos han mostrado generalmente que los niveles de PAI-1 predicen la aparición de recurrencias de eventos coronarios en población con enfermedad cardiovascular (315-317), aunque no todos han confirmado esta relación (276; 318; 319). Sin embargo, los estudios prospectivos realizados en población sana han mostrado resultados discrepantes. En la mayoría de ellos, no se ha logrado demostrar una

asociación entre los niveles plasmáticos de PAI-1 y la aparición de un primer evento coronario (320-322). En los escasos estudios en los que los niveles de PAI-1 se han asociado al riesgo de eventos coronarios en población sana, la fuerza de dicha asociación ha disminuido mucho tras ajustar por los factores de riesgo cardiovascular asociados a la RI (300; 323; 324). De forma similar, se han observado niveles elevados de PAI-1 (325) en pacientes con enfermedad cerebrovascular (365; 377; 378), pero tampoco se ha logrado demostrar la asociación entre los niveles de PAI-1 y la incidencia de un primer episodio de accidente cerebrovascular (326).

Se ha sugerido la existencia de una asociación entre el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y el riesgo de cardiopatía isquémica. Un metaanálisis de nueve estudios caso-control mostró un modesto incremento del riesgo de infarto agudo de miocardio para el genotipo 4G/4G (327). Dos estudios posteriores han confirmado esta asociación en mujeres (328) y en pacientes con hiperinsulinismo (329). Sin embargo, otros trabajos han obtenido resultados diferentes (244; 330-333). Respecto al accidente cerebrovascular, los datos son contradictorios, habiendo autores que defienden un efecto protector del alelo 4G (334), mientras que otros encuentran un incremento del riesgo asociado a dicho alelo (335).

Los niveles elevados de PAI-1 también se han relacionado con la aparición de diabetes mellitus. En el estudio IRAS (*“Insulin Resistance Atherosclerosis Study”*), la concentración plasmática de PAI-1 fue un buen predictor de la aparición de diabetes mellitus tipo 2, incluso tras ajustar por IMC o RI (113).

Dado que el t-PA es el principal activador de la fibrinólisis, se esperaría encontrar una asociación de sus niveles con una menor incidencia de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, el aumento de los niveles de t-PA es fundamentalmente un marcador de daño endotelial *in vivo* (336), y por tanto de activación de la coagulación, y por ello se encuentra una asociación entre los

niveles elevados de t-PA y el riesgo de enfermedad cardiovascular. De hecho, los niveles elevados de t-PA se han asociado a enfermedad cardiovascular con más consistencia que los de PAI-1 (337). Un metaanálisis reciente analizó 7 estudios prospectivos realizados en población general y 6 estudios realizados en población con enfermedad cardiovascular establecida (322). Concluyó que, en población general, los individuos con valores de t-PA en el tercil superior presentaron un riesgo de enfermedad coronaria 1,47 veces superior a los individuos con valores de t-PA en el tercil inferior, tras ajustar por edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular. De igual forma, en población con enfermedad cardiovascular establecida, este aumento del riesgo fue de 1,32.

I.3.d.2) Asociación con trombosis venosa

Hemorreología

Virchow fue el primero en enfatizar el papel de la hemorreología en la patogenia de la TVP (338). La VS elevada es un factor de riesgo establecido para TVP (339). 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 caso-control, y muchos de ellos con un número pequeño de pacientes (340; 341), por lo que no hay suficiente evidencia en el momento actual para afirmar que las alteraciones hemorreológicas diferentes al aumento de la VS constituyen un factor de riesgo independiente para TVP.

Varios autores han encontrado que la AE se encuentra aumentada 6 semanas después de una TVP (342), momento en el que todavía existe un aumento temporal de los niveles de Fbg, como reactante de fase aguda, con las consecuentes alteraciones reológicas (343). Otros autores han realizado el estudio 12 meses tras el evento trombótico venoso (340; 344), pero no siempre han excluido a pacientes con enfermedades neoplásicas, que pueden por sí mismas elevar los niveles de Fbg, y así alterar diversos parámetros reológicos.

Otros autores han encontrado un aumento de la AE 28 meses después del evento trombótico (345).

El Fbg se ha visto aumentado en todos los estudios realizados hasta el momento en pacientes con TVP, tanto a las 6 semanas del evento trombótico (342), como a los 12 meses (340; 341; 344; 346) o 28 meses del mismo (345). Un estudio caso-control realizado en 199 pacientes con TVP comparados con un grupo control concluyó que el riesgo de TVP era cuatro veces superior en los pacientes con niveles de Fbg superiores a 500 mg/dL (347).

Los estudios de VP en pacientes con TVP han mostrado resultados discrepantes: ciertos autores la han determinado a los 3 meses del evento trombótico, encontrándola elevada, y otros la han encontrado normal a los 12 meses o 36 meses del mismo (341; 344; 346).

Por tanto, por el momento, los datos que relacionan los factores hemorreológicos con la TVP son limitados.

Hemostasia

Ciertas situaciones de hipercoagulabilidad se han descrito asimismo como factores de riesgo de TVP. Entre las genéticas, destacan la R-PCa por factor V Leiden (213), los déficits de antitrombina (348), PC (349) y PS (350), y la mutación G20120A del gen de la protrombina (351). Otras causas son los niveles elevados de factor VIII (352; 353), factor IX (354) y factor XI (355).

La R-PCa adquirida es una importante causa de TVP. Un estudio poblacional mostró que el riesgo de TVP en pacientes con R-PCa y ausencia de factor V Leiden doblaba el de los individuos sin R-PCa (356). En el “*Leiden Thrombophilia Study*”, se apreció igualmente una relación lineal entre R-PCa adquirida y riesgo de TVP (357). Se acepta en la actualidad que, de cada 10 pacientes no seleccionados con TVP, uno presenta R-PCa adquirida (351). De

igual forma, se considera una importante causa de trombosis venosa en el puerperio (358). Asimismo, niveles reducidos de PCa circulante se han asociado con una mayor incidencia de tromboembolismo venoso (313).

Fibrinólisis

Se ha descrito la presencia de hipofibrinólisis en pacientes con TVP (359-361), debida en general a un aumento de los niveles de PAI-1 (362), aunque los estudios prospectivos al respecto son muy escasos. Uno de estos estudios no encontró que los niveles de PAI-1 o de t-PA predijeran el desarrollo de TVP en personas sanas (363). Se ha demostrado que los pacientes con hipofibrinólisis (364) o con niveles elevados de PAI-1 (224) presentan más recurrencias de TVP.

El alelo 4G del gen del PAI-1 se ha asociado asimismo a trombosis venosa (365; 366), aunque algunos autores sólo han comprobado esta asociación en pacientes con algún otro defecto trombofílico asociado (243).

Por tanto, la asociación entre aumento de PAI-1 y trombosis venosa no es consistente, y requiere más estudios (367).

I.3. LA OBESIDAD COMO ESTADO PROTROMBÓTICO

Se ha demostrado que la obesidad es un factor de riesgo cardiovascular tanto en hombres (368) como en mujeres (369), como reconoció en 1.998 la “*American Heart Association*” (370). Los factores de riesgo cardiovascular clásicos asociados a la obesidad (dislipemia, hipertensión arterial, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y consumo de tabaco) no pueden explicar por sí solos todo el exceso de eventos cardiovasculares que presentan estos pacientes. El estudio Framingham ya mostró en la década de los 80 que la incidencia de cardiopatía isquémica era proporcional al exceso de peso (156): en hombres y mujeres obesos menores de 50 años, se multiplicaba por 2,4 y por 2, respectivamente. El riesgo de muerte por cardiopatía isquémica es tres veces superior en los sujetos obesos que en los sujetos con normopeso (371). Asimismo, el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico se incrementa de forma paralela al IMC, siendo doble en los individuos con obesidad (372) comparados con los individuos con normopeso.

Por otra parte, varios estudios han evidenciado la asociación entre obesidad y tromboembolismo venoso (373; 374), considerándose a la misma un factor de riesgo para TVP o tromboembolismo pulmonar (375). Un estudio multicéntrico caso-control mostró que los pacientes obesos no hospitalizados tenían un riesgo de TVP 2,4 veces superior a los sujetos sin obesidad (376). Otro estudio caso-control encontró resultados similares, con una “*odds ratio*” para TVP en pacientes obesos de 2,49 (377). Un estudio prospectivo realizado en hombres de edad media clasificados en función de los quintiles de circunferencia de cintura evidenció que aquellos situados en el quintil superior presentaban un riesgo relativo de TVP de 2,6 (378). Otro estudio prospectivo, el estudio LITE (“*Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology*”), obtuvo un riesgo relativo de tromboembolismo venoso de 2,2 para los pacientes con IMC entre 30 y 35 kg/m², comparados con aquellos con IMC menor de 25 kg/m² (379). Otros trabajos han mostrado la asociación de IMC con TVP en pacientes diabéticos (380), en pacientes con trombosis venosa

cerebral (381), y en aquellos sometidos a cirugía ortopédica (382). Un estudio reciente caso-control realizado en 454 pacientes con TVP confirmó que los pacientes con obesidad presentan un riesgo doble de tromboembolismo que el grupo control, siendo dicho riesgo 10 veces mayor en las mujeres de 15 a 45 años con IMC superior a 25 kg/m² que consumen anticonceptivos orales (383). Así, los diferentes estudios sugieren que la obesidad constituye un factor de riesgo independiente para TVP, con un riesgo relativo entre 2 y 3. Asimismo, estudios recientes han demostrado que en pacientes con TVP, el IMC se asocia de forma significativa con un mayor desarrollo de complicaciones de la TVP como el embolismo pulmonar (384; 385) o el síndrome postflebítico (386).

Los mecanismos a través de los cuales la obesidad predispone de forma independiente a las complicaciones trombóticas tanto arteriales como venosas se desconocen. El incremento de riesgo cardiovascular y de tromboembolismo venoso asociados a la obesidad podría estar en parte mediado por alteraciones en los factores hemorreológicos, fibrinolíticos y de hipercoagulabilidad (256).

I.3.a. Obesidad y alteraciones hemorreológicas

Hay resultados discordantes acerca de la asociación entre la obesidad y los factores hemorreológicos. De los diversos trabajos publicados al respecto, sólo algunos han sido realizados con pacientes con obesidad mórbida. Por otra parte, la mayoría de estos estudios se han realizado en pacientes con obesidad y otros factores asociados, como diabetes, dislipemia o hipertensión arterial, factores que alteran las propiedades reológicas de la sangre, de manera que queda por establecer si las alteraciones encontradas se deben a la obesidad “*per se*” o a los factores asociados a la misma.

I.3.a.1) Alteraciones hemorreológicas presentes en la obesidad

Fibrinógeno

Diversos estudios que han comparado los niveles plasmáticos de Fbg en sujetos obesos y en sujetos con normopeso han encontrado concentraciones significativamente mayores en los primeros (387-389). Otros trabajos han analizado el papel de la distribución grasa sobre el aumento en los niveles de Fbg en sujetos obesos, utilizando el icc, y han observado mayores niveles de Fbg en sujetos con obesidad central comparados con sujetos con obesidad periférica (390; 391). Se ha demostrado igualmente una correlación entre el Fbg y el icc o la cintura (391; 392). Por otra parte, un estudio epidemiológico reciente demostró que el Fbg se asociaba más con los marcadores de inflamación que con la actividad procoagulante, sugiriendo que éste puede reflejar la inflamación subyacente en estos pacientes más que su potencial procoagulante (393).

En resumen, se acepta que el Fbg se encuentra aumentado en la obesidad, principalmente en la obesidad central, pero no está establecido si estas relaciones son causales, dado que el Fbg, además de parte integral del sistema hemostático, es un reactante de fase aguda (161).

Viscosidad plasmática

La mayoría de los estudios encuentran un aumento de la VP en los pacientes con obesidad (394; 395). Sin embargo, algunos autores atribuyen esta asociación a la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular (396). Existen muy pocos datos acerca del estado de la VP en adultos con obesidad mórbida, dado que la mayoría de los trabajos se han realizado en población pediátrica (389; 397-400), o en adultos con sobrepeso y obesidad grados I y II (387; 399; 401-406).

Deformabilidad eritrocitaria

La mayor disparidad de resultados respecto a los parámetros reológicos en el paciente obeso es la relacionada con la DE. Diversos autores observan una disminución de la misma en pacientes obesos (402; 405; 407; 408), mientras que otros la encuentran normal (395; 406; 409). Los estudios en niños y adolescentes con obesidad también han arrojado resultados contradictorios (389; 398; 399).

Agregación eritrocitaria

También hay cierta unanimidad en la literatura al asociar obesidad e hiperagregabilidad eritrocitaria (295; 389; 394; 397; 401; 405; 407; 410). Los diversos estudios han valorado fundamentalmente el índice de agregabilidad, y sólo dos han valorado la velocidad de cizallamiento sanguíneo (“*shear rate*”) necesaria para poder romper los agregados eritrocitarios (405; 408), velocidad que será mayor cuanto mayor sea la cohesión de los mismos, lo que supone un importante conocimiento adicional de las características de los agregados, y, por tanto, de su capacidad para favorecer la formación del trombo.

Composición de la membrana eritrocitaria

Se han publicado diversos trabajos acerca de las modificaciones de la composición lipídica de la membrana eritrocitaria en el paciente obeso. Algunos autores han encontrado que los pacientes obesos presentan un aumento del cociente colesterol/fosfolípidos de la membrana eritrocitaria (411-415). De todos estos trabajos, sólo uno ha sido realizado en pacientes con obesidad mórbida (414), estando el resto de los mismos realizados en pacientes con sobrepeso u obesidad grados I o II. Por otra parte, ciertos autores han encontrado una relación entre los marcadores de RI y la cantidad de esfingomielina de la bicapa eritrocitaria en mujeres con obesidad (416; 417).

Un aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria puede inducir un estado protrombótico, activando los factores V y X, y produciendo una situación de hipercoagulabilidad (418; 419). Un posible mecanismo mediante el cual la obesidad podría predisponer a los fenómenos trombóticos sería mediante el aumento en la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa de la membrana eritrocitaria. Sólo hemos encontrado un trabajo que haya valorado este aspecto en pacientes con obesidad, sin encontrar un aumento de la expresión de la FS en la hoja externa de la membrana de los hematíes del paciente obeso (420).

Viscosidad sanguínea

De forma similar a lo que ocurre con la VP, algunos autores han encontrado una asociación entre obesidad e hiperviscosidad sanguínea, pero los estudios se han realizado en niños (389; 398; 399), o en adultos con sobrepeso u obesidad grados I o II (387; 395; 400-403; 406; 409).

I.3.a.2) Efecto de la pérdida de peso sobre las alteraciones hemorreológicas presentes en la obesidad

Fibrinógeno

El efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de Fbg plasmático es controvertido. Ciertos estudios muestran un efecto beneficioso de la pérdida de peso sobre los niveles de Fbg (389; 392; 421; 422), mientras que otros no lo han observado (387; 423-425). En uno de los estudios que no evidenció mejoría del Fbg con la pérdida de peso, el análisis del subgrupo de pacientes más obesos mostró una reducción significativa de los niveles de Fbg, correlacionada con la pérdida de peso. Este subgrupo de pacientes tenía valores inicialmente mayores de Fbg que el grupo en su conjunto, y su pérdida

de peso fue mayor. Otros estudios han mostrado igualmente una correlación entre la disminución de peso, la de cintura y la de los niveles de Fbg (422).

La Tabla 8 resume los principales estudios realizados para valorar la influencia de la pérdida de peso en los niveles de Fbg en pacientes con obesidad.

Viscosidad plasmática

Los efectos de la disminución ponderal sobre la VP han sido discordantes, puesto que en algunos trabajos no se modifica dicho parámetro (127; 384; 387; 399; 400; 403; 426), mientras que, en otros, la VP disminuye con la pérdida ponderal (389; 394). Uno de estos estudios se realizó con VLCD mantenida durante tres meses (394). La disminución de la VP encontrada tras dicho periodo no podría en principio atribuirse a modificaciones en los valores de Fbg, ya que éstos no se modificaron tras la pérdida de peso, pudiendo estar en relación con una mejoría cuantitativa y cualitativa de los lípidos plasmáticos.

Deformabilidad eritrocitaria

Tampoco hay homogeneidad en la literatura revisada acerca de los efectos de la pérdida de peso sobre la DE. Ciertos autores encuentran que empeora (426), mientras que en otros estudios no se modifica (127; 389; 399; 407). Un trabajo mostró mejoría de la DE con la pérdida de peso obtenida por VLCD (384), que los autores atribuyeron al hipoinsulinismo asociado a esta dieta, dado que la insulina en concentraciones fisiológicas mejora la DE (288).

Tabla 8: Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de fibrinógeno en pacientes con obesidad. Modificado de Mertens 2002 (161)

Autores	Sujetos	IMC o peso medio	Intervención	Duración	Cambio de peso	Cambio de Fbg
Rillaerts et al (387)	20	32,8 kg/m ²	LCD	6 meses	-5,5 kg/m ²	NS
Slabber et al (424)	9	32,7 kg/m ²	VLCD	7 días	-4,4%	NS
Primrose et al (421)	19	154 kg	Gastroplastia	12 meses	-41,6%	-20% *
Fanari et al (389)	20 adolescentes	H: 36,1 kg/m ² M: 36,7 kg/m ²	LCD	1 mes	H: -11,6% M: -12%	-30,1% *
Folsom et al (425)	178	31 kg/m ²	LCD + ejercicio	6 meses	- 8,4 kg &	NS
Ditschuneit et al (392)	60 Subgrupo: 20	H: 43,7 kg/m ² M: 39,9 kg/m ² Subgrupo: 50,6 kg/m ²	LCD	9,5 ± 6,2 m	H: -12,2% M: -15,3% Subgrupo: -14,3%	NS Subgrupo: -9% ***
Svendesen et al (423)	118	25 a 42 kg/m ²	LCD ± ejercicio	9 meses	-8 kg	-3,6% **
Hankey et al (403)	45	H: 38,5 kg/m ² M: 34,1 kg/m ²	LCD	12 semanas	H: -5% M: -4,7%	NS
Marckmann et al (422)	36	35,5 kg/m ²	1) VLCD o LCD 2) Mantenimiento	1) 8-17 semanas 2) 24 semanas	1) -13,9% 2) -14,5%	2) -6% **
Luyckx et al (427)	505	42,3 kg/m ²	Gastroplastia	6 meses	-27,4%	- 11,1% *
Lindahl et al (428)	186 con ITG	31 kg/m ²	LCD + ejercicio	12 meses	-5,7% &	-0,35 g/L ****
Rissanen et al (429)	51	36,2 kg/m ²	LCD ± orlistat	12 meses	-10,4%	NS
Mavri et al (430)	30	30,6 kg/m ²	LCD + ejercicio	3 meses	- 17,2%	NS

NS : no significativo. *: p<0,05. **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001. Los valores son cambios porcentuales respecto a valores basales, excepto indicados con &: cambios netos respecto a grupo control. H: hombres. M: mujeres. VLCD: dieta de muy bajo contenido calórico. LCD: dieta hipocalórica. ITG: intolerancia hidrocarbonada

Agregación eritrocitaria

Tampoco está establecido el efecto de la disminución ponderal sobre la AE. Ciertos estudios muestran que mejora (389; 394; 403), en otros no se modifica (127), y en un estudio realizado en 101 pacientes obesos adultos de ambos sexos (IMC $36,2 \pm 1,2 \text{ kg/m}^2$) se observa un incremento de la misma tras 4 días de VLCD (407), empeorando por tanto a corto plazo el perfil hemorreológico del paciente tras seguir este tipo de dieta.

Composición de la membrana eritrocitaria

Respecto al efecto de la disminución ponderal sobre la composición de la membrana del hematíe, se han publicado únicamente dos estudios, con resultados discordantes: uno de ellos realizado en pacientes con obesidad mórbida sometidos a 10 días de ayuno, con una pérdida de peso significativa, sin encontrarse mejoría en la fluidez de membrana (431), y otro en mujeres obesas con IMC medio de $32,5 \text{ kg/m}^2$, que encuentra mejoría de la fluidez en el subgrupo de pacientes obesas con RI (412). No hemos encontrado en la literatura ningún estudio que haga referencia a las posibles modificaciones de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa del hematíe en el paciente obeso tras la pérdida ponderal.

Viscosidad sanguínea

También se encuentran resultados discordantes al estudiar el efecto de la pérdida ponderal sobre la VS. Así, algunos autores encuentran que disminuye (127; 384; 387; 400), mientras que en otros estudios no se observa modificación de la misma (389; 399; 403). Un estudio realizado en 10 mujeres obesas mostró de forma sorprendente un aumento de la VS tras someter a dichas mujeres a 3 días de VLCD (426), con empeoramiento del perfil

hemorreológico de estos pacientes. Los autores atribuyeron este aumento en la VS a la disminución en la DE que también se observó en dicho estudio.

La Tabla 9 resume los principales estudios realizados para valorar la influencia de la pérdida de peso sobre los parámetros hemorreológicos en pacientes con obesidad.

Tabla 9: Efecto de la pérdida de peso sobre los parámetros hemorreológicos en pacientes con obesidad

Autores	Sujetos	IMC o peso medio	Intervención	Duración	Cambio de peso	Cambios hemorreológicos
Rillaerts et al (387)	20	32,8 kg/m ²	LCD	6 meses	-5,5 kg/m ²	VP: NS; VS: - 5,5% * a bajo “shear”, - 2% * a alto “shear”
Craveri et al (400)	40	36 kg/m ²	LCD	12 meses	-13,9%	VP: NS VS: -31,6% * a bajo “shear”, NS a alto “shear”
Craveri et al (399)	25 niños	Exceso de peso 46 %	LCD	2 meses	- 16 kg	VP, VS, DE : NS
Fanari et al (389)	20 adolescentes	H: 36,1 kg/m ² M: 36,7 kg/m ²	LCD	1 mes	H: -11,6% M: -12%	VP: - 4,6% * ; AE : - 51% ** VS, DE : NS
Poggi et al (394)	52	H: 39,1 kg/m ² M: 36,9 kg/m ²	VLCD	12 semanas	- 15,5%	VP: - 3,6% *** AE: - 16,3% ***
Tozzi et al (127)	20 niños	Exceso de peso >20%	LCD + ejercicio	12 meses	-6,5%	VP, AE, DE: NS VS: -50% *** a bajo y alto “shear”
Valensi et al (407)	42	35,8 kg/m ²	VLCD	4 días		AE: + 14,6% ***, DE: NS
Hankey et al (403)	45	H: 38,5 kg/m ² M: 34,1 kg/m ²	LCD	12 semanas	H: -5% M: -4,7%	VP, VS (alto “shear”): NS AE: - 13,6% * en M, NS en H
Peyreigne et al (426)	10	26 kg/m ²	VLCD	3 días	-2,6%	VP: NS VS: + 9% * (alto “shear”), DE: - 9% *

NS : no significativo. *: p<0,05. **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001. Los valores son cambios porcentuales respecto a valores basales, excepto indicados con &: cambios netos respecto a grupo control. H: hombres. M: mujeres. VLCD: dieta de muy bajo contenido calórico. LCD: dieta hipocalórica

I.3.b. Obesidad e hipercoagulabilidad

Otro factor implicado en la génesis de fenómenos tromboembólicos en el paciente obeso es la hipercoagulabilidad sanguínea (432), determinada por un desbalance entre los factores activadores de la coagulación y los factores inhibidores de la misma.

Entre las causas de hipercoagulabilidad, se encuentra el aumento de ciertos factores de la coagulación. La mayoría de los estudios que han investigado la relación entre el factor VII y la obesidad han encontrado niveles elevados de factor VII en sujetos con sobrepeso y obesidad (388), existiendo una asociación entre el factor VII y el IMC (385; 433-437). Otros estudios han mostrado una correlación positiva entre el IMC y el factor VIII o el factor von Willebrand (437; 438). Asimismo, diversos estudios han mostrado una asociación entre el SM y el aumento de los factores VII, VIII, von Willebrand, IX, X y XIII (393; 438-440).

Sin embargo, el estado de los inhibidores de la coagulación ha sido menos valorado en el paciente obeso. Recientemente, se ha propuesto que la obesidad podría ser causa de R-PCa adquirida, lo que contribuiría al estado protrombótico de estos pacientes. El proyecto VITA (*“Vicenza Thrombophilia and Atherosclerosis Project”*) es un estudio epidemiológico realizado para establecer la prevalencia de alteraciones genéticas causantes de trombofilia (441). En un subgrupo de 4.000 pacientes de este estudio, se investigó la relación entre R-PCa e IMC (442), encontrándose una correlación positiva entre ambas variables, independiente de la presencia de factor V Leiden. Un trabajo posterior realizado por Lowe y cols con 955 pacientes encontró asimismo una asociación entre R-PCa e IMC en mujeres, pero no en hombres (443). Además, al dividir a los pacientes en función de la presencia o ausencia de obesidad, dicho autor encontró más R-PCa en los sujetos obesos comparados con los sujetos con normopeso. Sin embargo, otros estudios no han confirmado esta asociación entre IMC y R-PCa (311; 444). Un trabajo

realizado en mujeres con sobrepeso y obesidad y tolerancia normal a la glucosa ha demostrado que aquellas con historia familiar de diabetes mellitus tipo 2 presentan mayor R-PCa (445). No se han encontrado en la literatura revisada estudios que hagan referencia a la influencia de la pérdida de peso sobre la R-PCa.

Como se ha expuesto previamente, para que se produzca una adecuada activación de la PC, se deben ensamblar perfectamente las moléculas de PC, trombina, trombomodulina y EPCR, formando un complejo cuaternario sobre la superficie de la célula endotelial. Una disfunción endotelial puede producir una reducción de los niveles de trombomodulina y EPCR en la membrana de la célula endotelial, con la consiguiente reducción en la activación de la PC. Este mecanismo ha sido descrito en la insuficiencia renal crónica (212). La obesidad mórbida se asocia a disfunción endotelial (132; 133). Dicha disfunción endotelial podría causar una alteración en la generación de PCa. Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura revisada estudios que hagan referencia al estado de los niveles de PCa en los pacientes con obesidad.

I.3.c. Obesidad e hipofibrinólisis

I.3.c.1) Obesidad, PAI-1, y resistencia a la insulina

En los últimos quince años se ha acumulado abundante evidencia de estudios clínicos acerca de la asociación entre obesidad e hipofibrinólisis (446), debida a un incremento de los niveles plasmáticos de PAI-1 (390). Un estudio realizado en población general (250) observó que el IMC y los niveles de TG eran los principales predictores de los niveles de PAI-1, siendo responsables de hasta el 20% de la variabilidad interindividual de dichos niveles. En diversos trabajos, se ha propuesto que tras estas relaciones subyace la RI, considerada actualmente uno de los principales reguladores del PAI-1

(246); de hecho, el aumento de PAI-1 se considera en la actualidad un componente más del SM (447-450).

El aumento del PAI-1 en la obesidad es particularmente evidente en sujetos con distribución androide de la grasa (451), estando asociados sus niveles con la cintura (437), el icc (396), o la medición de la grasa visceral por técnicas de imagen (452). Por ello, se apunta al tejido graso visceral como puente de unión entre el aumento del PAI-1 y la obesidad o el SM (453). Sin embargo, se desconoce si el aumento de PAI-1 en la obesidad se debe a un aumento de su producción a nivel de tejido adiposo, o a nivel hepático. Se ha evidenciado la producción de PAI-1 por el tejido adiposo (230), y datos recientes sugieren que podría sintetizarse en las células estromales de este tejido, entre las que se encuentran células endoteliales, musculares lisas y macrófagos, y no en los adipocitos (454). Así, ciertos autores defienden que el exceso de PAI-1 presente en los pacientes obesos se sintetizaría a nivel del tejido adiposo (102). De hecho, se ha demostrado que el tejido adiposo de los sujetos obesos produce más cantidad de PAI-1 que el de los sujetos con normopeso (455). La mayoría de los estudios “*in vitro*” muestran una producción de PAI-1 mayor a nivel de la grasa visceral que a nivel de la grasa subcutánea (454; 456), lo que podría explicarse por el mayor contenido en células estromales de la primera. Pero no todos los autores han confirmado este dato (457), incluso un estudio reciente ha encontrado mayor secreción de PAI-1 por el tejido adiposo subcutáneo (458). Por el contrario, otros autores sugieren que el aumento de los niveles de PAI-1 en la obesidad podría originarse a nivel hepático, por estímulo directo de la insulina a este nivel (459). Estudios recientes *in vitro* tampoco han confirmado que el origen del aumento de los niveles de PAI-1 en la obesidad sea el tejido adiposo (460).

I.3.c.2) Obesidad y polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

Estudios preliminares en ratas sugieren que los niveles de PAI-1 pueden jugar un papel en la diferenciación de los adipocitos y en el desarrollo de

obesidad (461-465). Se han realizado varios estudios en humanos buscando una posible relación entre el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y la presencia de obesidad, con resultados contradictorios: algunos autores han encontrado mayor frecuencia de obesidad en portadores del alelo 4G (466; 467), otros en los portadores del alelo 5G (245), y otros no han encontrado diferencias entre ambos (468).

Por otra parte, el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 se ha relacionado con niveles aumentados de PAI-1 en diversos grupos de población, pero los resultados son contradictorios en pacientes con obesidad. En un estudio realizado en indios Pima, el IMC se asoció a los niveles de PAI-1 en los genotipos 4G/4G y 5G/5G, pero no en el 4G/5G (469). Otro trabajo realizado en pacientes con enfermedad coronaria mostró que la asociación entre IMC y niveles de PAI-1 fue mayor en el genotipo 5G/5G (264). Sólo hemos encontrado dos trabajos que analicen la asociación entre los distintos genotipos de este polimorfismo y los niveles de PAI-1 en pacientes obesos. Uno de ellos es un estudio en niños, que no encontró diferencias entre los niveles de PAI-1 según el genotipo (470). El otro estudio se realizó en pacientes adultos con un IMC medio de 36 kg/m², y concluyó que el polimorfismo 4G/5G era un determinante de los niveles plasmáticos de PAI-1, que eran mayores en el genotipo 4G/4G, intermedios en el 4G/5G, e inferiores en el 5G/5G (468). Por otra parte, un estudio reciente realizado en pacientes obesos evidenció que aquellos pacientes homocigotos para el alelo 4G presentaban mayores cifras de glucemia e insulinemia basales (471).

No hemos encontrado ningún trabajo que analice la frecuencia de los distintos genotipos de dicho polimorfismo en pacientes con obesidad mórbida, ni la posible influencia de los diferentes genotipos sobre los niveles de PAI-1 en estos pacientes.

I.3.c.3) Obesidad, PAI-1, y leptina

Se ha implicado recientemente a distintas citoquinas en la regulación de la síntesis de PAI-1, entre ellas a la leptina. La leptina es una citoquina codificada por el gen *ob* (472), que se produce casi exclusivamente en el tejido adiposo (473). La leptina controla la ingesta alimentaria mediante su interacción con su receptor hipotalámico (474), informando del estado de reserva energética, y regulando así el apetito y el gasto energético. Su concentración plasmática se correlaciona fuertemente con la masa grasa tanto en sujetos con normopeso como en sujetos con obesidad (13), habiéndose propuesto que los pacientes obesos presentan una resistencia a la acción de la leptina. Por tanto, a pesar de la gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas de leptina en sujetos obesos, ésta puede ser considerada como un marcador biológico de acúmulo de grasa (475).

Se ha demostrado en algunos trabajos una asociación independiente entre los niveles plasmáticos de leptina y los de PAI-1. Esto podría indicar que el aumento de grasa provoca un aumento tanto de la producción de leptina como de la de PAI-1, o bien que el incremento de la producción de leptina contribuye de alguna manera al incremento de la síntesis de PAI-1 por el tejido adiposo. Varios estudios realizados en sobrepeso y obesidad moderada han encontrado una asociación entre los niveles de PAI-1 y los de leptina, independiente del IMC y de la masa grasa (476-478), lo que apoya un posible papel de la leptina en la regulación de la producción de PAI-1. Sin embargo, otros autores no han confirmado estos hallazgos, concluyendo que tras esta relación subyace la adiposidad (479-481). Sólo hemos encontrado en la literatura revisada un estudio realizado en obesidad mórbida, que encontró una fuerte correlación positiva entre los niveles de leptina y los de PAI-1 (482).

I.3.c.4) Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de PAI-1 en pacientes con obesidad

Varios estudios han demostrado la eficacia de la reducción de peso sobre el descenso de los niveles de PAI-1, conseguida mediante dietas hipocalóricas (423; 425; 430; 478; 483), VLCD (484) o cirugía bariátrica (421; 482). La Tabla 10 resume los principales estudios,.

Los mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales la pérdida de peso provoca un descenso de los niveles de PAI-1 son controvertidos. Se desconoce si el mecanismo responsable es la disminución de tejido adiposo, o la mejoría de las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad. Un estudio observó una correlación entre la pérdida de peso y el descenso del PAI-1 no explicable por cambios en los TG o en la insulinemia (425), enfatizando el papel del tejido adiposo en el control de los niveles plasmáticos de PAI-1. Estudios posteriores apoyan esta hipótesis (478; 485). Janand y cols relacionan los cambios en los niveles de PAI-1 con los cambios en la cantidad de grasa visceral (451), pero otros autores no han confirmado estos datos (483). De igual forma, los estudios que han investigado la relación entre la pérdida de peso y la secreción de PAI-1 por el tejido adiposo han mostrado resultados contradictorios (484; 486). Otros trabajos enfatizan más el papel de la mejoría de la RI (487) o del perfil lipídico (422). Otros autores atribuyen la mejoría en los niveles de PAI-1 a la dieta “*per se*”, pues observan que los niveles de PAI-1 aumentan con el paso del tiempo, aunque se mantenga la pérdida de peso (423). En definitiva, parece que los cambios de la grasa visceral son más importantes para el descenso de los niveles de PAI-1 que los cambios de la grasa subcutánea, aunque otros efectos de la pérdida de peso como la mejoría de la RI o el descenso de los TG pueden ser igualmente importantes (488).

La disminución de los niveles de PAI-1 observada tras reducción de peso en niños no parece estar influida por el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 (470), pero este aspecto no se ha estudiado en el adulto con obesidad.

Tabla 10: Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de PAI-1. Modificado de Mertens 2002 (161)

Autores	Sujetos	IMC medio	Intervención	Duración	Cambio de peso	Cambio de PAI-1
Primrose <i>et al</i> (421)	19	154 kg	Gastroplastia	12 meses	- 41,6%	PAI-1fc: -70% ***
Folsom <i>et al</i> (425)	178	31 kg/m ²	LCD + ejercicio	6 meses	- 8,4 kg &	PAI-1ag: -11,5 ng/mL **&
Velthuis-te Wierik <i>et al</i> (489)	24	no obesos	LCD	10 semanas	- 6,7%&	PAI-1ag : -25,5 ng/mL & PAI-1fc: -3,61 UI/mL &
Andersen <i>et al</i> (487)	9 PCO	34 kg/m ²	VLCD + LCD	24 semanas	- 4,8%	PAI-1fc: -54% *
Calles-Escandon <i>et al</i> (487)	19	> 32 kg/m ²	LCD	11 semanas	- 8,9%	PAI-1ag: -35,3% **
Svendson <i>et al</i> (423)	118	25 a 42 kg/m ²	LCD ± ejercicio	9 meses	-8 kg	PAI-1ag, PAI-1fc: NS
Marckmann <i>et al</i> (422)	36	35,5 kg/m ²	1) VLCD o LCD 2) Mantenimiento	1) 8-17 semanas 2) 24 semanas	1) -13,9% 2) -14,5%	PAI-1ag: -34,3% ***
Janand-Deleenne <i>et al</i> (451)	13	21-48 kg/m ²	VLCD + LCD	5 semanas	-7%	PAI-1ag : -46,6% * PAI-1fc: -42% *
Lindahl <i>et al</i> (428)	186 ITG	31 kg/m ²	LCD + ejercicio	12 meses	-5,7% &	PAI-1fc: -7,1 U/L ****
Mavri <i>et al</i> (478)	33	30,8 kg/m ²	LCD + ejercicio	10-12 semanas	-17%	PAI-1ag : -52,2% ** PAI-1fc: -65,9% **
Kockx <i>et al</i> (483)	50	31 kg/m ²	LCD	13 semanas	-13,3%	PAI-1ag : -52,2% **** PAI-1fc: -57,6% ****
Bastard <i>et al</i> (484)	15	40,5 kg/m ²	VLCD	3 semanas	-5,5%	PAI-1ag : -25,8% **
Estellés <i>et al</i> (470)	102 niños	Peso ≥ percentil 97	LCD + ejercicio	3 meses	-4,2%	PAI-1ag : -14,3% * PAI-1fc: -18,2% **
Uzun <i>et al</i> (482)	40	53 kg/m ²	<i>Banding</i> gástrico	6 meses	-24,5%	PAI-1ag : -13,3% ***
Jellema <i>et al</i> (117)	11	31,3 kg/m ²	VLCD + LCD	8 semanas	- 10,9 %	PAI-1ag: -59% ***

NS : no significativo. *: p<0,05. **: p<0,01, ***: p<0,001, ****: p<0,0001. Cambios porcentuales respecto a valor basal, excepto &: cambios netos respecto a grupo control.

VLCD: dieta de muy bajo contenido calórico. LCD: dieta hipocalórica. ITG: intolerancia hidrocarbonada. PCO: síndrome del ovario poliquístico

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las alteraciones hemorreológicas pueden inducir un estado protrombótico en la obesidad. Dentro de éstas, la AE y la DE, así como la composición lipídica de la membrana del hematíe, cuyas modificaciones estructurales pueden afectar a ambas propiedades reológicas, han sido las menos estudiadas en el paciente obeso. Asimismo, la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa como posible mecanismo protrombótico ha sido escasamente valorada en estos pacientes. De igual manera, ciertas alteraciones del sistema de la PC, como un estado de R-PCa adquirida o un bajo nivel de PCa circulante, pueden asociarse con un aumento del riesgo trombótico. Adicionalmente, un elevado nivel de PAI-1 puede contribuir al estado de hipercoagulabilidad, pudiendo dichos niveles relacionarse con el polimorfismo genético 4G/5G del gen del PAI-1, aspecto que ha sido escasamente valorado en los pacientes con obesidad.

La obesidad aumenta el riesgo de eventos trombóticos. Nuestra hipótesis de trabajo es que dicho estado protrombótico puede deberse, entre otras causas, a alteraciones hemorreológicas, fibrinolíticas y del sistema de la PC, con independencia de la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular, siendo estas alteraciones subsidiarias de mejoría con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

II.2. OBJETIVOS

- 1) Valorar el perfil hemorreológico en un grupo de pacientes obesos comparado con un grupo control.
 - Comparar los niveles de Fbg, la VS, la VP, la AE y la DE, entre un grupo de pacientes obesos y un grupo control.
 - Comparar los niveles de Fbg, la VS, la VP, la AE y la DE, en función de la presencia o ausencia de SM en un grupo de pacientes obesos.
 - Determinar si los niveles de Fbg, la VS, la VP, la AE y la DE, muestran variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.
 - Comparar la composición de la membrana eritrocitaria (contenido en colesterol, fosfolípidos y ácido siálico, y expresión de FS en la hoja externa de la bicapa) entre un grupo de pacientes obesos y un grupo control.

- 2) Valorar el sistema de la PC en un grupo de pacientes obesos comparado con un grupo control.
 - Valorar la existencia de R-PCa adquirida en un grupo de pacientes obesos comparado con un grupo control.
 - Comparar los niveles de PCa circulante entre un grupo de pacientes obesos y un grupo control.
 - Determinar si dichos parámetros muestran variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

- 3) Valorar los parámetros fibrinolíticos en un grupo de pacientes obesos comparado con un grupo control.
- Comparar los niveles de PAI-1 entre un grupo de pacientes obesos y un grupo control.
 - Valorar el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en pacientes obesos y en un grupo control, y su contribución a los niveles totales de PAI-1.
 - Valorar la existencia de una asociación entre los niveles de PAI-1 y la RI en un grupo de pacientes obesos.
 - Determinar si los niveles de PAI-1 muestran variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se ha realizado un estudio de intervención dietética en pacientes obesos, comparando los parámetros hemorreológicos, fibrinolíticos y de hipercoagulabilidad en situación basal con un grupo control, y comparándolos posteriormente con los obtenidos tras la pérdida ponderal.

III.2. SUJETOS DEL ESTUDIO

III.2.a. Grupo de casos

Los sujetos del estudio son pacientes con obesidad grave o mórbida ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$), entre 18 y 60 años, seleccionados de forma consecutiva entre los que acuden a la Sección de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset hasta completar el número necesario. Se solicitó de cada paciente su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. Cada paciente llevó tratamiento durante cuatro semanas con VLCD en fórmula líquida (3 sobres de Optifast ® diarios), que aporta 603 kCal/día y contiene 52,5 g de proteínas, 67,5 g de hidratos de carbono y 13,5 g de grasa. Su composición se detalla en la Tabla 11.

Al acabar el mes de VLCD, se administró durante dos meses una dieta hipocalórica de 1200 kCal/día en mujeres y 1500 kCal/día en hombres, con 55% de hidratos de carbono, 30% de grasas y 15% de proteínas, y con 100% de los requerimientos de vitaminas y minerales. Se realizó un seguimiento clínico de cada paciente quincenal el primer mes, y posteriormente mensual, para reforzar el seguimiento de la dieta y comprobar la ausencia de efectos secundarios de la misma.

Tabla 11: Composición del preparado de fórmula líquida utilizado para VLCD

Análisis tipo de un sobre de 54 g (Optifast®)	
Valor calórico total	201 Kcal
Proteínas (caseína)	17,5 g
Grasas (aceites vegetales y de pescado): de los cuales:	4,5 g
- Ácidos grasos saturados	1,8 g
- Ácidos grasos monoinsaturados	1,3 g
- Ácido linoleico	1,15 g
- Ácido linolénico	0,17 g
- Ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico	0,075 g
Hidratos de carbono (lactosa, maltodextrinas, sacarosa y fructosa)	22,5 g
Fibra soluble (inulina)	3,6 g
Minerales	
- Sodio	195 mg
- Potasio	775 mg
- Calcio	500 mg
- Magnesio	120 mg
- Fósforo	470 mg
- Cloro	160 mg
- Hierro	6 mg
- Cobre	0,5 mg
- Manganeso	0,5 mg
- Zinc	5,4 mg
- Flúor	0,3 mg
- Yodo	50 µg
- Cromo	50 µg
- Molibdeno	30 µg
- Selenio	30 µg
Vitaminas	
- Vitamina A	330 µg
- Vitamina D	1,7 µg
- Vitamina E	8 mg
- Vitamina K ₁	25 µg
- Vitamina B ₁	0,54 mg
- Vitamina B ₂	0,67 mg
- Vitamina B ₆	0,67 mg
- Vitamina B ₁₂	1,7 µg
- Vitamina C	25 mg
- Biotina	10 µg
- Ácido fólico	100 µg
- Nicotinamida	6 mg
- Acido pantoténico	2,4 mg

III.2.b. Grupo control

El grupo control estuvo formado por sujetos comparables en edad y sexo al grupo de pacientes obesos, pero con normopeso (IMC entre 18,5 y 25 kg/m²). Estuvo constituido por voluntarios sanos, familiares no consanguíneos o amigos de los pacientes, y por personal sanitario. Los pacientes y los controles procedieron de la misma área geográfica. Los criterios de exclusión fueron los mismos que los aplicados al grupo de pacientes.

III.2.c. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión en el estudio para el grupo de casos fueron los siguientes:

- IMC superior o igual a 35 kg/m²
- Edad comprendida entre 18 y 60 años

III.2.d. Criterios de exclusión

Por la propia naturaleza del estudio, fueron excluidos todos aquellos casos o controles con enfermedades que pueden alterar los parámetros estudiados, interfiriendo en los resultados:

- Enfermedades reumatológicas y del colágeno, enfermedades infecciosas, hepatopatía, nefropatía, cardiopatía, patología oncológica.
- Síndromes de hiperviscosidad (mieloma, policitemia vera...), enfermedades hematológicas graves, anemias graves que cursen con alteraciones de los índices hematimétricos (anemia ferropénica con Hb < 10 g/dL, talasemia).
- Antecedentes de cirugía o traumatismo durante los dos meses previos al estudio.
- Embarazo o lactancia.

- Enfermedad isquémica cardiovascular: antecedentes de infarto agudo de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular, accidente isquémico transitorio, arteriopatía de miembros inferiores.
- Antecedentes de TVP o tromboembolismo pulmonar.
- Tratamiento con fármacos que puedan modificar las propiedades reológicas, fibrinolíticas y de la coagulación: ticlopidina, clopidogrel, heparina, anticoagulantes orales, antihipertensivos, antidiabéticos orales, estatinas, fibratos, pentoxifilina, buflomedil, nootropil, anticonceptivos orales, tratamiento hormonal sustitutivo de la menopausia. Los pacientes en tratamiento con ácido acetilsalicílico o antiinflamatorios no esteroideos fueron incluidos en el estudio, retirándose dicha medicación una semana antes de las extracciones analíticas.
- Diabetes mellitus, diagnosticada mediante la presencia en dos ocasiones de glucemia basal ≥ 126 mg/dL o glucemia ≥ 200 mg/dL a las 2 horas de sobrecarga oral con 75 gramos de glucosa (490).
- Hiperlipemias con TG ≥ 250 mg/dL y/o CT ≥ 250 mg/dL (491)
- Hipertensión arterial, con tensión arterial sistólica mayor o igual a 140 mmHg y/o de tensión arterial diastólica mayor o igual a 90 mmHg.
- Causas secundarias de obesidad (hipotiroidismo, síndrome de Cushing).
- Consumo habitual excesivo de alcohol, definido por el consumo habitual de más de cuatro bebidas alcohólicas o de 40 gramos de alcohol diarios (492).

III.3. MÉTODOS

III.3.a. Parámetros de la exploración física

Se determinó el peso con una báscula (con estimación de 0,1 kg), con ropa interior y sin zapatos; la talla (con estimación de 0,5 cm), sin zapatos y con la cabeza alineada siguiendo la línea trago-comisural. A partir de ambos se

calculó el IMC ($\text{IMC} = \text{peso en kg} / (\text{talla en cm})^2$). Asimismo, se determinó el perímetro de la cintura en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca a nivel de la espina ilíaca antero-superior (con estimación de 0,5 cm), y el perímetro de la cadera a nivel de los trocánteres mayores (con estimación de 0,5 cm), calculando a partir de ambos el icc. Se determinó la tensión arterial realizando la media de tres mediciones basales en decúbito supino, con un esfigmomanómetro con manguito especial para pacientes obesos, para perímetro braquial entre 33 y 47 cm. La esfigmomanometría se realizó según las recomendaciones del “*Sixth Report of Joint National Committee*” (493).

III.3.b. Extracción y procesamiento de las muestras

III.3.b.1) Extracción de las muestras

Las muestras para bioquímica, reología, fibrinólisis y PCa se extrajeron y procesaron en el Hospital Universitario La Fe (Unidad de Trombosis y Hemostasia y Centro de Investigación). Las muestras para determinaciones hormonales se extrajeron y procesaron en el Hospital Universitario Doctor Peset (Sección de Endocrinología), donde se realizó también la sobrecarga oral de glucosa. Tanto los casos como los controles estuvieron en ayunas desde al menos doce horas antes de efectuarse las extracciones. Éstas se efectuaron entre las 8:00 y las 10:00 a.m. por venopuntura antecubital mediante un sistema de extracción con vacío (“*Vacutainer*”), con estasis mínima. En primer lugar se extrajeron los tubos destinados a las determinaciones hemorreológicas y hematimétricas con la finalidad de evitar la estasis venosa. Se utilizaron tubos de 5 mL conteniendo EDTA-K₃ para las determinaciones hemorreológicas, para la composición de la membrana eritrocitaria, para los estudios de ADN, y para el hemograma, y un tubo de citrato trisódico 0,129 M para la determinación de FS. Para la determinación de Fbg, de los niveles de PAI-1 y de PCa, y de la R-PCa, se utilizaron tubos de 5 mL de citrato trisódico 0,129 M. Los tubos destinados a determinaciones bioquímicas y hormonales no contenían ningún anticoagulante, siendo tubos secos de 5 mL.

III.3.b.2) Procesamiento de las muestras

Las muestras anticoaguladas con EDTA-K₃ para el estudio de las determinaciones hemorreológicas se procesaron antes de transcurridas dos horas desde su extracción, con la finalidad de evitar el deterioro de las propiedades reológicas de la sangre (494). Las muestras destinadas a fibrinólisis y hemostasia se centrifugaron a 1.500 g durante 15 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas, que se almacenó a -70°C en partes alícuotas hasta su procesamiento. Los tubos secos destinados a las determinaciones bioquímicas y hormonales se centrifugaron para separar el suero, procesándose las muestras para bioquímica en el día, y almacenándose las muestras para hormonas en partes alícuotas a -70°C hasta su procesamiento. La inclusión tanto de pacientes como de controles fue sucesiva durante 2 años, para minimizar la influencia de los cambios estacionales.

III.3.c. Técnicas de laboratorio

III.3.c.1) Parámetros hemorreológicos

Fibrinógeno

Se determinó mediante técnicas coagulométricas derivadas del tiempo de protrombina, en un autoanalizador ACL-7000 (Instrumentation, Milán, Italia). Esta técnica tiene un coeficiente de variación intra e interensayo menor de 1,5 % y 5%, respectivamente.

Viscosidad plasmática

Se determinó en un viscosímetro capilar Fresenius (495) (KSPV3, Fresenius Medizintechnik Bad Homburg, Alemania) termostaticado a 37°C. La muestra utilizada es plasma obtenido tras centrifugación del tubo primario anticoagulado con EDTAK₃. Se coloca 2 mL en un tubo capilar de diámetro

constante, y, tras un periodo de termostatación, el sistema corta el capilar permitiendo la caída de la muestra, bajo acción constante de la gravedad. La muestra se desplaza por el interior de un tubo capilar registrándose el tiempo que tarda en recorrer el espacio entre dos sensores lumínicos. Manteniendo constantes la temperatura y la presión, el tiempo sólo depende de la VP. Los resultados se expresan en milipascales por segundo (mPas.s) o centipoise (cP). El sistema se calibra mediante dos calibradores (NP1 = 1,10 mPa \pm 1 % y NP2 = 1,9 mPa \pm 1 %). Las muestras se analizan por duplicado. El coeficiente de variación intraensayo es inferior al 1%.

Viscosidad sanguínea

Se determinó a Htc nativo y corregido a 45%, mediante un viscosímetro Brookfield DV-III (Brookfield Engineering Laboratories Stoughton, MA, Estados Unidos) termostaticado a 37°C a 230 s⁻¹ (60 rpm). La muestra analizada es sangre total obtenida en un tubo conteniendo EDTA-K₃ como anticoagulante. El viscosímetro Brookfield DV-III lleva acoplado un juego cono-placa (CP-42). Se deposita en la placa 1 mL de sangre previamente atemperada a 37 °C, y se cierra el sistema de manera que el cono giratorio rote sobre la superficie que contiene la muestra, manteniendo constante la distancia entre las dos superficies. La temperatura se controla durante la medición mediante un circuito de baño termostaticado. La resistencia que la muestra ejerce depende de su viscosidad. Los resultados se expresan en milipascales por segundos (mPas.s) o centipoise (cP). Esta técnica tiene un coeficiente de variación intraensayo de 2 % para la VS a 230 s⁻¹.

Agregabilidad eritrocitaria (índice de agregabilidad)

Se determinó en un agregómetro eritrocitario MA-1 (496) (Myrenne GmbH, Roetgen, Alemania), a Htc corregido con plasma autólogo a 45%. Consiste en un viscosímetro cono-plano transparente, a través del cual pasa un haz luminoso. Se coloca 20 μ L de sangre anticoagulada con EDTA-K₃ entre el cono y la lámina de vidrio. El cono gira durante 10 segundos, imprimiendo a la

sangre altas velocidades de cizallamiento (600 seg^{-1}), para que produzca la desagregación eritrocitaria. La súbita detención del cono giratorio es seguida de una corta pausa de 5 segundos que permite a los hematíes agregar formando “*rouleaux*”. La agrupación de hematíes conduce a la formación de lagunas de plasma libre de hematíes a través de las cuales aumenta la cantidad de luz transmitida. Los cambios de densidad óptica de la sangre son recogidos por un microprocesador. El resultado representa el grado de AE (índice de AE) computada por el microprocesador en base a la integración de los cambios de la densidad óptica de la sangre.

El instrumento determina la AE bajo dos modalidades: en estasis completa (M_0 : “*shear rate*” = 0), y a baja velocidad de cizallamiento (M_1 : “*shear rate*” = 3 s^{-1} :). M_0 remeda las condiciones de la circulación en áreas de estasis, como zonas postestenóticas o adyacentes a valvas venosas. M_1 remeda las condiciones de flujo en las vénulas postcapilares. En cada muestra se determina por duplicado la AE a M_0 y M_1 , hallándose el valor medio de ambas determinaciones, que se denominan AE_0 y AE_1 . Se corrigen todas las muestras a un valor Htc de 45 % con plasma autólogo, lo que permite comparar los índices de agregación obtenidos con el agregómetro Myrenne en los distintos laboratorios (173). El coeficiente de variación intraensayo es de 2,8%.

Tiempo de agregabilidad eritrocitaria, extensión de la agregabilidad eritrocitaria y velocidad de cizallamiento necesaria para romper los agregados eritrocitarios

El agregómetro Sefam determina los cambios de la luz reflejada por una muestra de sangre sometida a distintas velocidades de cizallamiento (497), mediante un sistema similar al descrito para el agregómetro MA-1. Los cambios de intensidad de luz reflejada en función del tiempo son procesados por un microprocesador que permite calcular distintos parámetros. Todo el sistema trabaja a 37°C , y las muestras de sangre se llevan a Htc de 45% con plasma autólogo. El coeficiente de variación intraensayo es de 2 %.

Los parámetros calculados por el sistema a partir de la curva de la intensidad de la luz frente el tiempo son:

- Tiempo de agregación (T_a). Es la pendiente de la recta en el tramo inicial de la curva (entre 0,5 y 2 s tras detenerse el émbolo), menor cuanto mayor es la AE.
- Índice de agregación a los 10s (IA10s). Es el valor del área bajo la curva en los primeros 10 segundos de iniciado el proceso de agregación, y representa la extensión del agregado formado.
- Umbral de desagregación (γ_D). A partir de la variación de la intensidad de luz reflejada en función de la velocidad de giro, se calcula la velocidad que permite la completa dispersión del agregado formado.

Deformabilidad eritrocitaria

Fue valorada mediante una técnica ectacitométrica, el Rheodyn SSD (“*shear stress diffractometer*” Myrenne GmbH, Roetgen, Alemania) (498). El Rheodyn es un difractor láser automático que permite medir la DE en un pequeño volumen de sangre de 25 μL suspendida en 2 mL de dextrano de alta viscosidad (24 mPa.s). La suspensión se coloca entre un disco fijo y otro giratorio, capaz de producir con el giro tensiones de cizallamiento comprendidas entre 0,3 y 60 Pa, manteniendo constante la distancia entre ambos discos. La elevada viscosidad del medio, junto a la progresiva elevación de la tensión de cizallamiento, fuerzan a los hematíes a deformarse, adoptando formas más o menos elípticas según su capacidad para hacerlo. La deformación elíptica de los hematíes provoca distintos patrones de difracción de un rayo láser que pasa a través de la suspensión. La difracción de este rayo es registrada por cuatro sensores ópticos, situados equidistantes sobre dos ejes ortogonales. Sobre un eje se mide la anchura de la elipse (intensidad de luz “A”), y sobre otro eje se mide la longitud de la elipse (intensidad de luz “B”). El microprocesador incorporado integra estas señales y calcula el índice de elongación eritrocitaria IE: $IE = 100 \times (A - B) / (A + B)$, a cada una de las distintas tensiones de cizallamiento. El IE es proporcional a la DE que se produce al someter al hematíe a distintas fuerzas o tensiones de cizallamiento

que oscilan entre 0,3 y 60 Pa. Se determinó el IE a 12 (IE12), 30 (IE30) y 60 pascales (IE60). El coeficiente de variación de esta técnica es de 3% para las tensiones de cizallamiento comprendidas entre 12 y 60 Pa.

Hematocrito

Se determinó en una microcentrífuga, centrifugando la muestra a 15.000 g durante 7 minutos.

Contenido de colesterol, fosfolípidos y ácido siálico de la membrana eritrocitaria

Los eritrocitos aislados se lavaron tres veces con tampón fosfato salino 0,15M (PBS) conteniendo 0,1 mM de EDTA a 4° C, y se centrifugaron a 900 g, durante 10 minutos. Los eritrocitos lavados se sometieron a criofractura con nitrógeno líquido, mediante tres ciclos de congelación y descongelación a 37°C. Los eritrocitos rotos se lavaron seis veces con en PBS-EDTA a 4°C y se centrifugaron a 100.000 g, durante 40 min (499). Las membranas rotas y lavadas se suspendieron en PBS-EDTA y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno en congelador a -80°C. La extracción de lípidos de membrana eritrocitaria se realizó mediante la incubación durante 1 hora con isopropanol (1:22 v/v muestra isopropanol) y posterior adición de 7 volúmenes de cloroformo e incubación durante 1 hora. La separación de las fases se realizó por centrifugación. La cuantificación de colesterol, fosfolípidos y ácido siálico de la membrana de los eritrocitos se realizó mediante técnicas colorimétricas (colesterol: Bayer Diagnostic, Cedex, Francia; fosfolípidos: Wako Chemicals GMBH, Neuss, Alemania; ácido siálico: Sialic Acid Farbtest, Boehringer Mannheim, Alemania). Se cuantificaron las proteínas de la membrana eritrocitaria por el método de Lowry (500), para expresar los resultados en contenido de colesterol, fosfolípidos y ácido siálico por contenido de proteína de membrana.

Expresión de fosfatidilserina en la hoja externa de la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria

Por otra parte, se determinó la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa lipídica de la membrana del hematíe mediante citometría de flujo (Epics XL-MCL Flow Cytometer, Beckman-Coulter, FL, USA) (501). Para ello, se utiliza sangre total, identificándose los eritrocitos mediante anticuerpos anti-glicoforina 3 marcados con ficoeritrina (PE). La anexina-V marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) se une a las células que exhiben una cantidad sustancial de FS en la hoja externa de su membrana, siendo catalogadas por el citómetro como positivas. El sistema identifica a las células que se unen simultáneamente a los anticuerpos anti-glicoforina 3.PE y a la anexina-V.FITC.

Se diluye 5 μL de sangre en 200 μL de tampón HEPES, añadiéndose posteriormente 13,4 μL de 25 mM Cl_2Ca , y obteniéndose así una concentración final de calcio iónico de 1,5 mM. La muestra permanece durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se añade 3 μL de anexina-V.FITC (Immunotech, Marseille, France) y 3 μL de anticuerpos anti-glicoforina 3.PE humana (PE labeled anti-human CD235a, Becton Dickinson, CA, USA), manteniéndose 10 minutos en hielo y en la oscuridad. De esta manera, los anticuerpos anti-glicoforina 3.PE se unen específicamente a los glóbulos rojos, y la anexina-V.FITC se une a la FS expresada en la hoja externa de la membrana celular mediante una unión calcio-dependiente reversible. Las muestras se diluyen con 800 μL de HEPES- Ca^{2+} (1,5 mM de calcio iónico) mantenido en hielo, y se evalúan inmediatamente por citometría de flujo. Un segundo tubo denominado “blanco” sin anexina-V.FITC se evalúa en paralelo, estableciéndose una fluorescencia arbitraria en el mismo para obtener un porcentaje de eritrocitos positivos para anexina entre 0,18 y 0,20% (502). El blanco y el tubo conteniendo la muestra se analizan bajo las mismas condiciones de lectura. Ante el impacto del rayo láser, las partículas generan una difracción de la luz que es captada por dos fotodetectores. El procesador incorporado (System II software, Beckman-Coulter, FL, USA) integra estas

señales y calcula el porcentaje de células marcadas tanto por la anexina-V.FITC como por el anticuerpo anti-glicoforina 3.PE, expresando el resultado como porcentaje de eritrocitos positivos para FS por cada 500.000 eritrocitos (503).

El citómetro de flujo se calibra diariamente (Immunocheck microbeads, Beckman-Coulter, FL, USA). Las muestras se analizan por duplicado, y el coeficiente de variación intraensayo es inferior a 1%.

III.3.c.2) Parámetros de hemostasia

Resistencia a la proteína C activada

Se determinó calculando el “*ratio*” de sensibilidad a la PCa (Rs-PCa), que es el cociente entre el tiempo de tromboplastina activado (TTPA) del plasma del paciente activado con una cantidad estándar de PCa (APCTM Resistance, Instrumentation Laboratory, Milano, Italia), y el TTPA sin PCa (213). Además, se calculó el “*ratio*” normalizado de sensibilidad a la PCa (Rsn-PCa), dividiendo el Rs-PCa del paciente por el obtenido con una mezcla de plasmas normales (504). En caso de R-PCa, el Rs-PCa es menor del esperado. Se consideró R-PCa un Rs-PCa menor de 2, o bien un Rsn-PCa menor de 0,7. El coeficiente de variación intraensayo fue de 1,5% en ausencia de PCa y de 3,5% en presencia de PCa.

Detección de la mutación factor V Leiden

En los casos y controles que presentaron R-PCa, se estudió la presencia de la mutación factor V Leiden mediante análisis de restricción del fragmento de ADN del gen del factor V amplificado con la reacción en cadena de la polimerasa, para detectar la mutación Arg/Gln en posición 506 (505). El ADN se extrajo de las muestras de sangre total por medio del Sistema de

Purificación Genómica (Promega, Madison, USA). Los casos y controles con factor V Leiden fueron excluidos de los resultados de R-PCa.

Niveles circulantes de proteína C activada

Los niveles plasmáticos de PCa se determinaron según la técnica descrita por España y cols en 1996 (506). Se extrajo 4,5 mL de sangre en dos tubos con 0,5 mL de citrato sódico, añadiéndose inmediatamente 46 µL de 1.000 U/mL de heparina a uno de ellos, e incubándose la mezcla a 37° durante 30 minutos para forzar a toda la PCa circulante a formar complejos con el PCI, ya que en presencia de heparina, más del 95% de la PCa forma complejos con el PCI. Por tanto, la concentración de complejos PCa:PCI en el tubo con heparina es la suma de los complejos circulantes “*in vivo*” y de los complejos formados “*in vitro*” a partir de la PCa circulante. Al segundo tubo se añadió 46 µL de una mezcla de benzamidina y PPACK con la finalidad de inhibir a la PCa circulante, de forma que los complejos PCa:PCI de este tubo reflejaban su concentración “*in vivo*”. La concentración de PCa circulante se calculó a partir de la diferencia de las concentraciones de PCa:PCI en ambas muestras. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5% y 8%.

Marcadores de activación de la coagulación

El fragmento F1+2 de la protrombina se determinó mediante técnica de ELISA (Behringwerke, Marburg, Germany). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron menores de 3% y 6%, respectivamente

Niveles antigénicos de proteína C y complejos PCa:PCI

Se determinaron mediante técnicas de ELISA, con coeficientes de variación intra e interensayo menores de 5% y 8%, respectivamente. Para la medida de la PC se utilizó una curva de calibración con diluciones de una muestra formada a partir de plasma de 25 controles, a los que se asignó una concentración de PC de 100%.

III.3.c.3) Parámetros fibrinolíticos

Determinación antigénica del PAI-1

El PAI-1 antigénico (PAI-1ag) se determinó con un *kit* comercial de ELISA (*TintElize PAI-1, Biopool*), que cuantifica con la misma eficiencia el PAI-1ag activo, inactivo, y acomplejado con t-PA y u-PA. Las variabilidades intra e interensayo fueron de 3% y 7%. Se utilizó el tipo de ELISA de doble anticuerpo o "*sandwich*". El esquema de dicha técnica es el siguiente:

- 1) *Reacción inmunológica*: Los pocillos de la microplaca se incuban con un exceso del anticuerpo de captura, específico contra la proteína cuya concentración se desea medir. La muestra diluida se incuba en la microplaca para lograr la completa unión de todo el antígeno al anticuerpo de captura. A continuación, la placa se lava y se incuba con un exceso de un segundo anticuerpo conjugado con un enzima, el anticuerpo de detección. El anticuerpo de detección se une al antígeno inmovilizado, y así se forman los complejos "*sandwich*" (anticuerpo-antígeno-anticuerpo-enzima). La cantidad de enzima unido al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra (Figura 18).

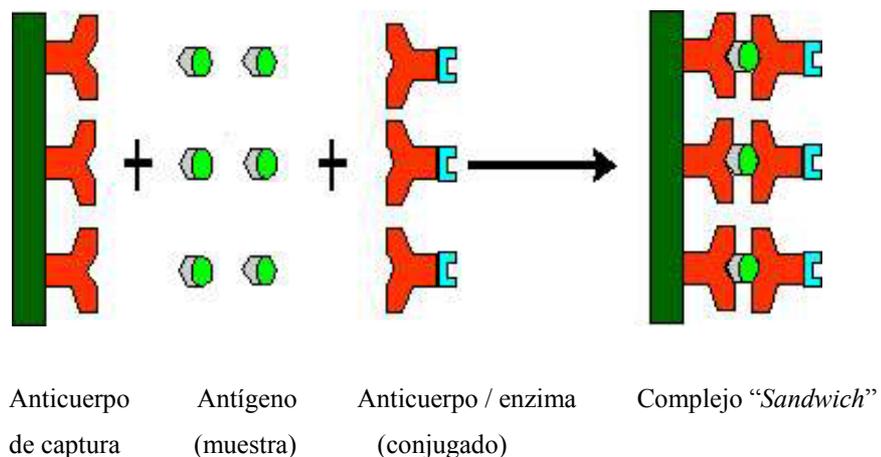


Figura 18: Técnica de ELISA del "doble anticuerpo" (I)

2) *Reacción enzimática y cuantificación:* A continuación, se lava la microplaca, para separar la fracción de anticuerpo conjugado que no se ha unido. Se añade un sustrato, y la acción enzimática sobre éste genera un producto coloreado (color amarillo). La absorbancia a una determinada longitud de onda, medida por espectrofotometría, es proporcional a la concentración de antígeno en la muestra. Paralelamente, en cada placa se incluyen estándares a concentraciones conocidas de antígeno, para construir una curva de calibración (Figura 19).

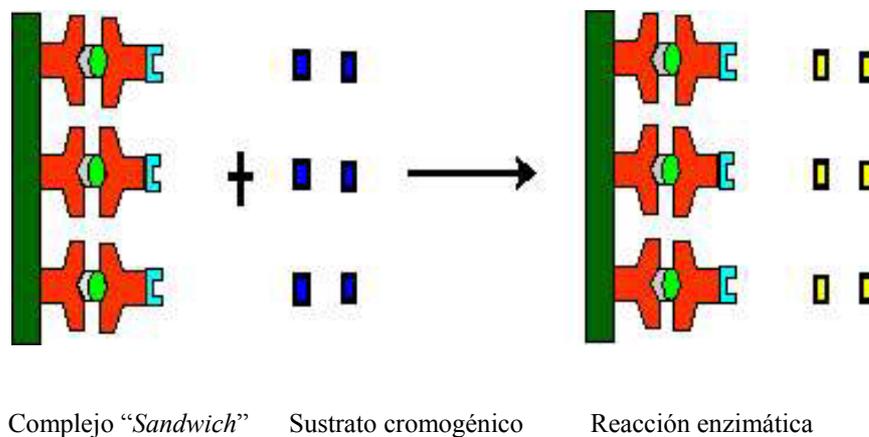


Figura 19: Técnica de ELISA del "doble anticuerpo" (II)

Determinación del PAI-1 funcional

El ensayo funcional del PAI-1 (PAI-1fc) consiste en valorar la capacidad inhibitoria que el plasma tiene sobre el t-PA monocatenario. En una primera etapa, parte del t-PA monocatenario añadido a una muestra es inhibido por el PAI-1ag del plasma a determinar, y mediante acidificación se destruye la antiplasmina y otros inhibidores del plasma que puedan interferir en el ensayo. En una segunda etapa, se mide la actividad residual de t-PA monocatenario. Para ello, se añade una mezcla de plasminógeno, fibrina y sustrato cromogénico a la muestra, de forma que el t-PA funcional monocatenario residual transforma el plasminógeno en plasmina. La actuación enzimática de ésta sobre el sustrato cromogénico liberará p-nitroanilina de color amarillo,

siendo la cantidad de color producida directamente proporcional a la cantidad de t-PA de la muestra. La determinación del PAI-1fc se obtiene a partir de la diferencia entre el t-PA monocatenario inicial y el valorado al final del ensayo. Se define como 1 UI de PAI-1fc la cantidad que inhibe 1 UI de t-PA monocatenario durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los resultados se expresan en relación a una curva patrón realizada con distintas concentraciones de patrón internacional de t-PA. Las variabilidades intraensayo e interensayo fueron de 6% y 9%, respectivamente.

Determinación antigénica del activador del plasminógeno tipo tisular

La determinación del t-PA antigénico se llevó a cabo utilizando un *kit* comercial de ELISA (*TintElize t-PA, Biopool*), que cuantifica con la misma eficacia las formas libres de t-PA y las acomplejadas con los inhibidores. La técnica fue básicamente la misma que la descrita para el PAI-1ag, con la única diferencia de que los anticuerpos de captura y detección eran específicos para t-PA. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 4% y 6%, respectivamente.

Técnicas moleculares

- Extracción de ADN: Para la extracción de ADN se empleó el *Wizard Genomic Purification kit (Promega)* en muestras de sangre periférica anticoaguladas.
- Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP): La RCP permite sintetizar “*in vitro*” secuencias específicas de ADN gracias a la participación de dos oligonucleótidos como cebadores que se hibridan con las cadenas opuestas del ADN molde, flanqueando la región de interés. El proceso sigue tres pasos fundamentales cuya repetición en sucesivos ciclos aumenta de forma exponencial el número de copias. El primer paso

consiste en la desnaturalización del ADN. Luego, el ADN molde se hibrida con los cebadores. En la fase final, la extensión de la cadena por la ADN-polimerasa a partir de los cebadores acaba generando una copia del ADN molde. Actualmente, se utilizan polimerasas termoestables como la Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*) con una vida media de 40 minutos a 95°C y una temperatura óptima de 75°C. De esta manera, la reacción de reconocimientos y extensión del cebador se lleva a cabo a temperaturas en las que la unión del cebador a regiones no específicas es muy baja, y se evita la presencia de estructura secundaria en algunas regiones del ADN molde.

- Determinación del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen del PAI-1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa: La técnica de RCP utilizada para el PAI-1 fue la descrita por Margaglione (507) con modificaciones. Los cebadores específicos utilizados fueron proporcionados por la casa MWG-Biotech (*Roche*):

Forward oligonucleotide: 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'

Reverse oligonucleotide: 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

Las condiciones del programa para la PCR fueron las siguientes:

- 1) Desnaturalización del ADN a 95°C durante 3 minutos.
- 2) Desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 minuto.
- 3) Hibridación del ADN a 60°C durante 1 minuto.
- 4) Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 30 ciclos.
- 5) Extensión final: 72°C durante 3 minutos.

Número total de ciclos: 35.

A continuación, 20 µl del producto amplificado se sometieron a digestión durante 3,5 horas a 55°C con 1 U del enzima de restricción Bsl I (*New England Biolabs*). Después de la digestión enzimática, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 4%, durante 40 min a 90V.

Los fragmentos resultantes son una única banda de 98 pares de bases para el genotipo 4G/4G, y una banda de 77 pares de bases y otra de 22 pares de bases para el 5G/5G. En las condiciones electroforéticas utilizadas, la banda de 22 pares de bases no se visualiza. Por lo tanto, los resultados de la electroforesis del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 ofrecen tres posibilidades: una única banda de 98 pares de bases si se trata de un individuo homocigoto 4G/4G, una banda de 98 pares de bases y otra de 77 si se trata de un heterocigoto 4G/5G, o bien, una única banda de 77 pares de bases en caso de tratarse de un sujeto homocigoto 5G/5G (Figura 20).

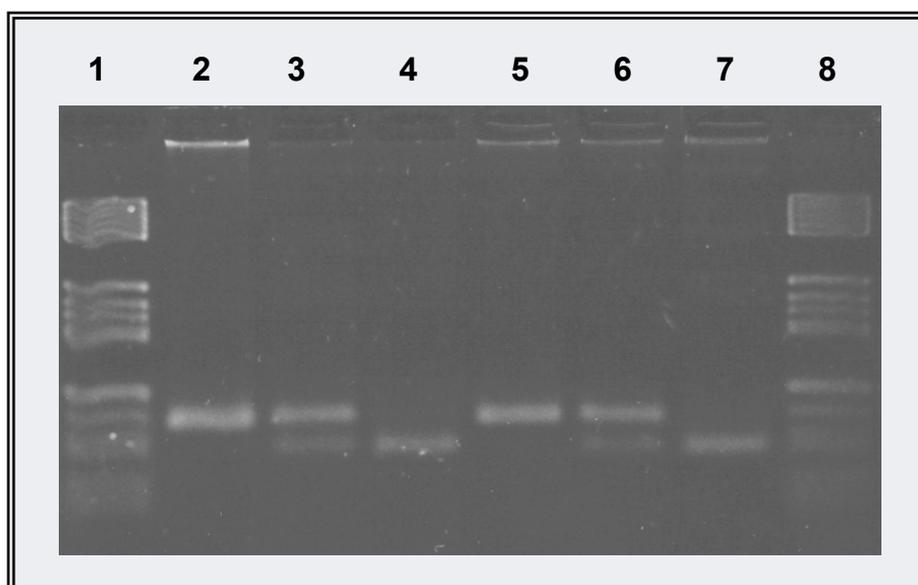


Figura 20: Electroforesis en gel que muestra el polimorfismo 4G/5G del PAI-1. Las líneas 2 y 5 corresponden al genotipo 4G/4G, las líneas 3 y 6 al genotipo 4G/5G, y las líneas 4 y 7 al genotipo 5G/5G; las líneas 1 y 8 son marcadores

III.3.c.4) Parámetros generales

Bioquímicos

- Glucemia basal y a los 120 minutos de una sobrecarga oral con 75 g de glucosa tras tres días de dieta con 150 g de hidratos de carbono diarios, determinada mediante el método enzimático de la hexoquinasa.
- Urea, creatinina, aspartatoaminotransferasa (AST o GOT), alaninoaminotransferasa (ALT o GPT), fosfatasa alcalina, bilirrubina, ácido úrico, proteínas totales, determinados mediante métodos enzimáticos y colorimétricos en un autoanalizador LX20 Beckman.
- Perfil lipídico completo, determinando TG, CT, HDL y VLDL por técnicas enzimáticas colorimétricas, apoproteína A₁ (ApoA) y apoproteína B (ApoB) por inmunonefelometría, y calculando LDL mediante fórmula de Friedewald.
- PCR, determinada mediante inmunonefelometría.

Parámetros hematológicos básicos e índices eritrocitarios

Se determinó el número de hematíes, la concentración de hemoglobina, el Htc, el VCM, la hemoglobina corpuscular media (HCM), CHCM, y el recuento leucocitario, en un autoanalizador Sysmex ME 8000 (TOA Medical Electronics, Kobe, Japón).

Hormonas y citoquinas

- TSH y T₄ libre plasmáticas, determinadas mediante enzimoquimioluminiscencia, con coeficientes de variación intraensayo de 1,1% y 2,3%, e interensayo de 2,3% y 3,6%, respectivamente.
- Cortisol en orina de 24 horas, determinado mediante enzimoquimioluminiscencia, con coeficientes de variación intraensayo de 2,9% e interensayo de 3,1% respectivamente.
- IL-6, determinada mediante inmunoquimioluminiscencia, con un coeficiente de variación intraensayo de 3,5% e interensayo de 5%.

- TNF- α , determinado mediante inmunoquimioluminiscencia, con un coeficiente de variación intraensayo de 3,5% e interensayo de 6,5%.
- Leptina, determinada mediante inmunoquimioluminiscencia, con un coeficiente de variación intraensayo de 5,6% e interensayo de 6,7%.
- Insulina basal y 2 horas tras sobrecarga con 75 g de glucosa oral, determinada mediante enzimoquimioluminiscencia, con un coeficiente de variación intraensayo de 4% e interensayo de 8,5%.
- Se calculó el índice HOMA mediante la fórmula siguiente (57):

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulinemia basal } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glucemia basal } (\text{mg/dL}) \times 0,05551}{22,5}$$

III.3.d. Recogida de datos clínicos y analíticos: fases del estudio

III.3.d.1) Grupo de casos

Los parámetros clínicos y analíticos se valoraron en situación basal, entre 1 a 3 días antes del comienzo de la dieta hipocalórica, y a los 3 meses de iniciada la misma, incluso si los pacientes no habían perdido peso. Se estudió en un subgrupo a los pacientes que habían logrado una pérdida de peso mayor o igual al 10%. La analítica y el comienzo de la dieta fueron diferidos si en el momento programado el paciente padecía algún proceso infeccioso intercurrente, posponiéndolas 15-30 días según la evolución clínica.

Se consideró “consumo de tabaco” al consumo de 1 o más cigarrillos diarios, y “consumo de alcohol” al consumo habitual de 2 o más bebidas alcohólicas o 20 gramos de alcohol diarios (492). Se consideró “menopausia” a

la ausencia de menstruaciones en un periodo mínimo de 12 meses; en los casos dudosos, se realizó la determinación de estradiol y de gonadotrofinas (FSH y LH). Para catalogar a los sujetos en función de la presencia o ausencia de SM, se utilizaron los criterios de la “*International Diabetes Federation*” de 2.005 (64). Para catalogar a los sujetos en función de la presencia o ausencia de RI, se utilizó el punto de corte del índice HOMA de 3,03, correspondiente al percentil 75 de nuestra población (60). Para el diagnóstico de glucemia basal alterada (GBA) o intolerancia a la glucosa (ITG), se utilizaron los criterios de la “*American Diabetes Association*” de 2.005 (490).

III.3.d.2) Grupo control

En el grupo control se realizó una valoración clínica y analítica basal, y otra a los 3 meses de la primera. Los criterios de consumo de tabaco, consumo de alcohol y menopausia fueron los mismos que para los casos. De igual forma, la analítica fue diferida 15-30 días si el sujeto padecía algún proceso infeccioso intercurrente.

III.3.e. Análisis estadístico

Con el análisis estadístico se pretendió demostrar diferencias significativas entre las diferentes variables al compararlas:

- Entre el grupo control y el grupo de casos antes de empezar la dieta.
- En el grupo de casos antes de empezar la dieta y a los tres meses de la misma.
- En el grupo control, en los dos momentos (basal y tras tres meses), para no poder atribuir las posibles diferencias encontradas en el grupo de casos a un factor diferente a la intervención dietética.

III.3.e.1) Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de muestra se realizó teniendo en cuenta el objetivo de comparar en un grupo de pacientes obesos y en un grupo control una serie de parámetros hemorreológicos, de hemostasia y fibrinólisis. Para ello, se utilizó la fórmula de comparación de medias para grupos independientes, fijando un contraste bilateral y el error I y el error II de manera estándar en un 5% y un 20% respectivamente.

Dado que existían muchas variables a medir y cada una tendría una desviación estándar y unas diferencias en magnitud distintas, se optó por elegir una variable limitante. La elección de la variable limitante es práctica común en los cálculos del tamaño de muestra, ya que si se tiene suficiente poder estadístico para detectar diferencias en esta variable, para todas las demás este poder está garantizado. Para ello, se recurrió a la revisión bibliográfica (389; 394), así como a la realización de un pequeño estudio piloto en un pequeño grupo de pacientes con características similares a los que serán estudiados. De todos los parámetros analizados, la VP, a pesar de su baja desviación estándar, fue la que mostró menor diferencia porcentual entre casos y controles, y por este motivo fue elegida como limitante. Concretamente, la desviación estándar media de la VP según la bibliografía consultada es de 0,035 mPas.s (508), y, considerando para esta variable el valor de 0,02 mPas.s como la diferencia mínima clínicamente importante a detectar (508) y aplicando la fórmula de diferencia de medias, se requiere un tamaño de la muestra de 44 pacientes, y un número al menos igual de controles.

Inicialmente, se pensó que el número de pérdidas no iba a ser muy elevado, dado que se trataba de pacientes que acudían a la consulta con el objetivo de perder peso, altamente motivados, a los que se iba a hacer un seguimiento estrecho. No obstante, para los nuevos cálculos del tamaño de la muestra, se asumió un porcentaje de pérdidas del 10%, ascendiendo el tamaño de la muestra calculado a 48 individuos en cada grupo. Este tamaño muestral

permitió hacer comparaciones de medias mediante técnicas paramétricas al superar los 30 individuos por grupo (casos y controles). Para las medidas repetidas al estudiar la evolución en el seguimiento, el poder estadístico aumentó, ya que son necesarios menos pacientes en estos cálculos. Posteriormente, en el análisis de la influencia de variantes genéticas en los parámetros estudiados, se perdió poder estadístico al estratificar. Para algunas variables (la limitante y las del menor diferencia de medias), se pensó que no sería suficiente el tamaño de muestra calculado inicialmente (n=48 casos y 48 controles), por lo que se aumentó otro 20-25% (teniendo en cuenta la prevalencia media de las variantes genéticas a estudiar). Con todo ello, el tamaño de muestra necesario para los objetivos de este estudio se fijó en 60 casos y 60 controles.

III.3.e.2) Tests estadísticos

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el programa SPSS 12.0.

Se utilizaron media aritmética y desviación estándar como medidas de estadística descriptiva. El porcentaje de cambio respecto al valor basal en el grupo de pacientes obesos de las diferentes variables tras el tratamiento dietético se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de cambio} = \frac{(\text{variable tras 3 meses} - \text{variable basal})}{\text{variable basal}} \times 100$$

En cuanto a la estadística analítica, se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de las variables. Dicho test mostró que todas las variables siguieron una distribución normal en el grupo de controles y en el grupo de casos por separado, excepto las variables

insulina, HOMA, PCR, IL-6, TNF- α , ácido úrico, y leucocitos. Se realizó la transformación logarítmica de las mismas, y las nuevas variables obtenidas siguieron una distribución normal. Las variables siguieron una distribución normal, incluso al separarlas por sexo, genotipo, presencia o ausencia de SM o de RI, excepto la variable “expresión de FS en la hoja externa de la bicapa” en el grupo de casos separados por IMC mayor o menor a 45 kg/m². Se realizó la transformación logarítmica de dicha variable, presentando la nueva variable obtenida una distribución normal. Esto permitió el uso de pruebas paramétricas incluso en los casos en los que al estratificar la muestra el tamaño final era inferior a 30. Al considerar únicamente al grupo de casos con una pérdida de peso mayor o igual al 10%, las variables siguieron asimismo una distribución normal. Para las comparaciones crudas, se aplicó el test t de Student para grupos independientes al comparar las medias de casos y controles, y el test t de Student para grupos apareados para comparar los casos antes y después de la intervención dietética.

Para realizar los ajustes por posibles variables de confusión, se aplicaron técnicas de regresión lineal univariante y multivariante. Para calcular la correlación entre variables continuas, se aplicaron análisis de correlación bivariada de Pearson.

IV. RESULTADOS

IV.1. ANTROPOMETRÍA, BIOQUÍMICA, HORMONAS Y MARCADORES DE INFLAMACIÓN

IV.1.a. Descripción de los grupos clínicos

La muestra estuvo constituida por 134 sujetos: 67 casos y 67 controles. La Tabla 12 muestra la distribución por sexo, edad, menopausia, consumo de tabaco y de alcohol en casos y controles. Ninguna de estas variables presentó diferencias entre ambos grupos. De los 67 pacientes obesos que empezaron el estudio, 62 completaron los 3 meses de seguimiento, produciéndose por tanto 5 pérdidas (7,5%). La Tabla 13 muestra la distribución de los casos en función de que el IMC fuera mayor o menor de 45 kg/m².

Tabla 12: Comparación de las variables edad, sexo, menopausia, consumo de tabaco y consumo de alcohol, en el grupo de casos y en el grupo control

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n=67)	p
Edad en años (media ± DS)	34 ± 11	32 ± 9	0,477
Sexo (M / H)	76% / 24%	67% / 33%	0,338
Menopausia (sí / no)	16% / 84%	7% / 93%	0,166
Consumo de tabaco (sí / no)	43% / 57%	40% / 60%	0,726
Consumo de alcohol (sí / no)	4% / 96%	3% / 97%	0,649

M: mujeres, H: hombres, p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Tabla 13: Distribución de los casos en función del IMC

Variable	Casos con IMC < 45 kg/m ²	Casos con IMC ≥ 45 kg/m ²	Total	p
n	31	36	67	
Porcentaje	46 %	54 %	100 %	
Edad (años)	34,5 ± 11,78	35,9 ± 9,50		0,587
Sexo (M / H)	90% / 10%	64% / 36%		0,011

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

La Tabla 14 muestra la distribución de los casos en función de la presencia o ausencia de SM. En el grupo control, ningún sujeto cumplió criterios de SM ($p < 0,001$ entre casos y controles).

Tabla 14: Distribución de los casos en función de la presencia de SM

Variable	Casos sin SM	Casos con SM	Total	p
n	31	36	67	
Porcentaje	46 %	54 %	100 %	
Edad (años)	34,1 ± 10,88	36,3 ± 10,50		0,401
Sexo (M / H)	77% / 23%	75% / 25%		0,817

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

La Tabla 15 muestra la distribución de los casos en función de la presencia o ausencia de RI. En el grupo control, ningún sujeto presentó RI ($p < 0,001$ entre casos y controles).

Tabla 15: Distribución de los casos en función de la presencia de RI

Variable	Casos sin RI	Casos con RI	Total	p
n	33	34	67	
Porcentaje	49 %	51 %	100 %	
Edad (años)	35,6 ± 10,87	34,9 ± 10,59		0,775
Sexo (M / H)	82% / 18%	71% / 29%		0,281

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

La Tabla 16 muestra la distribución de los casos según la presencia o ausencia de GBA o ITG. En el grupo control, 4 sujetos (6%) presentaron GBA o ITG ($p < 0,001$ entre casos y controles).

Tabla 16: Distribución de los casos en función de la presencia de GBA-ITG

Variable	Casos sin GBA-ITG	Casos con GBA-ITG	Total	p
n	30	37	67	
Porcentaje	45 %	55 %	100 %	
Edad (años)	31,4 ± 9,90	38,4 ± 10,31		0,006
Sexo (M / H)	83% / 17%	70% / 30%		0,212

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

IV.1.b. Comparación entre casos y controles

La Tabla 17 muestra la comparación de las variables antropométricas entre casos y controles.

Tabla 17: Valor medio y desviación estándar de los parámetros antropométricos en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n=67)	p
Peso (kg)	123,5 ± 20,99	62,9 ± 10,34	< 0,001
IMC (kg/m ²)	46,0 ± 6,05	22,4 ± 2,32	< 0,001
Cintura (cm)	127 ± 14,0	79 ± 10,3	< 0,001
Cadera (cm)	138 ± 12,2	96 ± 6,3	< 0,001
icc	0,92 ± 0,072	0,82 ± 0,085	< 0,001

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

La Tabla 18 muestra las diferencias en los parámetros metabólicos y hormonales entre casos y controles. Los casos presentaron niveles significativamente más elevados de glucosa (p<0,001), CT (p=0,03), LDL (p=0,001), TG (p<0,001), ApoB (p=0,002), ácido úrico (p<0,001), insulina (p<0,001), HOMA (p<0,001), leptina (p<0,001), PCR (p<0,001), TNF- α (p<0,001), IL-6 (p<0,001), leucocitos (p=0,001) y neutrófilos (p<0,001), y niveles significativamente inferiores de HDL (p<0,001) y ApoA (p=0,002).

Tras ajustar por IMC, persistieron las diferencias para TG (p=0,001), insulina (p=0,014), HOMA (p=0,003), leptina (p<0,001) y PCR (p=0,022).

Tabla 18: Valor medio y desviación estándar de los parámetros bioquímicos, hormonales e inflamatorios en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n = 67)	p	p ajustada por IMC
Glucosa (mg/dL)	94,8 ± 11,60	84,1 ± 8,89	< 0,001	0,589
CT (mg/dL)	188,2 ± 28,29	177,8 ± 26,95	0,030	0,322
LDL (mg/dL)	122,4 ± 25,69	107,5 ± 26,76	0,001	0,497
HDL (mg/dL)	43,0 ± 12,19	56,6 ± 12,24	< 0,001	0,270
ApoB (mg/dL)	92,1 ± 19,48	80,6 ± 21,83	0,002	0,562
ApoA (mg/dL)	136,2 ± 25,48	150,2 ± 25,70	0,002	0,851
TG (mg/dL)	114,6 ± 49,76	64,6 ± 23,04	< 0,001	0,001
Ácido úrico (mg/dL)	5,5 ± 1,65	3,6 ± 1,08	< 0,001	0,395
Insulina (μU/mL)	15,8 ± 9,18	4,9 ± 1,97	< 0,001	0,014
HOMA	3,76 ± 2,406	1,02 ± 0,385	< 0,001	0,003
Leptina (μg/L) *	64,7 ± 27,89	9,70 ± 8,08	< 0,001	< 0,001
PCR (mg/L)	5,9 ± 4,17	0,9 ± 1,26	< 0,001	0,022
TNF-α (pg/mL) **	7,9 ± 2,95	4,5 ± 2,19	< 0,001	0,117
IL-6 (pg/mL) **	4,3 ± 2,18	1,5 ± 0,94	< 0,001	0,095
Leucocitos (10 ³ /μL)	7,4 ± 2,02	6,3 ± 1,54	0,001	0,572
Neutrófilos (10 ³ /μL)	4,4 ± 1,41	3,5 ± 1,23	< 0,001	0,354

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, *: determinado en 59 casos y 36 controles, **: determinado en 60 casos y 46 controles

La Tabla 19 muestra el comportamiento en los casos de las diferentes variables en función del sexo. Los hombres obesos presentaron cifras significativamente mayores de peso (p<0,001), IMC (p=0,03), cintura (p<0,001), icc (p<0,001), ácido úrico (p<0,001) y leucocitos (p=0,029) al ser comparados con las mujeres obesas, así como cifras significativamente inferiores de HDL (p=0,039) y leptina (p=0,003). Tras ajustar por IMC, persistieron las diferencias entre sexos para todas las variables mencionadas excepto para HDL.

Tabla 19: Comparación de las variables antropométricas, metabólicas, hormonales e inflamatorias en el grupo de casos separados en función del sexo

Variable	Casos mujeres (n = 51)	Casos hombres (n = 16)	p	p ajustada por IMC
Edad (años)	35,4 ± 11,45	34,9 ± 7,89	0,846	
Tabaco (sí / no)	22 / 29	7 / 9	0,966	
Peso (kg)	116,1 ± 16,02	147,4 ± 16,94	<0,001	<0,001
IMC (kg/m ²)	45,1 ± 6,24	48,9 ± 4,47	0,030	
Cintura (cm)	123 ± 12,4	141 ± 9,6	<0,001	<0,001
Cadera (cm)	137 ± 13,3	139 ± 8,1	0,610	
icc	0,89 ± 0,052	1,01 ± 0,056	<0,001	<0,001
Glucosa (mg/dL)	94,6 ± 12,46	95,6 ± 8,59	0,737	
CT (mg/dL)	109,1 ± 42,98	132,1 ± 65,65	0,201	
LDL (mg/dL)	119,4 ± 26,34	132,1 ± 21,43	0,084	
HDL (mg/dL)	44,73 ± 12,72	37,6 ± 8,56	0,039	0,058
ApoB (mg/dL)	89,7 ± 19,16	100,4 ± 18,83	0,060	
ApoA (mg/dL)	136,1 ± 26,51	136,4 ± 22,48	0,970	
TG (mg/dL)	109,1 ± 42,98	132,1 ± 65,65	0,204	
Ácido úrico (mg/dL)	5,0 ± 1,36	7,2 ± 1,40	<0,001	<0,001
Insulina (μU/mL)	14,6 ± 6,50	20,5 ± 13,66	0,113	
Leptina (μg/L) *	71,1 ± 26,90	38,2 ± 11,80	0,003	<0,001
HOMA	3,47 ± 1,714	4,96 ± 3,560	0,124	
PCR (mg/L)	6,2 ± 4,60	5,2 ± 2,38	0,733	
TNF-α (pg/mL) **	8,3 ± 3,15	6,9 ± 2,12	0,190	
IL-6 (pg/mL) **	4,0 ± 1,63	4,8 ± 3,27	0,307	
Leucocitos (10 ³ /μL)	7,1 ± 2,10	8,4 ± 1,42	0,029	0,025
Neutrófilos (10 ³ /μL)	4,3 ± 1,49	5,0 ± 1,01	0,108	

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, *: determinado en 29 mujeres y 7 hombres, **: determinado en 34 mujeres y 12 hombres

IV.1.c. Efecto de la pérdida de peso

La Tabla 20 muestra la distribución de los casos en función de la pérdida de peso conseguida tras los 3 meses de tratamiento dietético.

Tabla 20: Distribución de los casos en función de la pérdida de peso conseguida

Variable	Pérdida de peso < 10%	Pérdida de peso ≥ 10%	Total
n	39	23	62
Porcentaje	63 %	37 %	100 %

La Tabla 21 muestra como, tras 3 meses de tratamiento dietético, los casos presentaron una disminución significativa de peso ($p=0,001$), IMC ($p<0,001$), cintura ($p<0,001$) y cadera ($p<0,001$). En el grupo control, no se observaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros antropométricos.

Tabla 21: Efecto de la pérdida de peso en los casos: valor medio y desviación estándar de los parámetros antropométricos

Variable	Casos basal (n = 62)	Casos 3 meses (n=62)	% cambio	p
Peso (kg)	124,0 ± 21,45	113,1 ± 19,54	8,7 ± 3,52	0,001
IMC (kg/m ²)	46,3 ± 6,17	42,3 ± 5,77	8,6 ± 3,77	<0,001
Cintura (cm)	128 ± 13,8	120 ± 13,1	6,3 ± 4,82	<0,001
Cadera (cm)	138 ± 10,7	131 ± 10,7	4,8 ± 4,05	<0,001
icc	0,93 ± 0,072	0,91 ± 0,075	1,3 ± 5,11	0,058

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético, % cambio: porcentaje de cambio respecto al valor basal

La Tabla 22 muestra los cambios de las variables metabólicas en el grupo de casos tras 3 meses de tratamiento dietético. Se observó una disminución significativa de las cifras de glucosa ($p=0,003$), CT ($p=0,029$) TG ($p=0,006$), insulina ($p<0,001$), HOMA ($p<0,001$) y leptina ($p=0,001$). En el grupo control, no se observaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros antropométricos.

Tabla 22: Efecto de la pérdida de peso en los casos: valor medio y desviación estándar de los parámetros bioquímicos, hormonales e inflamatorios.

Variable	Casos basal (n=62)	Casos 3 meses (n=62)	% cambio	p
Glucosa (mg/dL)	94,8 ± 11,94	90,3 ± 9,97	- 3,8 ± 11,51	0,003
CT (mg/dL)	190,0 ± 28,03	183,8 ± 32,24	-3,0 ± 11,10	0,029
LDL (mg/dL)	124,7 ± 24,57	119,1 ± 27,14	- 3,5 ± 16,78	0,057
HDL (mg/dL)	43,2 ± 12,02	43,3 ± 10,70	2,2 ± 16,35	0,883
ApoB (mg/dL)	94,4 ± 19,13	93,4 ± 18,74	0,4 ± 16,79	0,647
ApoA (mg/dL)	138,2 ± 25,44	135,78 ± 24,72	- 0,9 ± 12,64	0,320
TG (mg/dL)	111,5 ± 45,46	97,7 ± 45,18	- 7,4 ± 36,44	0,006
Ácido úrico (mg/dL)	5,5 ± 1,73	5,2 ± 1,59	- 2,3 ± 17,39	0,979
Insulina (μU/mL)	15,8 ± 9,74	10,3 ± 5,56	- 26,5 ± 36,45	<0,001
HOMA	3,80 ± 2,530	2,26 ± 1,346	- 19,4 ± 31,20	<0,001
Leptina (μg/L) *	63,2 ± 29,95	47,9 ± 22,21	- 20,7 ± 31,98	0,001
PCR (mg/L)	5,7 ± 3,91	5,2 ± 4,30	- 69,1 ± 429,72	0,411
TNF-α (pg/mL) **	8,1 ± 3,23	8,4 ± 2,52	13,6 ± 56,03	0,634
IL-6 (pg/mL) **	4,6 ± 2,33	4,1 ± 3,33	2,3 ± 83,53	0,487
Leucocitos (10 ³ /μL)	7,4 ± 1,88	7,2 ± 1,80	- 0,6 ± 22,20	0,435
Neutrófilos (10 ³ /μL)	4,4 ± 1,32	4,3 ± 1,40	- 0,9 ± 27,87	0,405

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético, % cambio: porcentaje de cambio respecto al valor basal, *: determinado en 25 casos, **: determinado en 35 casos.

Al valorar el efecto de la pérdida de peso sobre estos parámetros exclusivamente en los pacientes obesos con pérdida de peso superior o igual al 10%, sólo se obtuvieron diferencias significativas para la insulina ($17,3 \pm 14,7$ μU/mL vs $10,1 \pm 4,91$ μU/mL, $p=0,005$), el índice HOMA ($4,2 \pm 3,70$ vs $2,1 \pm 1,17$, $p=0,004$), y la leptina ($61,4 \pm 32,74$ μg/L vs $36 \pm 20,96$ μg/L, $p=0,001$). Al comparar el porcentaje de mejoría de las diferentes variables entre el grupo que perdió menos del 10% de peso inicial, y el grupo que perdió 10% o más, sólo se aprecian diferencias significativas para el porcentaje de cambio de la leptina ($9,5 \pm 33,13$ % vs $37,6 \pm 22,3$ %, $p=0,028$).

IV.2. HEMORREOLOGIA

IV.2.a. Comparación entre casos y controles

La Tabla 23 muestra los parámetros hemorreológicos comparados entre ambos grupos. Los casos han presentado mayores niveles de Fbg ($p < 0,001$), de VP ($p = 0,05$), VSc 230 ($p = 0,035$), AE_0 ($p < 0,001$), AE_1 ($p < 0,001$), Ta ($p < 0,001$), IA10 ($p < 0,001$) y γD ($p < 0,001$). Los IE12, IE30 e IE60 no han mostrado diferencias entre ambos grupos. Los índices eritrocitarios VCM, HCM y CHCM han mostrado valores significativamente menores en los casos que en los controles ($p = 0,013$, $p = 0,001$, y $p = 0,006$, respectivamente), así como la sideremia ($73 \pm 29,5 \mu\text{g/dL}$ vs $85 \pm 29,8 \mu\text{g/dL}$ respectivamente, $p = 0,016$).

Tabla 23: Valor medio y desviación estándar de los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n = 67)	p
Fbg (mg/dL)	321 \pm 51,4	251 \pm 37,1	< 0,001
VP (cP)	1,27 \pm 0,064	1,25 \pm 0,053	0,05
VSn 230 (cP)	4,37 \pm 0,480	4,32 \pm 0,485	0,507
VSc 230 (cP)	4,75 \pm 0,399	4,62 \pm 0,303	0,035
AE_0	4,73 \pm 0,939	3,92 \pm 0,932	< 0,001
AE_1	8,19 \pm 1,373	6,70 \pm 1,079	< 0,001
Ta (s) *	1,58 \pm 0,312	2,14 \pm 0,401	< 0,001
IA10 *	38,2 \pm 8,19	30,4 \pm 5,33	< 0,001
γD (s ⁻¹) *	135,1 \pm 50,34	92,2 \pm 32,57	< 0,001
IE12 (%)	48,6 \pm 3,21	48,3 \pm 3,27	0,550
IE30 (%)	54,7 \pm 2,57	55,1 \pm 3,17	0,380
IE60 (%)	57,2 \pm 2,40	57,6 \pm 2,89	0,438
Htc (%)	42,1 \pm 3,27	41,9 \pm 3,73	0,698
VCM (fL)	89,7 \pm 4,28	91,5 \pm 4,13	0,013
HCM (pg)	29,4 \pm 1,85	30,4 \pm 1,62	0,001
CHCM (%)	32,8 \pm 1,03	33,3 \pm 0,98	0,006

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, *: determinado en 33 casos y 51 controles

La Tabla 24 muestra los resultados del análisis de regresión lineal para las variables hemorreológicas que mostraron diferencias entre casos y controles. Las variables AE_0 , Ta, IA10 y γD presentaron resultados similares a la variable AE_1 , por lo que solamente se exponen los resultados de ésta última. Se observa que las diferencias en los niveles de Fbg plasmático entre casos y controles desaparecen al ajustar por IMC, pero no al ajustar por HOMA. Respecto a la VP, las diferencias entre casos y controles desaparecen al ajustar por HOMA y Fbg, y en menor medida al ajustar para LDL, manteniéndose al ajustar por IMC. Las diferencias en los parámetros de AE desaparecen al ajustar por IMC o HOMA, pero no al ajustar por Fbg o LDL. Las diferencias de VSc desaparecen al ajustar por cada una de las demás variables. Además, se observa que las diferencias de VSc entre casos y controles desaparecen al ajustar por AE_1 ($p=0,096$) o por VP ($p=0,112$), pero se mantienen al ajustar por IE60 ($p=0,038$).

Tabla 24: Comparación de los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos y en el grupo control tras ajuste por posibles variables confundientes

Variable	p	p ajustada por IMC	p ajustada por HOMA	p ajustada por Fbg	p ajustada por LDL
Fbg (mg/dL)	< 0,001	0,985	< 0,001		< 0,001
VP (cP)	0,05	0,001	0,391	0,367	0,097
AE_1	< 0,001	0,467	0,283	0,001	< 0,001
VSc 230 (cP)	0,035	0,739	0,744	0,907	0,283

p: valor obtenido al comparar la variable entre el grupo de casos y el grupo control

Dada la dificultad técnica que supone obtener membranas de eritrocitos libres de Hb para la determinación de la composición lipídica y del contenido en ácido siálico, sólo se ha llevado a cabo esta técnica en 20 casos y 20 controles de forma randomizada. La potencia calculada “*a posteriori*” con este tamaño muestral fue del 70% para detectar una diferencia mínima entre casos y controles de 0,15 mg/mg de proteína.

La Tabla 25 compara la composición lipídica y el contenido en ácido siálico en 20 pacientes obesos y 20 controles. No se observaron diferencias significativas en el contenido en colesterol y fosfolípidos de membrana entre ambos grupos. El contenido en ácido siálico de la membrana tampoco presentó diferencias entre ambos grupos. La cantidad de FS expresada en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria fue significativamente mayor en casos que en controles ($p=0,026$). Tras ajustar por IMC, las diferencias en la cantidad de FS expresada en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria entre casos y controles desaparecieron ($p=0,263$). No hubo correlación entre el colesterol de membrana y ninguno de los lípidos plasmáticos.

Tabla 25: Valor medio y desviación estándar de los distintos componentes de la membrana eritrocitaria y de los lípidos plasmáticos en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 20)	Controles (n = 20)	p
Colesterol de membrana (mg/mg de proteína)	0,55 ± 0,214	0,42 ± 0,189	0,067
Fosfolípidos de membrana (mg/mg de proteína)	0,45 ± 0,207	0,40 ± 0,173	0,426
Colesterol / fosfolípidos de membrana	1,30 ± 0,477	1,09 ± 0,374	0,139
Ácido siálico de membrana (µg/mg de proteína)	31,5 ± 20,56	36,0 ± 17,79	0,485
FS (%) *	0,93 ± 0,848	0,62 ± 0,446	0,026
CT (mg/dL)	194,8 ± 25,04	172,8 ± 30,23	0,021
LDL (mg/dL)	129,8 ± 26,31	101,8 ± 25,10	0,003
HDL (mg/dL)	44,5 ± 13,21	54,2 ± 16,31	0,056
ApoB (mg/dL)	96,0 ± 23,30	76,2 ± 20,41	0,012
ApoA (mg/dL)	147,4 ± 32,54	155,3 ± 29,79	0,458
TG (mg/dL)	102,1 ± 40,83	64,7 ± 24,83	0,002

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, *: determinado en 49 casos y 55 controles

Las Tablas 26 y 27 y la Figura 21 muestran los grados de correlación observados entre los principales parámetros hemorreológicos y los parámetros antropométricos, en el grupo de casos y en el grupo control. No se han detallado las correlaciones de los índices IE12 e IE30, al ser similares a las obtenidas para IE60, ni las del agregómetro Sefam, al ser similares a las obtenidas con el agregómetro Myrenne. Todos los parámetros hemorreológicos presentaron una correlación significativa con los diferentes parámetros antropométricos en ambos grupos, excepto el Fbg y la VP en el grupo control.

Tabla 26: Correlaciones entre los parámetros hemorreológicos y los parámetros antropométricos en el grupo de casos en situación basal

	Peso	IMC	Cintura	icc
Fbg	0,392**	0,377**	0,332**	0,098
VP	0,404**	0,453**	0,446**	0,183
VSn 230	0,461**	0,252**	0,409**	0,372**
VSc 230	0,091	0,049	0,113	0,119
AE₀	0,185	0,206	0,275*	0,212
AE₁	0,215	0,318**	0,334**	0,148
IE60	-0,212	-0,302*	-0,287*	-0,181
FS	0,088	-0,059	0,010	0,020

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

Tabla 27: Correlaciones entre los parámetros hemorreológicos y los parámetros antropométricos en el grupo control en situación basal

	Peso	IMC	Cintura	icc
Fbg	-0,026	0,098	0,161	0,146
VP	0,154	0,143	0,226	0,165
VSn 230	0,276*	0,175	0,259	0,345*
VSc 230	0,055	0,011	-0,057	-0,190
AE₀	0,381**	0,327**	0,289	0,238
AE₁	0,248*	0,341*	0,386**	0,331
IE60	-0,292*	-0,209	-0,124	-0,159
FS	-0,053	0,120	0,166	-0,014

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

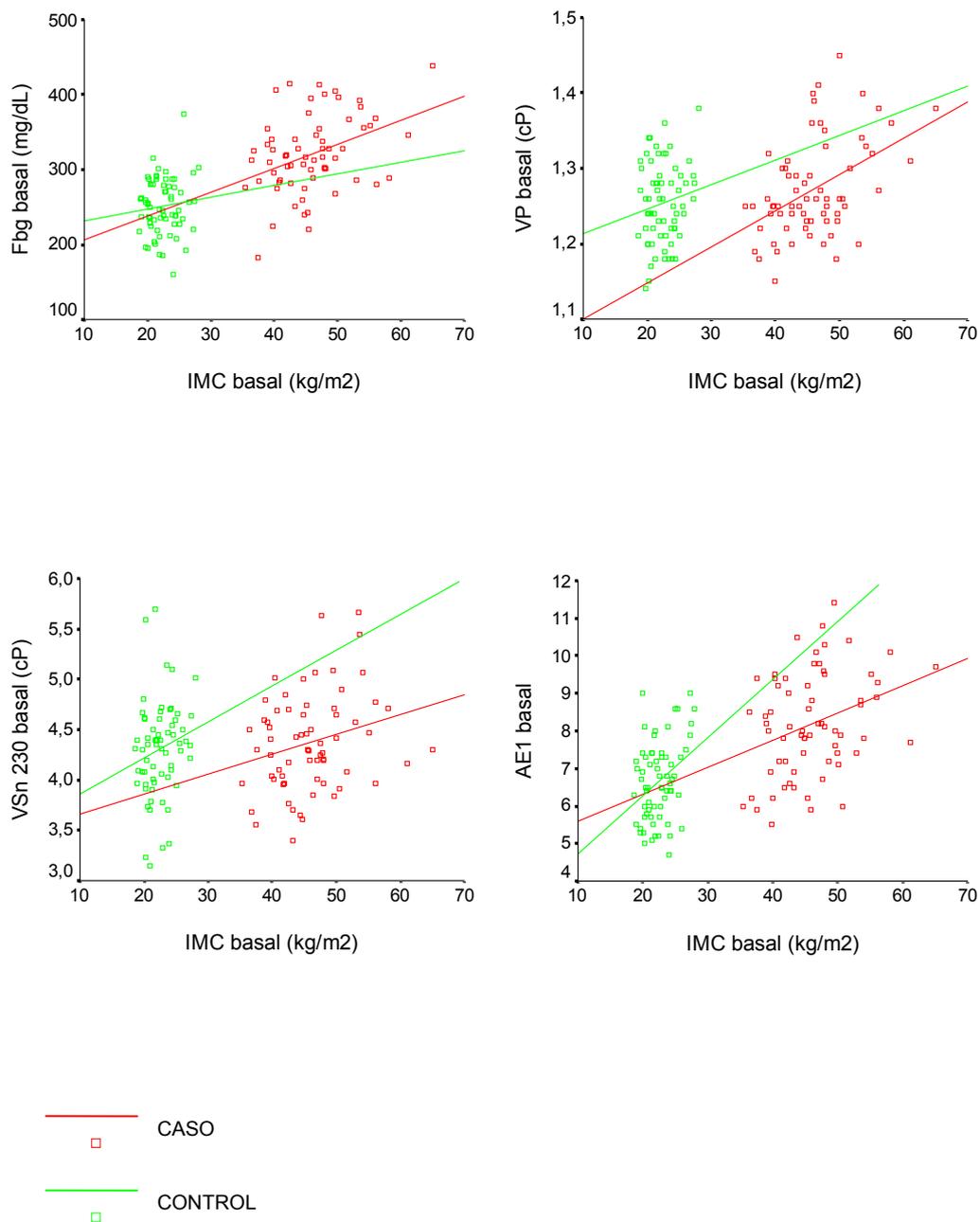


Figura 21: Correlaciones de Fbg, VP, VSn 230 y AE₁ con el IMC, en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Las Tablas 28 y 29 muestran los grados de correlación observados entre los parámetros hemorreológicos y de membrana eritrocitaria, y los parámetros bioquímicos y hormonales, en el grupo de casos y en el grupo control. En ambos grupos, el Fbg, la VP, la VS_n 230 y los índices de agregación se correlacionaron significativamente con diferentes marcadores de inflamación, exceptuando la VP en el grupo control. Asimismo, la VS_n 230, los índices de agregación y los de elongación se correlacionaron significativamente en el grupo de casos con los marcadores de RI, correlación que sólo se observó en el grupo control para la VP. Varios parámetros hemorreológicos se correlacionaron con los lípidos plasmáticos, tanto en casos como en controles. Igualmente se encontró en el grupo de casos una correlación significativa entre FS y LDL y ApoB, y negativa entre FS y HDL.

Por otra parte, destaca la falta de correlación en el grupo de obesos entre la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa y el fragmento F1+2. Los índices de AE se correlacionaron de forma positiva con los niveles de Fbg tanto en casos (AE₀: $r=0,259$, $p<0,05$; AE₁: $r=0,323$, $p<0,01$) como en controles (AE₀: $r=0,373$, $p<0,01$; AE₁: $r=0,371$, $p<0,01$).

Tabla 28: Correlaciones entre los parámetros reológicos y los parámetros bioquímicos y hormonales en el grupo de casos en situación basal

	Glucosa	LDL	HDL	ApoB	ApoA	TG	HOMA	Insulina	PCR	TNF- α	IL-6	Leuc	NF
Fbg	0,045	0,030	-0,060	-0,021	-0,106	-0,062	0,242	0,226	0,330**	0,154	0,223	0,247	0,205
VP	0,146	0,015	0,105	0,062	0,112	-0,004	0,220	0,217	0,233	0,116	0,320*	0,190	0,241*
VSn 230	0,094	0,180	-0,240	0,203	0,029	0,261*	0,244*	0,277*	0,233	0,116	0,148	0,366**	0,296*
VSc 230	-0,082	0,044	-0,158	0,040	0,052	0,130	0,148	0,174	-0,130	-0,103	0,074	0,215	0,201
AE₀	0,064	0,250*	-0,204	0,285*	0,080	0,187	0,261*	0,234	0,448**	-0,060	0,393**	0,265*	0,212
AE₁	0,246*	0,218	-0,032	0,243*	0,107	0,136	0,274*	0,214	0,355**	0,057	0,335*	0,127	0,098
IE60	-0,258*	0,167	0,178	0,100	0,031	-0,199	-0,302*	-0,278*	0,009	-0,225	-0,055	-0,131	-0,202
FS	-0,069	0,401**	-0,362*	0,439**	-0,062	0,108	0,120	0,165	0,047	-0,032	0,075	-0,271	-0,248

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral), Leuc: leucocitos, NF: neutrófilos

Tabla 29: Correlaciones entre los parámetros reológicos y los parámetros bioquímicos y hormonales en el grupo control en situación basal

	Glucosa	LDL	HDL	ApoB	ApoA	TG	HOMA	Insulina	PCR	TNF- α	IL-6	Leuc	NF
Fbg	0,178	0,117	-0,177	0,274*	0,014	0,077	-0,123	-0,133	0,486**	-0,116	0,366**	0,063	0,068
VP	-0,278*	0,081	0,033	0,096	0,026	-0,054	0,250	0,329*	0,017	-0,157	-0,174	0,022	-0,109
VSn 230	0,202	0,175	-0,338**	0,129	-0,070	0,314*	0,169	0,131	-0,136	-0,045	0,060	0,345**	0,295*
VSc 230	-0,213	0,165	-0,182	-0,059	0,033	-0,047	-0,023	0,042	0,034	-0,187	-0,157	-0,011	-0,035
AE₀	-0,073	0,132	-0,285*	0,328**	-0,105	0,181	0,120	0,139	0,245	-0,014	0,174	0,223	0,141
AE₁	-0,052	0,289*	-0,232*	0,354**	0,041	0,217	-0,075	0,031	0,358**	0,094	0,306*	0,209	0,161
IE60	-0,171	-0,068	0,056	-0,187	0,213	-0,135	-0,114	-0,061	-0,112	0,070	-0,137	0,057	-0,012
FS	0,119	0,263	-0,101	0,277	0,055	0,466*	-0,067	-0,111	0,228	0,011	0,124	0,002	-0,030

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral), Leuc: leucocitos, NF: neutrófilos

IV.2.b. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico

Comparación en función del sexo

Dado que las variables hemorreológicas pueden comportarse de forma diferente en hombres y en mujeres, se compararon dichas variables entre ambos sexos en el grupo de casos. El Htc fue significativamente superior en hombres que en mujeres ($46,1 \pm 2,33 \%$ vs $40,8 \pm 2,39 \%$, $p < 0,001$), así como la VP ($1,31 \pm 0,077$ cP vs $1,26 \pm 0,055$ cP, $p = 0,027$). La VS_n 230 también fue significativamente mayor en hombres que en mujeres, pero las diferencias desaparecieron al ajustar por Htc ($4,85 \pm 0,456$ cP vs $4,22 \pm 0,376$ cP, $p < 0,001$, p ajustada para Htc = 0,315). Los valores de hierro fueron también superiores en los pacientes obesos hombres que en las pacientes obesas mujeres ($92,6 \pm 30,18$ $\mu\text{g/dL}$ vs $66,5 \pm 26,69$ $\mu\text{g/dL}$, $p = 0,002$). Los demás parámetros reológicos y los lípidos de la membrana eritrocitaria no mostraron diferencias entre ambos sexos en el grupo de casos.

Comparación en función del índice de masa corporal

La Tabla 30 muestra los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos divididos por IMC mayor o igual a 45 kg/m^2 , e IMC menor a 45 kg/m^2 . Se observaron mayores cifras de Fbg ($p = 0,008$), VP ($p < 0,001$), VS_n 230 ($p = 0,030$), AE₁ ($p = 0,014$) y Htc ($p = 0,007$) en los casos con mayor IMC, comparados con los casos con menor IMC. Se observó una tendencia no significativa de los demás parámetros de AE a ser superiores en los casos con IMC mayor o igual a 45 kg/m^2 . Dado que los pacientes obesos hombres tenían mayor IMC que las pacientes obesas mujeres, se ajustó por sexo, manteniéndose las diferencias entre ambos grupos para Fbg ($p = 0,014$), VP ($p = 0,005$) y AE₁ ($p = 0,026$). La composición lipídica de la membrana eritrocitaria no mostró diferencias entre ambos grupos.

Tabla 30: Valor medio y desviación estándar de los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos con IMC mayor o menor de 45 kg/m²

Variable	Casos con IMC <45 kg/m ² (n = 31)	Casos con IMC ≥ 45 kg/m ² (n = 36)	p	p ajustada por sexo
Edad (años)	34,5 ± 11,78	35,9 ± 9,50	0,587	
Sexo (M / H)	28 / 3	23 / 13	0,011	
Tabaco (sí / no)	15 / 16	14 / 22	0,434	
Fbg (mg/dL)	302 ± 47,3	337 ± 51,1	0,008	0,014
VP (cP)	1,24 ± 0,04	1,29 ± 0,071	<0,001	0,005
VSn 230 (cP)	4,24 ± 0,449	4,49 ± 0,480	0,030	0,388
VSc 230 (cP)	4,72 ± 0,359	4,78 ± 0,434	0,532	
AE ₀	4,49 ± 0,942	4,94 ± 0,899	0,052	
AE ₁	7,75 ± 1,258	8,57 ± 1,372	0,014	0,026
Ta (s) *	1,62 ± 0,319	1,57 ± 0,325	0,659	
IA10 *	38,9 ± 10,35	37,8 ± 6,91	0,710	
γD (s ⁻¹) *	117,5 ± 34,90	145,1 ± 55,60	0,131	
IE12 (%)	49,4 ± 3,52	48,0 ± 2,82	0,088	
IE30 (%)	55,2 ± 2,61	54,3 ± 2,49	0,154	
IE60 (%)	57,8 ± 2,25	56,7 ± 2,44	0,083	
Htc (%)	41 ± 3,36	43,1 ± 2,88	0,007	0,187
VCM (fL)	89,8 ± 5,06	89,6 ± 3,55	0,858	
HCM (pg)	29,2 ± 2,15	29,4 ± 1,58	0,624	
CHCM (%)	32,6 ± 1,09	32,9 ± 0,97	0,303	
FS (%) **	0,85 ± 0,749	0,99 ± 0,936	0,569	

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, *: determinado en 12 casos con IMC < 45 kg/m² y en 21 casos con IMC ≥ 45 kg/m², **: determinado en 23 casos con IMC < 45 kg/m² y en 26 casos con IMC ≥ 45 kg/m²

Comparación en función de la presencia de síndrome metabólico

Al dividir a los pacientes obesos en base a la presencia o ausencia de SM, se observaron diferencias significativas en los índices de elongación, siendo éstos superiores en el grupo de sujetos obesos con SM (IE30: p=0,014; IE60: p=0,031). Estas diferencias desaparecieron al ajustar por glucosa (p=0,114) y por HOMA (p=0,115). Los parámetros de AE mostraron una tendencia no significativa a ser superiores en los casos con SM. No se

observaron diferencias en la composición lipídica de la membrana eritrocitaria (Tabla 31).

Tabla 31: Valor medio y desviación estándar de los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos con o sin SM

Variable	Casos sin SM (n = 31)	Casos con SM (n = 36)	p
Edad (años)	34,1 ± 10,88	36,3 ± 10,50	0,401
Sexo (M / H)	24 / 7	27 / 9	0,817
Tabaco (sí / no)	11 / 20	18 / 18	0,232
IMC (kg/m ²)	45,9 ± 6,59	46,1 ± 5,64	0,919
Fbg (mg/dL)	321 ± 54,3	320 ± 50,7	0,911
VP (cP)	1,28 ± 0,068	1,27 ± 0,060	0,339
VSn 230 (cP)	4,38 ± 0,419	4,36 ± 0,533	0,843
VSc 230 (cP)	4,74 ± 0,362	4,75 ± 0,434	0,912
AE ₀	4,58 ± 0,967	4,86 ± 0,908	0,221
AE ₁	7,94 ± 1,333	8,41 ± 1,39	0,170
Ta (s) *	1,65 ± 0,367	1,52 ± 0,260	0,261
IA10 *	37,9 ± 9,31	38,4 ± 7,26	0,850
γD (s ⁻¹) *	137,3 ± 60,9	133,0 ± 39,7	0,810
IE12 (%)	49,2 ± 3,31	48,2 ± 3,07	0,178
IE30 (%)	55,5 ± 2,34	54,0 ± 2,57	0,014
IE60 (%)	57,9 ± 2,20	56,6 ± 2,43	0,031
Htc (%)	42,3 ± 3,06	42,0 ± 3,47	0,677
VCM (fL)	89,9 ± 4,19	89,5 ± 4,40	0,632
HCM (pg)	29,6 ± 1,57	29,2 ± 2,07	0,436
CHCM (%)	32,9 ± 1,01	32,6 ± 1,04	0,233
Hierro (μg/dL)	81,1 ± 29,06	65,5 ± 28,37	0,019
FS (%) **	0,82 ± 0,690	1,01 ± 0,961	0,428

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos. *: determinado en 16 casos sin SM y en 17 casos con SM, **: determinado en 22 casos sin SM y en 27 casos con SM

IV.2.c. Efecto de la pérdida de peso

Comparación de las variables hemorreológicas en el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

Tras los 3 meses de dieta, se observó una disminución significativa de la AE₁ (p=0,018), del porcentaje de FS expresada en la hoja externa de la bicapa (p=0,01), y del VCM (p=0,005), como muestra la Tabla 32. Los demás componentes de la membrana eritrocitaria no fueron analizados tras los 3 meses de dieta, dado que no se mostraron alterados en el estudio basal. Los niveles de hierro no se modificaron de forma significativa.

Tabla 32: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos: valor medio y desviación estándar de las variables hemorreológicas tras la dieta

Variable	Casos basal (n = 62)	Casos 3 meses (n = 62)	% cambio	p
VP (cP)	1,27 ± 0,067	1,27 ± 0,068	0,4 ± 4,61	0,615
Fbg (mg/dL)	316 ± 59,6	329 ± 61,6	6,7 ± 17,90	0,173
VSn 230 (cP)	4,38 ± 0,483	4,39 ± 0,403	1 ± 9,96	0,795
VSc 230 (cP)	4,75 ± 0,394	4,78 ± 0,373	1,2 ± 11,01	0,643
AE ₀	4,75 ± 0,936	4,73 ± 0,965	1,1 ± 20,85	0,842
AE ₁	8,22 ± 1,4	7,83 ± 1,285	- 3,4 ± 15,68	0,018
Ta (s) *	1,63 ± 0,309	1,54 ± 0,392	- 5,1 ± 17,86	0,213
IA10 *	37,1 ± 6,32	38,8 ± 6,21	6,2 ± 18,10	0,346
γD (s ⁻¹) *	129 ± 38,3	122,8 ± 54,4	- 0,5 ± 43,78	0,629
IE60 (%)	57,2 ± 2,59	56,7 ± 3,23	- 0,9 ± 5,85	0,230
IE30 (%) **	55,1 ± 2,31	54,7 ± 2,07	- 0,7 ± 3,28	0,286
IE12 (%) **	48,9 ± 2,83	48,7 ± 1,79	- 0,3 ± 4,93	0,653
Htc (%)	42,3 ± 3,29	42,2 ± 2,99	- 0,2 ± 3,77	0,563
VCM (fL)	89,9 ± 3,75	89,2 ± 3,88	- 0,8 ± 2,15	0,005
HCM (pg)	29,4 ± 1,59	29,5 ± 1,59	0,1 ± 2,67	0,814
CHCM (%)	32,8 ± 0,98	33,0 ± 1,03	0,6 ± 2,55	0,102
FS (%) ***	0,80 ± 0,631	0,43 ± 0,330	- 11,7 ± 97,52	0,010

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético, % cambio: porcentaje de cambio respecto al valor basal, *: determinado en 21 casos, **: determinado en 52 casos, ***: determinado en 29 casos

Las Figuras 22 y 23 muestran la variación de los parámetros hemorreológicos en el grupo de casos tras el tratamiento dietético.

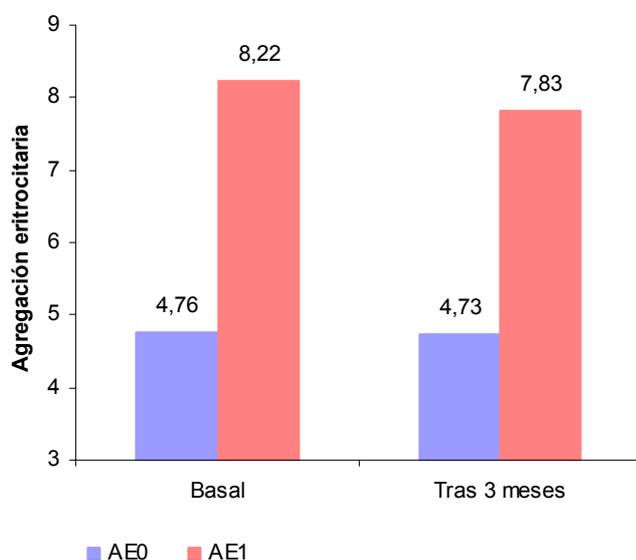


Figura 22: Variación de la AE en el grupo de casos. Resultados presentados como media. Basal: valores en el momento inicial. Tras 3 meses: valores tras 3 meses de dieta

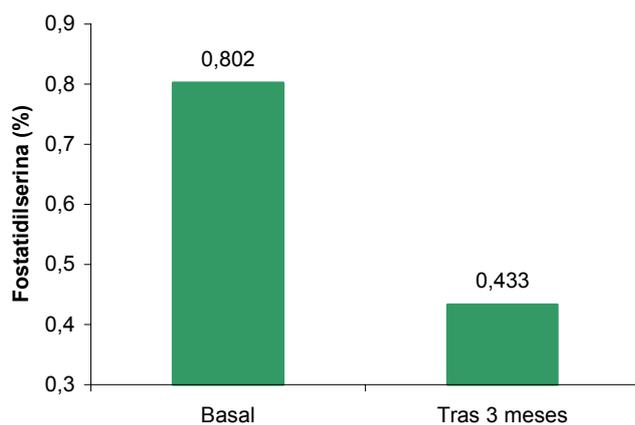


Figura 23: Variación de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria en el grupo de casos. Resultados presentados como media. Basal: valores en el momento inicial. Tras 3 meses: valores tras 3 meses de dieta

La Tabla 33 muestra la variación de los parámetros hemorreológicos antes y después del tratamiento dietético en el grupo de casos con una pérdida ponderal mayor o igual al 10% de su peso inicial. Se observó un descenso significativo de la AE₁ (p=0,021) en los sujetos con mayor pérdida de peso.

Tabla 33: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos con pérdida de peso mayor o igual al 10%: valor medio y desviación estándar de las variables hemorreológicas

Variab les	Casos basal (n = 23)	Casos 3 meses (n = 23)	% cambio	p
VP (cP)	1,28 ± 0,063	1,27 ± 0,062	- 0,5 ± 4,78	0,586
Fbg (mg/dL)	320 ± 53,9	348 ± 61,2	9,5 ± 20,93	0,173
VSn 230 (cP)	4,46 ± 0,457	4,48 ± 0,276	1,3 ± 11,38	0,825
VSc 230 (cP)	4,73 ± 0,405	4,79 ± 0,232	2,1 ± 13,63	0,634
AE ₀	4,79 ± 0,757	4,84 ± 0,82	2,6 ± 20,39	0,783
AE ₁	8,42 ± 1,254	7,79 ± 1,317	- 6,8 ± 13,62	0,021
Ta (s) *	1,68 ± 0,163	1,60 ± 0,433	- 3 ± 24,76	0,684
IA10 *	38,1 ± 8,55	36,9 ± 6,56	0,9 ± 27,70	0,803
γD (s ⁻¹) *	133,1 ± 33,39	100,7 ± 60,89	- 16,3 ± 57,90	0,309
IE60 (%)	57,0 ± 2,19	57,8 ± 2,29	1,1 ± 4,04	0,261
IE30 (%) **	55,8 ± 1,40	55,0 ± 1,31	- 1,4 ± 2,45	0,225
IE12 (%) **	49,6 ± 2,14	48,5 ± 1,54	- 2,1 ± 3,13	0,148
FS (%) ***	0,84 ± 0,640	0,52 ± 0,429	- 8,6 ± 79,67	0,184

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético, % cambio: porcentaje de cambio respecto al valor basal, *: determinado en 7 casos, **: determinado en 19 casos, ***: determinado en 12 casos

Se analizaron los parámetros hemorreológicos antes y después del tratamiento dietético, en el grupo mujeres obesas y en el grupo de hombres obesos, por separado. En el grupo de mujeres obesas, el Fbg aumentó de forma significativa (313 ± 54,42 mg/dL vs 337 ± 60,47 mg/dL, p=0,005), así como el índice de agregación Ta (35,4 ± 3,85 vs 39,7 ± 4,91, p=0,007). La FS disminuyó significativamente en las mujeres obesas (0,80 ± 0,626 % vs 0,33 ± 0,220 %, p=0,003). Sin embargo, en los hombres obesos los niveles de Fbg se

mantuvieron sin cambios ($332 \pm 49,1$ mg/dL vs $333 \pm 58,3$ mg/dL, $p=0,946$), así como el resto de parámetros estudiados excepto la AE_1 ($8,52 \pm 1,545$ vs $7,87 \pm 1,478$, $p=0,021$).

Correlaciones de las variables hemorreológicas en el grupo de casos tras la dieta

Se repitió el estudio de correlaciones con los valores obtenidos tras 3 meses de tratamiento dietético. La Tabla 34 muestra el estudio de correlaciones observadas entre los parámetros hemorreológicos y los parámetros antropométricos en el grupo de casos. Destaca la desaparición de las correlaciones entre Fbg, VP e IE60, y peso y/o IMC, presentes antes de la dieta.

Tabla 34: Correlación entre los parámetros hemorreológicos y los parámetros antropométricos en el grupo de casos tras 3 meses de dieta

	Peso	IMC	Cintura	icc
Fbg	0,160	0,128	0,220	0,095
VP	0,241	0,153	0,391**	0,345*
VSn 230	0,464**	0,303*	0,392**	0,438**
VSc 230	-0,142	-0,038	-0,069	-0,104
AE₀	0,045	0,183	0,138	0,169
AE₁	0,126	0,277*	0,186	0,186
IE60	-0,140	-0,135	-0,312*	-0,114
FS	0,364*	0,042	0,414*	0,530**

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

La Tabla 35 muestra los grados de correlación observados entre los parámetros hemorreológicos, bioquímicos y hormonales, en el grupo de casos tras 3 meses de dieta. Por otra parte, se mantuvo la ausencia de correlación entre la FS y la AE o el fragmento F1+2, así como la correlación significativa entre Fbg y AE_0 ($r=0,328$, $p<0,05$) y AE_1 ($r=0,317$, $p<0,05$).

Tabla 35: Correlaciones entre los parámetros hemorreológicos y los parámetros bioquímicos y hormonales en el grupo de casos tras 3 meses de dieta

	Glucosa	LDL	HDL	ApoB	ApoA	TG	HOMA	Insulina	TNF- α	IL-6	PCR	Leuc	NF
Fbg	< 0,001	-0,058	-0,254	-0,002	-0,119	0,037	0,265	0,245	0,168	0,580**	0,593**	0,421**	0,497**
VP	0,244	-0,108	-0,085	0,058	-0,054	0,140	0,160	0,117	0,188	0,203	0,171	0,238	0,242
VSn 230	0,102	0,298*	-0,179	0,234	-0,058	0,154	0,318*	0,315*	0,037	-0,027	0,227	0,160	0,034
VSc 230	-0,110	0,076	0,023	-0,069	0,119	-0,023	-0,181	-0,168	-0,255	-0,173	-0,125	-0,328*	-0,332*
AE₀	0,005	0,240	-0,097	0,219	0,025	0,196	0,148	0,166	-0,130	0,118	0,336*	0,056	0,018
AE₁	0,190	0,041	-0,059	0,165	-0,010	0,258	0,319**	0,311**	0,011	0,217	0,292*	0,034	0,006
IE60	-0,020	-0,034	0,302*	-0,154	0,117	-0,115	-0,161	-0,167	-0,044	-0,044	0,254	0,070	0,005
FS	-0,088	0,095	-0,286	0,199	-0,185	0,079	0,294	0,313	0,033	-0,060	0,142	0,223	0,217

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral). Leuc: leucocitos. NF: neutrófilos

Correlaciones de los porcentajes de cambio de las variables hemorreológicas:

Se analizó en el grupo de pacientes obesos la existencia de posibles correlaciones entre los cambios observados en las variables hemorreológicas, y los cambios de las demás variables (Tabla 36 y Figura 24). Se observó una correlación positiva significativa entre el porcentaje de cambio de AE_1 y el porcentaje de cambio de peso ($r=0,358$, $p<0,001$), así como entre el porcentaje de cambio de AE_1 y el porcentaje de cambio de IMC ($r=0,272$, $p<0,001$).

Tabla 36: Correlación entre los porcentajes de cambio de las variables en el grupo de casos

	% peso	% IMC	% cintura	% glucosa	% TG	% CT	% HOMA
% Fbg	-0,083	-0,133	0,075	-0,087	-0,093	0,103	0,072
% AE_1	0,358**	0,272*	0,246	0,116	0,187	0,109	0,123
% FS	0,016	0,022	0,179	-0,009	0,007	0,151	0,058

%. porcentaje de cambio de la variable respecto al valor basal, *: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

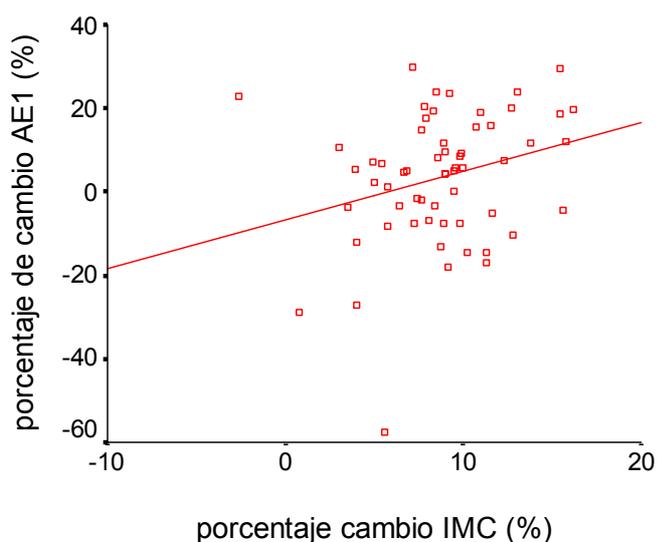


Figura 24: Correlación entre el porcentaje de cambio de AE_1 y el porcentaje de cambio de IMC en el grupo de casos

IV.3. HEMOSTASIA

IV.3.a. Resistencia a la proteína C activada

IV.3.a.1. Comparación entre casos y controles

Un control y 4 casos presentaron la mutación genética del factor V Leiden. Estos pacientes fueron excluidos del análisis de R-PCa. Del resto de sujetos, sólo un control mostró Rs-PCa y Rsn-PCa inferiores a los límites de la normalidad. Así, ningún caso presentó R-PCa adquirida. No se observaron diferencias entre casos y controles en Rs-PCa y Rsn-PCa (Tabla 37).

Tabla 37: Valor medio y desviación estándar de R-PCa en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 59)	Controles (n = 64)	p
Rs-PCa	2,62 ± 0,351	2,52 ± 0,310	0,183
Rsn-PCa	0,91 ± 0,136	0,95 ± 0,163	0,094

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Las Tablas 38 y 39 muestran las correlaciones en estado basal. Se observó en el grupo de casos una correlación positiva entre Rsn-PCa y cintura ($r=0,269$, $p=0,05$), y entre Rs-PCa y PCR ($r=0,320$, $p=0,05$). En el grupo control, se observó una correlación positiva entre Rs-PCa y TG ($r=0,261$, $p=0,05$).

Tabla 38: Correlaciones de la R-PCa en el grupo de casos en situación basal

	Rs-PCa	Rsn-PCa
IMC	0,082	0,110
Cintura	0,249	0,269*
LDL	0,211	0,013
TG	0,206	0,179
Fibrinógeno	-0,021	-0,125
PCR	0,320*	0,240
HOMA	0,028	-0,109

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

Tabla 39: Correlaciones de R-PCa en el grupo control en situación basal

	Rs-PCa	Rsn-PCa
IMC	0,054	-0,040
Cintura	0,017	-0,009
LDL	-0,007	0,093
TG	0,261*	0,169
Fibrinógeno	0,035	0,158
PCR	-0,092	0,070
HOMA	-0,029	-0,066

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

IV.3.a.2. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico

Al comparar la R-PCa en el grupo de casos en función del sexo, no se observaron diferencias entre hombres y mujeres. Los hombres obesos presentaron un valor medio de Rs-PCa de $2,62 \pm 0,292$, y las mujeres obesas de $2,62 \pm 0,292$ ($p=0,980$). Asimismo, la Rsn-PCa en hombres obesos fue de $0,88 \pm 0,108$, y en mujeres obesas de $0,92 \pm 0,144$ ($p=0,416$).

Al dividir el grupo de casos en pacientes con IMC mayor o igual a 45 kg/m^2 , y pacientes con IMC menor de 45 kg/m^2 , no se observaron diferencias

entre ambos grupos (Tabla 40), ni tampoco al dividirlos en función de la presencia o ausencia de SM (Tabla 41).

Tabla 40: Valor medio y desviación estándar de la R-PCa en el grupo de casos con IMC mayor o menor de 45 kg/m²

Variable	Casos con IMC <45 kg/m ² (n = 27)	Casos con IMC ≥ 45 kg/m ² (n = 32)	p
Rs-PCa	2,57 ± 0,325	2,66 ± 0,371	0,325
Rsn-PCa	0,91 ± 0,129	0,91 ± 0,143	0,961

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Tabla 41: Valor medio y desviación estándar de la R-PCa en el grupo de casos con o sin SM

Variable	Casos sin SM (n = 27)	Casos con SM (n = 32)	p
Rs-PCa	2,55 ± 0,389	2,69 ± 0,309	0,120
Rsn-PCa	0,89 ± 0,142	0,93 ± 0,129	0,228

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

IV.3.a.3. Efecto de la pérdida de peso

Comparación de la resistencia a la proteína C activada en el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

No se observaron cambios significativos en la R-PCa tras 3 meses de tratamiento dietético en el grupo de casos (Tabla 42). Igualmente, en el grupo control no se observaron cambios significativos en la R-PCa determinada tras 3 meses. Al estudiar sólo a los pacientes obesos con pérdida de peso superior o igual al 10%, tampoco se encontró mejoría tras el tratamiento dietético.

Tabla 42: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos: valor medio y desviación estándar de la R-PCa

Variable	Casos basal (n = 54)	Casos 3 meses (n=54)	p
Rs-PCa	2,58 ± 0,365	2,62 ± 0,352	0,403
Rsn-PCa	0,91 ± 0,139	0,92 ± 0,136	0,573

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

IV.3.b. Niveles de proteína C activada

IV.3.b.1. Comparación entre casos y controles

La Tabla 43 y la Figura 25 muestran las diferencias en los niveles de PCa entre casos y controles. Se observa que, en situación basal, el nivel medio de PCa, PC y F1+2 es significativamente mayor en el grupo de casos que en el grupo control (p=0,001, p=0,015 y p=0,01, respectivamente).

Tabla 43: Valor medio y desviación estándar de los niveles de PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n = 66)	p
PCa (ng/mL)	1,48 ± 0,596	1,18 ± 0,339	0,001
PC (%)	109,6 ± 20,78	101,3 ± 17,60	0,015
F1+2 (nM)	0,78 ± 0,194	0,69 ± 0,206	0,010

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

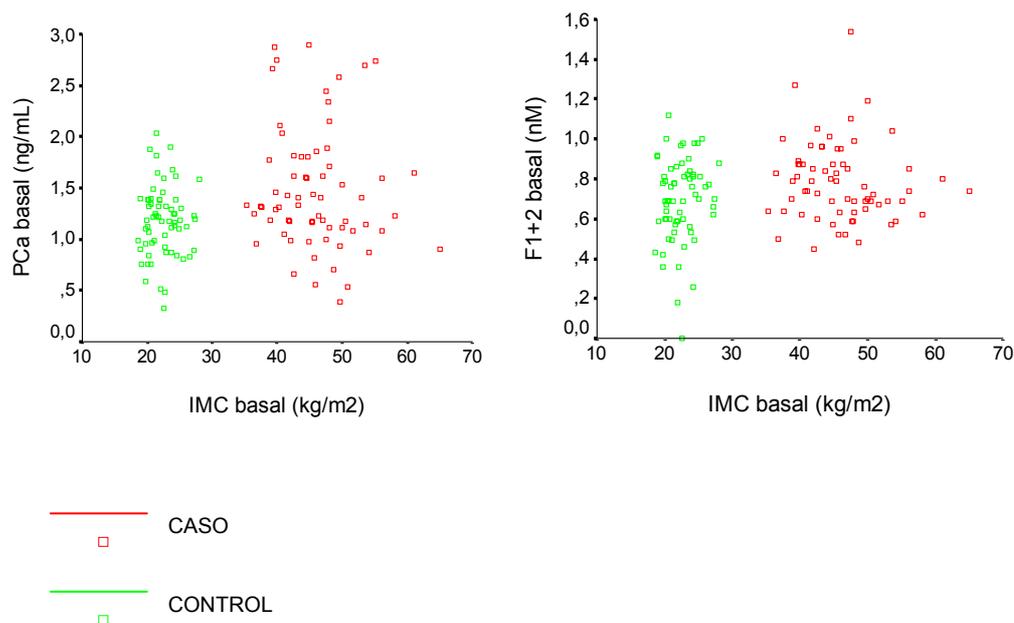


Figura 25: Niveles de PCa y F1+2 en el grupo de casos y en el grupo control en relación al IMC

Estudio de correlaciones

La Tabla 44 muestra las correlaciones encontradas entre PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos y en el grupo control. Se observó una correlación significativa entre los niveles de PCa y los de F1+2 en el grupo control, pero no en el grupo de casos en situación basal. No se encontró correlación entre los niveles de PCa, PC o F1+2, y los parámetros antropométricos (peso, IMC) o metabólicos (glucosa, TG, HDL, LDL, HOMA).

Tabla 44: Correlaciones entre PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos y en el grupo control

Variable	Casos	Controles
	PCa	PCa
PC	-0,007	0,175
F1+2	0,203	0,364**

** : correlación positiva a $p < 0,01$ (bilateral)

IV.3.b.2. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico

Al comparar los niveles de PCa en los casos en función del sexo, no se observaron diferencias entre hombres y mujeres ($1,47 \pm 0,761$ y $1,49 \pm 0,545$ respectivamente, $p=0,978$), ni tampoco en los niveles de F1+2 ($0,72 \pm 0,154$ y $0,80 \pm 0,203$ respectivamente, $p=0,143$). Sin embargo, se observaron niveles significativamente superiores de PC en los hombres obesos comparados con las mujeres obesas ($119,8 \pm 19,34$ y $106,4 \pm 20,3$ respectivamente, $p=0,023$).

No observamos diferencias en ninguno de los parámetros del sistema de la PC estudiados al comparar a los sujetos obesos con IMC mayor o igual a 45 kg/m^2 con aquellos con IMC menor de 45 kg/m^2 (Tabla 45), así como al dividirlos en función de la presencia o ausencia de SM (Tabla 46).

Tabla 45: Valor medio y DE de los niveles de PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos con IMC mayor o menor de 45 kg/m^2

Variable	Casos con IMC $<45 \text{ kg/m}^2$ (n = 31)	Casos con IMC $\geq 45 \text{ kg/m}^2$ (n = 36)	p
PCa (ng/mL)	$1,58 \pm 0,575$	$1,40 \pm 0,610$	0,228
PC (%)	$106,0 \pm 21,3$	$112,7 \pm 20,11$	0,193
F1+2 (nM)	$0,80 \pm 0,173$	$0,77 \pm 0,212$	0,446

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Tabla 46: Valor medio y DE de los niveles de PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos con o sin SM

Variable	Casos sin SM (n = 31)	Casos con SM (n = 36)	p
PCa (ng/mL)	$1,43 \pm 0,601$	$1,53 \pm 0,597$	0,487
PC (%)	$113,5 \pm 22,35$	$106,2 \pm 18,99$	0,152
F1+2 (nM)	$0,81 \pm 0,195$	$0,76 \pm 0,194$	0,299

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

IV.3.b.3. Efecto de la pérdida de peso

Comparación del sistema de la proteína C en el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

Se observó en el grupo de casos un descenso significativo de los niveles de PCa ($p=0,043$) y de F1+2 ($p=0,025$), y un descenso de los de PC al límite de la significación estadística ($p=0,067$) (Tabla 47 y Figura 26).

Tabla 47: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos: valor medio y desviación estándar de la PCa, PC y F1+2

Variable	Casos basal (n = 62)	Casos 3 meses (n=62)	% cambio	p
PCa (ng/mL)	1,50 ± 0,617	1,39 ± 0,558	- 1,3 ± 36,16	0,043
PC (%)	110,1 ± 21,46	107,1 ± 20,96	- 2,2 ± 11,83	0,067
F1+2 (nM)	0,77 ± 0,199	0,71 ± 0,181	- 4,6 ± 27,8	0,025

% cambio: porcentaje de cambio de la variable respecto al valor basal, p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

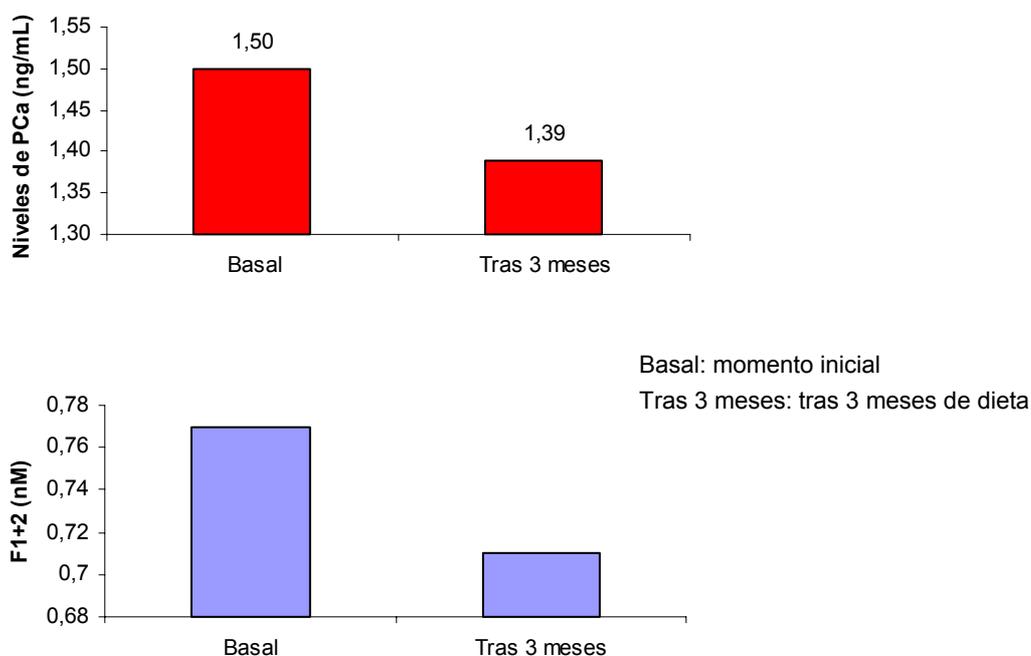


Figura 26: Variación de los niveles plasmáticos de PCa y de F1+2 en el grupo de casos. Resultados presentados como media

No se observaron cambios en el grupo control. La Tabla 48 muestra los cambios de PCa y F1+2 aumentan al estudiar únicamente a los pacientes que perdieron 10% del peso inicial o más ($p=0,007$ y $p=0,025$, respectivamente), haciéndose además significativo el descenso de los niveles de PC ($p=0,016$).

Tabla 48: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos con pérdida de peso mayor o igual al 10%: valor medio y desviación estándar de PCa, PC y F1+2

Variable	Casos basal (n = 23)	Casos 3 meses (n=23)	% cambio	p
PCa (ng/mL)	1,64 ± 0,658	1,40 ± 0,559	- 11,1 ± 24,81	0,007
PC (%)	106,4 ± 20,18	101,0 ± 18,64	- 4,5 ± 9,60	0,016
F1+2 (nM)	0,79 ± 0,208	0,65 ± 0,141	- 12,2 ± 30,31	0,012

% cambio: porcentaje de cambio respecto a la variable basal, p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

Estudio de correlaciones en el grupo de casos tras 3 meses de tratamiento dietético

La Tabla 49 muestra las correlaciones entre PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos tras la pérdida de peso. Aparece una correlación significativa en el grupo de casos entre los niveles de PCa y los de F1+2, que no existía en situación basal. No se observó correlación con los parámetros antropométricos o metabólicos. No se observó correlación entre el porcentaje de cambio de PCa y el porcentaje de cambio de F1+2, PC, IMC o HOMA. Se observó una correlación fuerte ($r=0,595$, $p=0,01$) entre los niveles basales de F1+2 y el porcentaje de descenso de F1+2 en el grupo de casos.

Tabla 49: Correlaciones entre PCa, PC y F1+2 en el grupo de casos tras 3 meses de tratamiento dietético

	PCa 3 meses
PC 3 meses	-0,099
F1+2 3 meses	0,374**

** : correlación positiva a $p<0,01$ (bilateral)

IV.4. FIBRINOLISIS

IV.4.a. Comparación entre casos y controles

Comparación de los niveles de PAI-1 entre casos y controles

La Tabla 50 muestra la comparación de los parámetros fibrinolíticos entre el grupo de casos y el grupo control. Se observa que los niveles de PAI-1ag, PAI-1fc y t-PA son significativamente superiores en los pacientes obesos ($p < 0,001$). La Figura 27 ilustra estos resultados.

Tabla 50: Valor medio y desviación estándar de las variables fibrinolíticas en el grupo de casos y en el grupo control, en situación basal

Variable	Casos (n = 67)	Controles (n=67)	p	p ajustada
PAI-1ag (ng/mL)	43,5 ± 21,87	11,7 ± 7,42	<0,001	0,011
PAI-1fc (U/mL)	30,0 ± 15,74	5,3 ± 6,10	<0,001	0,004
t-PA (ng/mL)	11,6 ± 4,09	6,4 ± 2,85	<0,001	0,162

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos. p ajustada: valor obtenido ajustando por IMC, cintura, glucosa, LDL, HDL, TG y HOMA

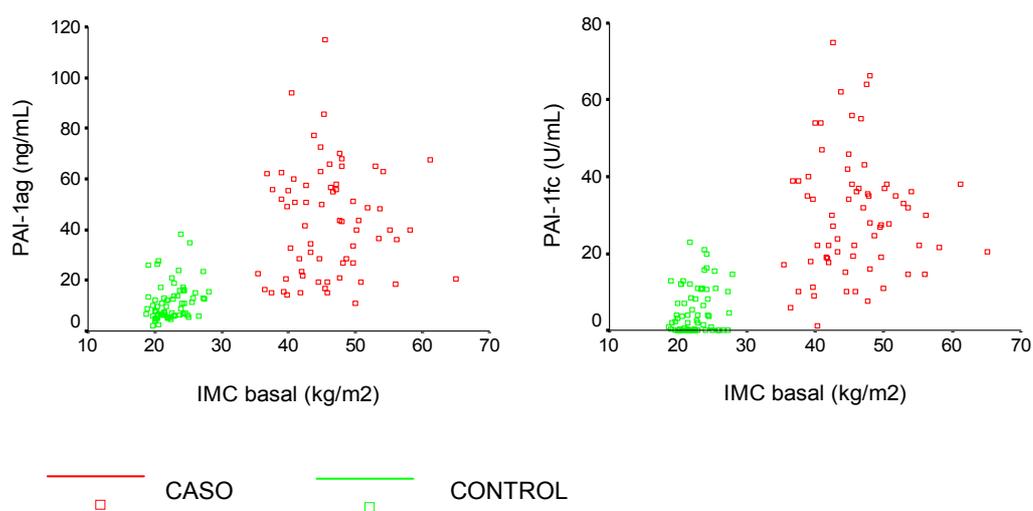


Figura 27: Niveles de PAI-1 en el grupo de casos y en el grupo control en relación al IMC

Se realizó el estudio de correlaciones en el grupo de casos y en el grupo control (Tablas 51 y 52). En el grupo de casos, el PAI-1 presentó una correlación positiva significativa con insulina y HOMA, estando al límite de la significación estadística para PAI-1fc y HOMA ($p=0,094$). Además, presentó una correlación negativa con el colesterol HDL. No hubo correlación en este grupo entre los niveles de PAI-1 y el IMC, ni entre los niveles de PAI-1 y la cintura. Sin embargo, en el grupo control, se observó una correlación positiva significativa entre PAI-1 e IMC, cintura y leptina. La correlación entre el PAI-1 y los marcadores de RI no fue significativa en este grupo.

Tabla 51: Correlaciones de los parámetros fibrinolíticos en el grupo de casos

	PAI-1ag	PAI-1fc
IMC	0,012	0,009
Cintura	0,037	0,070
Glucosa	0,186	0,206
LDL	0,074	-0,089
HDL	-0,240*	-0,259*
TG	0,156	0,142
Leptina	-0,362*	-0,167
Insulina	0,248*	0,236*
HOMA	0,240*	0,206

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

Tabla 52: Correlaciones de los parámetros fibrinolíticos en el grupo control

	PAI-1ag	PAI-1fc
IMC	0,243*	0,219
Cintura	0,406**	0,315*
Glucosa	-0,103	0,040
LDL	0,202	0,107
HDL	-0,194	-0,129
TG	0,186	0,154
Leptina	0,281*	0,215
Insulina	0,224	0,115
HOMA	0,211	0,135

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

Estudio del genotipo 4G/5G y su relación con los niveles de PAI-1

Como muestran las Tablas 53 y 54, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos al comparar la frecuencia de los distintos genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del promotor del PAI-1 en el grupo de casos y en el grupo control. Tampoco se observaron diferencias al comparar la frecuencia de la presencia o ausencia del alelo 4G, aunque se observó una tendencia no significativa a la mayor presencia de alelo 4G en los sujetos obesos comparados con el grupo control.

Tabla 53: Frecuencia de los distintos polimorfismos 4G/5G del gen del PAI-1 (4G/4G, 4G/5G, 5G/5G) en el grupo de casos y en el grupo control

Genotipo PAI-1	Casos (n = 67)	Controles (n = 67)	p
4G/4G	14 (21%)	16 (24%)	0,234
4G/5G	42 (63%)	33 (49%)	
5G/5G	11 (16%)	18 (27%)	

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Tabla 54: Frecuencia de los distintos polimorfismos 4G/5G del gen del PAI-1 (presencia o ausencia del alelo 4G) en el grupo de casos y en el grupo control

Genotipo PAI-1	Casos (n = 67)	Controles (n = 67)	p	OR para 4G
Presencia de 4G (4G/4G o 4G/5G)	56 (84%)	49 (73%)	0,142	1,870 (0,805-4,342)
Ausencia de 4G (5G/5G)	11 (16%)	18 (27%)		

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos, OR para 4G: *odds ratio* para la presencia del alelo 4G, intervalo de confianza al 95%

Se compararon los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc en función del genotipo del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 en el grupo de casos y en el grupo control. En el grupo de casos, no se observaron diferencias significativas en los niveles basales de PAI-1 entre los distintos genotipos. En el grupo control, la presencia del alelo 4G se asoció a niveles significativamente mayores de PAI-1fc, y a una tendencia no significativa a niveles mayores de PAI-1ag (Tablas 55 y 56).

Tabla 55: Comparación de los niveles basales de PAI-1 en función del genotipo en el grupo de casos

Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag (ng/mL)	p	PAI-1fc (U/mL)	p
4G/4G	14	43,4 ± 19,65	0,954	27,2 ± 9,96	0,764
4G/5G	42	43,9 ± 21,88		30,8 ± 16,82	
5G/5G	11	41,6 ± 26,21		30,1 ± 18,28	
Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag (ng/mL)	p	PAI-1fc (U/mL)	p
Presencia de 4G (4G/4G o 4G/5G)	56	43,8 ± 21,17	0,765	29,9 ± 15,39	0,977
Ausencia de 4G (5G/5G)	11	41,6 ± 26,21		30,1 ± 18,28	

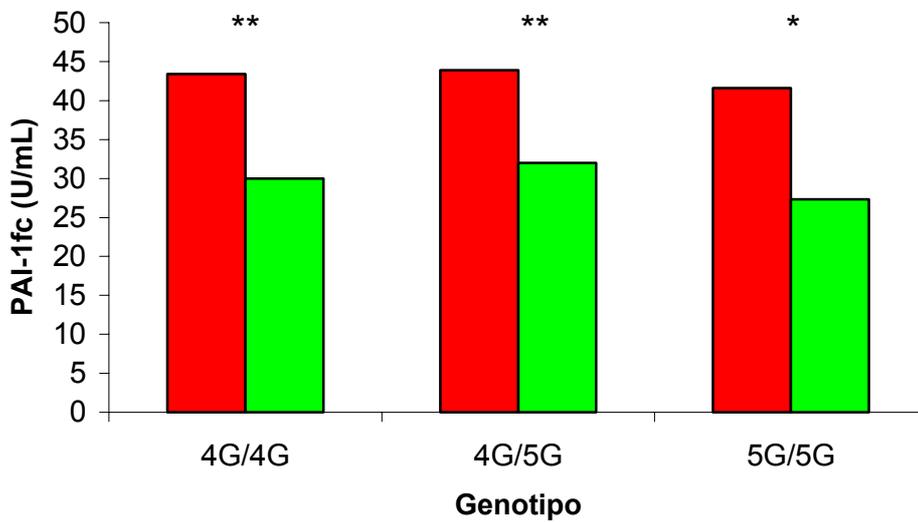
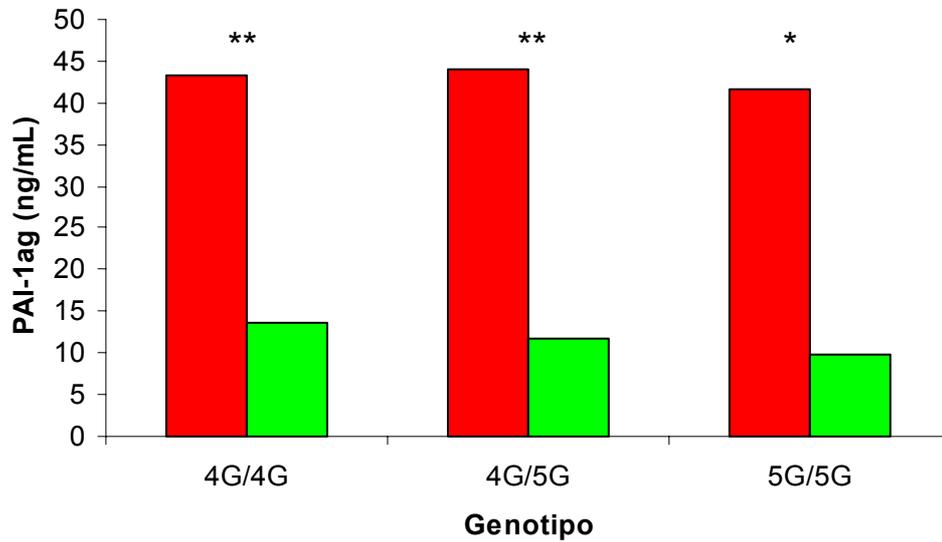
p: valor obtenido al comparar la variable entre los grupos

Tabla 56: Comparación de los niveles basales de PAI-1 en función del genotipo en el grupo control

Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag (ng/mL)	p	PAI-1fc (U/mL)	p
4G/4G	16	13,6 ± 8,21	0,303	6,7 ± 5,62	0,142
4G/5G	33	11,8 ± 8,12		5,9 ± 6,91	
5G/5G	18	9,7 ± 4,75		2,9 ± 4,23	
Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag (ng/mL)	p	PAI-1fc (U/mL)	p
Presencia de 4G (4G/4G o 4G/5G)	49	12,4 ± 8,11	0,094	6,2 ± 6,47	0,022
Ausencia de 4G (5G/5G)	18	9,7 ± 4,75		2,9 ± 4,29	

p: valor obtenido al comparar la variable entre los grupos

Al comparar los niveles de PAI-1 entre casos y controles separados según su genotipo, se observó que los niveles de PAI-1ag y PAI-1 fc fueron significativamente superiores en los primeros, independientemente del genotipo, tal y como muestra la Figura 28.



■ Casos ■ Controles

Figura 28: Comparación de PAI-1 entre el grupo de casos y el grupo control separados por genotipos. Resultados presentados como media.. *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$

IV.4.b. Comparación de los casos en función del sexo, el índice de masa corporal, o la presencia de síndrome metabólico

Los pacientes obesos hombres presentaron niveles medios de PAI-1ag de $43,6 \pm 19,05$ ng/mL, de PAI-1fc de $32,7 \pm 17,69$ U/mL, y de t-PA de $13,6 \pm 5,57$ ng/mL. Las mujeres presentaron niveles medios de $43,4 \pm 22,85$ ng/mL, $29,1 \pm 15,18$ U/mL, y $11 \pm 3,27$ ng/mL, respectivamente ($p=0,979$, $p=0,429$ y $p=0,029$).

No se observaron diferencias significativas al separar los casos por IMC mayor o menor de 45 kg/m^2 , aunque sí una tendencia a niveles más elevados de PAI-1ag y PAI-1fc en los pacientes con mayor IMC (Tabla 57). De igual manera, se observó una tendencia no significativa del grupo de obesos con SM a presentar cifras más elevadas de PAI-1ag y PAI-1fc (Tabla 58).

Tabla 57: Valor medio y desviación estándar de los parámetros fibrinolíticos en el grupo de casos con IMC mayor o menor de 45 kg/m^2

Variable	Casos con IMC < 45 kg/m^2 (n = 31)	Casos con IMC $\geq 45 \text{ kg/m}^2$ (n = 36)	p
PAI-1ag (ng/mL)	$41,7 \pm 21,37$	$45,0 \pm 22,48$	0,549
PAI-1fc (U/mL)	$29,0 \pm 17,70$	$30,8 \pm 14,05$	0,779
t-PA (ng/mL)	$11,3 \pm 4,54$	$12,0 \pm 3,62$	0,545

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Tabla 58: Valor medio y desviación estándar de los parámetros fibrinolíticos en el grupo de casos con o sin SM

Variable	Casos sin SM (n = 31)	Casos con SM (n = 36)	p
PAI-1ag (ng/mL)	$40,8 \pm 25,13$	$45,8 \pm 18,66$	0,109
PAI-1fc (U/mL)	$26,7 \pm 16,67$	$32,8 \pm 14,53$	0,352
t-PA (ng/mL)	$11,2 \pm 3,41$	$12,0 \pm 4,57$	0,406

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

IV.4.c. Efecto de la pérdida de peso

Comparación de los niveles de PAI-1 en el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético

Como muestran la Tabla 59 y la Figura 29, después de los 3 meses de dieta, se observó una disminución significativa de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc ($p < 0,001$). En el grupo control, no se observaron variaciones significativas de los niveles de PAI-1.

Tabla 59: Efecto de la pérdida de peso en el grupo de casos: valor medio y desviación estándar del PAI-1 tras la dieta

Variable	Casos basal (n=60)	Casos 3meses (n=60)	% cambio	p
PAI-1ag (ng/mL)	44,7 ± 19,80	30,9 ± 15,38	- 23,3 ± 39,42	<0,001
PAI-1fc (U/mL)	31,8 ± 15,40	18,6 ± 10,28	- 31,6 ± 41,60	<0,001

p: valor obtenido al comparar el grupo de casos antes y después del tratamiento dietético, % cambio: porcentaje de cambio de las distintas variables respecto a sus valores basales

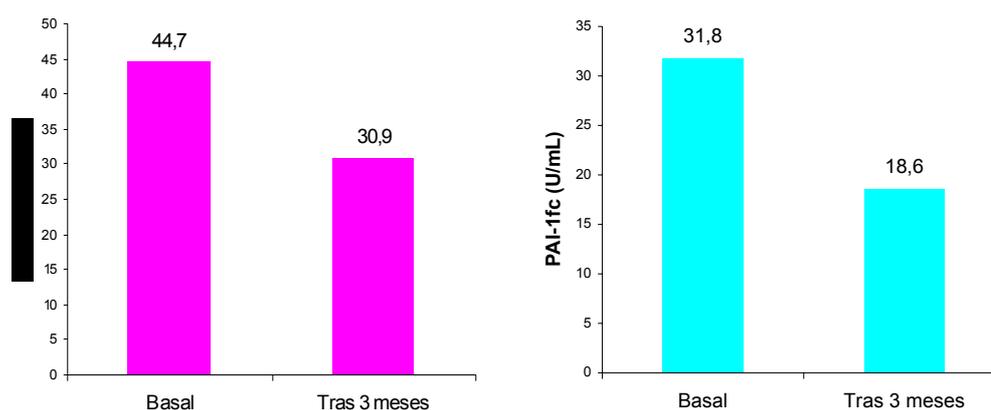


Figura 29: Variación de los niveles de PAI-1 en el grupo de casos. Resultados presentados como media. Basal: valores en el momento inicial. Tras 3 meses: valores tras 3 meses de tratamiento dietético

Al comparar a los pacientes con una pérdida de peso superior o igual al 10% con aquellos con una pérdida de peso inferior al 10%, se observó que los primeros presentaron un porcentaje de cambio de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc significativamente mayor (Tabla 60).

Tabla 60: Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de PAI-1: estratificación según pérdida de peso mayor o menor del 10%

Variable	Casos con pérdida de peso < 10% (n = 37)	Casos con pérdida de peso ≥ 10% (n = 23)	p
% cambio PAI-1ag	15,1	36,8	0,044
% cambio PAI-1fc	22,3	44,4	0,049

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupo, % cambio: porcentaje de cambio de las distintas variables respecto a sus valores basales

Al comparar los niveles de PAI-1 antes y después de la dieta en el grupo de casos separados por sexos, se observó una disminución significativa tanto en hombres (PAI-1ag: $46 \pm 18,07$ ng/mL vs $29,8 \pm 15,27$ ng/mL, $p=0,019$; PAI-1fc: $33,9 \pm 17,6$ ng/mL vs $15 \pm 8,23$ ng/mL, $p=0,003$) como en mujeres (PAI-1ag: $44,5 \pm 20,56$ ng/mL vs $31,2 \pm 15,58$ ng/mL, $p<0,001$; PAI-1fc: $31,1 \pm 14,73$ ng/mL vs $19,9 \pm 10,69$ ng/mL, $p<0,001$).

Genotipo del polimorfismo 4G/5G y niveles de PAI-1 tras el tratamiento dietético

No se observaron diferencias significativas en los niveles de PAI-1 tras 3 meses de dieta entre los distintos genotipos 4G/5G del PAI-1 en el grupo de casos, aunque se apreció una tendencia a mayores niveles de PAI-1ag con la presencia del gen 4G, mucho más marcada que en el estudio basal (Tabla 61).

Tabla 61: Niveles de PAI tras 3 meses de dieta en función del genotipo en el grupo de casos

Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag 3 meses	p	PAI-1fc 3 meses	p
4G/4G	14	30,0 ± 14,78	0,704	16,6 ± 9,79	0,208
4G/5G	36	32,0 ± 15,62		20,5 ± 9,49	
5G/5G	10	27,3 ± 16,49		14,7 ± 12,87	
Genotipo PAI-1	n	PAI-1ag 3 meses	p	PAI-1fc 3 meses	p
Presencia de 4G (4G/4G o 4G/5G)	50	31,5 ± 15,26	0,463	19,4 ± 9,63	0,185
Ausencia de 4G (5G/5G)	10	27,4 ± 16,49		14,7 ± 12,86	

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Los porcentajes de cambio de PAI-1ag y PAI-1fc en el grupo de casos no mostraron diferencias significativas al dividirlos en función del genotipo, aunque se apreció una tendencia a mayor porcentaje de cambio de PAI-1 en ausencia del alelo 4G (Tabla 62). No hubo diferencias al analizar el porcentaje de cambio de IMC en función del genotipo (4G/4G: 8,9 ± 3,56 %, 4G/5G: 8,4 ± 3,81 %, 5G/5G: 9,2 ± 4,17 %, p=0,798), ni de la presencia o ausencia del alelo 4G (8,5 ± 3,70 % y 9,1 ± 4,17 % respectivamente, p=0,596).

Tabla 62: Relación entre genotipo y porcentaje de cambio de PAI-1 en el grupo de casos

Genotipo PAI-1	n	% cambio PAI-1ag	p	% cambio PAI-1fc	p
4G/4G	14	19,2 ± 53,59	0,430	29,8 ± 50,70	0,512
4G/5G	36	22,0 ± 36,01		26,8 ± 40,06	
5G/5G	10	38,5 ± 26,0		53,5 ± 31,08	
Genotipo PAI-1	n	% cambio PAI-1ag	p	% cambio PAI-1fc	p
Presencia de 4G (4G/4G o 4G/5G)	50	21,2 ± 41,2	0,229	27,6 ± 42,65	0,074
Ausencia de 4G (5G/5G)	10	38,5 ± 25,99		53,5 ± 31,08	

% cambio: porcentaje de cambio de las distintas variables respecto a sus valores basales

p: valor obtenido al comparar la variable entre ambos grupos

Correlaciones de los niveles de PAI-1 en el grupo de casos tras la dieta

Se repitió el estudio de correlaciones en el grupo de casos tras 3 meses de dieta (Tabla 63). Apareció una correlación al límite de la significación estadística entre PAI-1fc e IMC ($p=0,051$), que no existía antes del tratamiento. Las correlaciones con los marcadores de RI se hicieron más significativas, y apareció una correlación fuerte con los TG. Apareció asimismo una correlación significativa positiva entre PAI-1fc y leptina.

Tabla 63: Correlaciones de los niveles de PAI-1 en el grupo de casos tras 3 meses de dieta

	PAI-1ag	PAI-1fc
IMC	0,172	0,260
Cintura	0,214	0,185
Glucosa	-0,292*	-0,175
LDL	0,124	-0,166
HDL	-0,215	-0,195
TG	0,421**	0,433**
Leptina	0,019	0,428**
Insulina	0,367**	0,406**
HOMA	0,298*	0,351*

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral)

Correlaciones de los porcentajes de cambio de las variables fibrinolíticas

Se analizó en el grupo de obesos la existencia de posibles correlaciones entre los cambios obtenidos en los niveles de PAI-1, y los cambios en otras variables (Tabla 64 y Figura 30). El porcentaje de cambio de PAI-1ag se correlacionó con el porcentaje de cambio de IMC, mientras que el de PAI-1fc se correlacionó tanto con el de IMC como con el de cintura. Asimismo, tanto el porcentaje de cambio de PAI-1ag como el de PAI-1fc se correlacionaron con sus respectivos niveles basales.

Tabla 64: Correlaciones entre el porcentaje de cambio de PAI-1 y el de otras variables en el grupo de casos

	% cambio PAI-1ag	% cambio PAI-1fc
% cambio IMC	0,342**	0,336*
% cambio cintura	0,129	0,304*
% cambio TG	0,132	0,107
% cambio CT	0,073	0,035
% cambio HOMA	0,225	0,162
% cambio leptina***	0,125	0,354
PAI-1 ag basal	0,450**	0,304*
PAI-1 fc basal	0,392**	0,492**

*: correlación significativa a $p < 0,05$ (bilateral), **: correlación significativa a $p < 0,01$ (bilateral), ***: determinado sólo en 22 casos

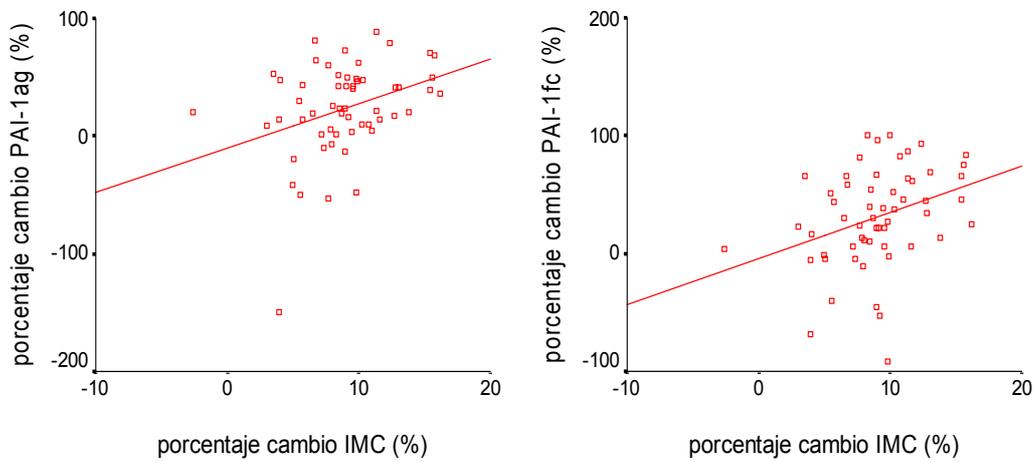


Figura 30: Correlación entre el porcentaje de cambio de PAI-1 y el porcentaje de cambio de IMC

V. DISCUSIÓN

V.1. ALTERACIONES HEMORREOLÓGICAS EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD

V.1.a. Fibrinógeno

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido valorar los niveles de Fbg en un grupo de pacientes obesos sin diabetes mellitus, hiperlipemia o hipertensión arterial, y en un grupo control, así como estudiar si las posibles diferencias pueden explicarse por la RI, y determinar si los niveles de Fbg muestran variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

Hemos encontrado mayores niveles plasmáticos de Fbg en el grupo de pacientes obesos al compararlo con el grupo control. Además, los pacientes con mayor obesidad ($IMC \geq 45 \text{ kg/m}^2$) han presentado un nivel medio de Fbg significativamente superior. Asimismo, se ha evidenciado una correlación significativa en el grupo de pacientes obesos entre Fbg y peso, IMC, y cintura, correlación que no se ha observado en el grupo control. Las diferencias en los niveles de Fbg entre el grupo de casos y el grupo control desaparecen al ajustar por IMC. Diversos estudios que han comparado los niveles de Fbg plasmático en sujetos obesos y sujetos con normopeso han encontrado concentraciones significativamente mayores en los primeros (387-389). Algunos de estos trabajos (389), aunque no todos (383; 387; 425), han encontrado, al igual que en el presente trabajo, una correlación significativa entre el IMC y los niveles de Fbg plasmático. Otros estudios han demostrado, al igual que nosotros, una correlación entre los niveles de Fbg y el icc o la cintura en pacientes obesos (391; 392). La relación entre Fbg y obesidad central es conocida, y la hiperfibrinogenemia se incluye desde hace años en la constelación de alteraciones asociadas a la obesidad abdominal (284; 404; 509).

Utilizando medidas más precisas de distribución de la grasa, como la determinación de grasa visceral por TAC, un estudio encontró mayores niveles de Fbg en hombres sanos con mayor cantidad de grasa visceral (435), pero ni el IMC ni la grasa visceral fueron predictores significativos de los niveles de Fbg cuando se consideraron los niveles de insulina, sugiriendo que el hiperinsulinismo pudiera ser el responsable del aumento de Fbg presente en los pacientes con obesidad central. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis, pues no hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de Fbg y los marcadores de RI, y además las diferencias en los niveles de Fbg entre casos y controles no desaparecen al ajustar por HOMA. Tampoco hemos encontrado niveles de Fbg superiores en los pacientes obesos con SM al compararlos con los pacientes obesos sin SM. En el estudio ECAT, la insulina se asoció de forma significativa e independiente al Fbg, pero la relación disminuyó al ajustar por marcadores de inflamación como leucocitos o PCR (510), lo que sugiere que tras la asociación entre insulina y Fbg se encontrarían implicadas las proteínas de reacción de fase aguda. Nosotros hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de Fbg y los de PCR, tanto en el grupo de casos como en el grupo control.

Otros mecanismos podrían explicar la hiperfibrinogenemia asociada a la obesidad. Por una parte, podría deberse al estímulo de su síntesis hepática por las citoquinas IL-6 y TNF- α (488). No hemos encontrado una correlación significativa entre los niveles de estas citoquinas y los de Fbg, pero los niveles plasmáticos de las citoquinas no siempre reflejan su acción biológica. Por otra parte, los ácidos grasos libres, que se encuentran aumentados en la RI y en la obesidad visceral, podrían, a través de la vena porta, alcanzar el hígado y estimular la síntesis de Fbg (511).

En nuestros pacientes, los niveles elevados de Fbg no han mejorado con la pérdida de peso. Diversos estudios previos han demostrado la ausencia de efectos beneficiosos de la pérdida de peso sobre la hiperfibrinogenemia asociada a la obesidad (387; 399; 400; 423; 426), sin embargo, en otros casos,

la pérdida ponderal se ha traducido en una disminución de sus niveles plasmáticos (389). Una revisión reciente propone que es necesaria una gran pérdida de peso para lograr una disminución significativa de los niveles de Fbg, no siendo suficiente una pérdida de peso moderada (161). En los estudios que han mostrado una disminución de los niveles de Fbg con la pérdida de peso, los pacientes habían perdido al menos el 10% del peso corporal (389; 392; 421; 422), comparado con pérdidas inferiores al 10% en los trabajos donde no se han observado cambios en los niveles de Fbg (424). Probablemente, la pérdida ponderal media obtenida en nuestro estudio (8,5%) fue insuficiente para lograr una mejoría de los niveles plasmáticos de Fbg. No obstante, no todos los estudios con pérdidas superiores al 10% del peso inicial se han acompañado de una disminución de dichos niveles (425; 429).

V.1.b. Viscosidad plasmática

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la VP en un grupo de pacientes obesos sin diabetes mellitus, hiperlipemia o hipertensión arterial, y en un grupo control, así como estudiar si las posibles diferencias pueden explicarse por la RI, y determinar si la VP muestra variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

Nuestros resultados muestran que el paciente obeso presenta una VP significativamente superior al grupo control. Los pacientes más obesos presentan un valor medio de VP significativamente superior a los pacientes con IMC menor de 45 kg/m². Los resultados de la regresión lineal indican que estas diferencias no se deben a la obesidad “*per se*”, sino que serían atribuibles fundamentalmente al aumento del Fbg y a la RI, y, en menor medida, al colesterol LDL. La pérdida de peso no modifica la hiperviscosidad del paciente obeso, a la par que tampoco muestra efectos favorables sobre los niveles de Fbg, pero mejora de forma importante la RI. Asimismo, los

pacientes con SM no han presentado cifras medias de VP superiores a los pacientes sin SM. Todo ello nos induce a pensar que la hiperfibrinogenemia es la principal responsable del aumento de la VP en los pacientes obesos, como lo es en población general. Otros autores han encontrado resultados similares a los nuestros (387; 389; 398). La relación entre la RI y el aumento de la VP podría explicarse por la asociación fisiopatológica entre ambas variables, Fbg y RI. El aumento de la adiposidad, fundamentalmente de distribución central, produce un incremento de la síntesis de IL-6 y TNF- α , citoquinas que por una parte aumentan la RI, y por otra estimulan la síntesis hepática de Fbg y PCR (512). La regresión lineal ha identificado tanto al Fbg como a la RI como predictores independientes de la VP, probablemente debido a un problema de multicolinealidad del modelo (513). Diversos estudios han demostrado, al igual que en el presente trabajo, una asociación entre la RI y el aumento de VP en el paciente obeso (401; 405; 514), concluyendo que el aumento de VP es un marcador de RI.

Respecto a las modificaciones de la VP con la pérdida ponderal, algunos autores han observado, al igual que en el presente trabajo, que el aumento de VP no mejora con la pérdida ponderal (127; 387; 399; 400; 403; 426), aunque otros han encontrado una disminución de la misma (389; 394). En estos últimos trabajos, la pérdida de peso media obtenida fue mayor a la lograda en nuestro estudio: 11% (389) y 16% (394), frente a 8,6%. A la vista de estos datos, parece que el porcentaje de pérdida de peso sería un factor clave en lograr reducciones significativas de la VP en el paciente obeso, al igual que ocurría con los niveles de Fbg. Dado que nuestros resultados indican que el aumento de VP se debe fundamentalmente al aumento de los niveles de Fbg, y éste no ha disminuido con la pérdida de peso, no es de extrañar que la VP tampoco se haya modificado con la misma.

V.1.c. Deformabilidad eritrocitaria

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la DE en un grupo de pacientes obesos sin diabetes mellitus, hiperlipemia o hipertensión arterial, y en un grupo control, así como estudiar si las posibles diferencias pueden explicarse por la RI, y determinar si la DE muestra variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

La DE depende de la relación superficie-volumen del hematíe, de su viscosidad citoplasmática y de las propiedades viscoelásticas de su membrana. Diversos estudios han demostrado que las anemias microcíticas hipocromas hiposiderémicas se asocian a una disminución de la DE cuando ésta se evalúa mediante técnicas ectacitométricas (515), como las utilizadas en el presente trabajo. A pesar de que los hematíes de los pacientes obesos han presentado una discreta microcitosis hipocroma en relación a los controles, probablemente atribuible a la ferropenia evidenciada en estos pacientes, esto no se ha traducido en una menor DE a ninguna de las tensiones de cizallamiento aplicadas, probablemente porque, aunque las diferencias de los índices eritrocitarios eran estadísticamente significativas, no eran clínicamente relevantes (diferencias entre casos y controles de 2% para VCM, 3% para HCM y 1,5% para CHCM). Dado que no se han observado modificaciones en el contenido en colesterol y fosfolípidos de la membrana del hematíe, que como es conocido modulan fuertemente sus propiedades viscoelásticas, y por tanto su deformabilidad, no es de extrañar que no hayamos encontrado un compromiso de la DE en el sujeto obeso. Tampoco hemos observado diferencias en la DE al comparar a los pacientes con $IMC \geq 45 \text{ kg/m}^2$ con aquellos con $IMC < 45 \text{ kg/m}^2$, ni cambios significativos en la misma con la pérdida de peso, coincidiendo con otros autores (516).

La mayoría de autores han encontrado, al igual que en el presente trabajo, que la DE no está disminuida en el paciente obeso (127; 389; 395;

409), aunque otros no han confirmado estos resultados (391; 398; 401; 402). Sin embargo, hay que analizar cuidadosamente la técnica mediante la cual se ha valorado la DE en estos últimos casos. Así, algunos de estos autores han determinado la DE mediante técnicas de filtración de sangre total (391; 402) como la técnica de Reid-Dormandy (517), obteniendo resultados cuestionables, ya que en dicha técnica influye el número de leucocitos, plaquetas y agregados eritrocitarios, que en gran medida taponan los poros de policarbonato de 5 μm de diámetro que han de atravesar los hematíes cuando se deforman al ser sometidos a una presión negativa (518). Otros autores (398) han utilizado técnicas de filtración de suspensiones de hematíes lavados, donde éstos se aíslan previamente mediante centrifugación, columnas de celulosa o de algodón (519), y la DE es analizada directamente en suspensiones de hematíes en tampón fosfato. Sin embargo, las técnicas de aislamiento de hematíes no permiten eliminar totalmente los leucocitos, las plaquetas y los agregados plaquetares, pudiendo éstos taponar igualmente los poros de policarbonato a través de los cuales pasan los hematíes supuestamente aislados en los que se quiere valorar la DE (520). Por otra parte, la manipulación de los eritrocitos en el proceso de aislamiento puede asimismo inducir a error al producir alteraciones morfológicas en los mismos. En otros trabajos se han utilizado técnicas viscosimétricas (401), que estiman la DE a partir de la VS a alto “*shear rate*” (521) y tienen el inconveniente de representar una medida indirecta de la DE. Por todo ello, los resultados obtenidos mediante estas técnicas deben ser valorados con precaución.

Las técnicas ectacitométricas, como la utilizada en el presente trabajo, no están influenciadas por el número de leucocitos, plaquetas ni agregados plaquetares, ya que no son técnicas de filtración, sino que valoran la capacidad de elongación del hematíe tras someterlo a diversas tensiones de cizallamiento, siendo por tanto las más utilizadas en los laboratorios de Hemorreología Clínica. Sólo hemos encontrado en la literatura un trabajo que compare la DE determinada mediante ectacitometría en pacientes obesos y en un grupo control (522). Se trata de un trabajo llevado a cabo en niños donde, al igual que

en el presente estudio, no se observaron diferencias en dicho parámetro hemorreológico entre los niños obesos y los niños con normopeso.

Al clasificar a los pacientes obesos en base a la presencia o ausencia de SM, hemos encontrado que los primeros presentan una DE significativamente inferior. Estas diferencias no serían atribuibles a la composición lipídica de la membrana eritrocitaria, pues ésta fue similar entre ambos grupos. Un trabajo reciente ha encontrado asimismo una disminución de la DE en 19 sujetos obesos con SM (IMC medio 33,3 kg/m²) comparados con un grupo control (512).

Un posible mecanismo responsable de la disminución de la DE en el paciente obeso con SM podría ser el hiperinsulinismo. Los eritrocitos poseen receptores de membrana para insulina (523), y se ha demostrado que, en condiciones normales, la insulina regula, a través de su unión a los mismos, la microviscosidad de la membrana (524), y por tanto la DE (288), de manera que la fluidez de la membrana eritrocitaria se correlaciona con la unión de la insulina a sus receptores de membrana (525). El mecanismo subyacente podría estar relacionado con la función de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa (526), o con un aumento del calcio intracelular (527). Ciertos trabajos indican que, aunque en condiciones fisiológicas la insulina mejora la DE, cuando se administra *in vitro* a concentraciones suprafisiológicas la reduce (288), aunque otros autores no han confirmado estos resultados (528). Hemos encontrado una correlación negativa entre la DE y los índices de RI (HOMA e insulina) en el grupo de pacientes obesos. El SM se caracteriza por la existencia de una RI que se acompaña habitualmente, en pacientes no diabéticos, de niveles elevados de insulina plasmática. Así, el hiperinsulinismo de los pacientes obesos con SM podría ser el responsable de la disminución de la DE que presentan. Algunos autores han analizado la DE en sujetos no diabéticos separados en función de su IMC y de su RI determinada mediante la técnica del modelo mínimo (55), y han encontrado menor DE en los pacientes con obesidad y RI, comparados con aquellos con obesidad sin RI (401), concluyendo que tanto la adiposidad como

la RI aumentan a través de diferentes mecanismos la rigidez del hematíe. Se han publicado trabajos similares en pacientes hipertensos, implicando al hiperinsulinismo en la menor DE de estos pacientes (527).

Otra posible explicación de la disminución de la DE en el paciente obeso con SM podría ser el efecto negativo que la hiperglucemia ejerce sobre la DE. Diversos autores han demostrado que la DE está reducida en pacientes diabéticos (529-531), y que se correlaciona de forma negativa con la glucemia plasmática (532). También se ha observado en otros estudios una DE reducida en pacientes con ITG (533). Es sabido que la ITG y la GBA son frecuentes en los pacientes con SM, constituyendo esta última uno de los criterios diagnósticos del mismo (212). La hiperglucemia podría ser la responsable de la disminución de la DE en nuestro subgrupo de pacientes obesos con SM. De hecho, hemos observado una fuerte correlación negativa en el grupo de pacientes obesos entre los índices de elongación y la glucemia basal.

V.1.d. Agregación eritrocitaria

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la AE en un grupo de pacientes obesos sin diabetes mellitus, hiperlipemia o hipertensión arterial, y en un grupo control, así como estudiar si las posibles diferencias pueden explicarse por la RI, y determinar si la AE muestra variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

Como en el presente estudio, la mayor parte de autores han encontrado un aumento de la AE en los pacientes obesos comparados con un grupo control (389; 394; 401; 405; 407; 408; 410; 534), habiéndose determinado ésta en general con el agregómetro Myrenne, uno de los más utilizados en los laboratorios de Hemorreología Clínica por su fácil manejo y reproducibilidad. La AE no sólo se ha valorado en el presente trabajo con el agregómetro

Myrenne, sino también con el agregómetro Sefam, que proporciona una información más exhaustiva del proceso de AE, valorando la cuantía de los agregados, el tiempo de agregación y el “*threshold*”, es decir la velocidad de cizallamiento sanguíneo necesaria para desagregar los “*rouleaux*”. En este sentido, hemos observado que el paciente obeso no sólo presenta un aumento de la AE valorada con ambos agregómetros, sino que la cohesión de los agregados eritrocitarios formados es mayor. Estos resultados coinciden con los de otros autores que también han valorado la AE con el agregómetro Sefam en pacientes obesos (405; 408).

En condiciones normales, el Fbg es la proteína plasmática con mayor efecto sobre la AE, existiendo una correlación positiva entre sus niveles plasmáticos y los índices de AE (174). La mayoría de los autores han atribuido el aumento de AE en el paciente obeso a la hiperfibrinogenemia concomitante (389; 407), aunque Poggi y cols sugieren la presencia de otros mecanismos, dado que observan una mejoría de la AE con la pérdida de peso, que no se acompaña de una modificación paralela de los niveles de Fbg (394). De igual manera, los resultados de nuestro estudio sugieren que el Fbg no ha sido la causa de la hiperagregabilidad eritrocitaria del paciente obeso, dado que, tras ajustar por dicha variable en la regresión lineal, se mantienen las diferencias de AE entre casos y controles. Además, la pérdida de peso se asocia a una mejoría de la AE, a pesar de la falta de cambio de los niveles de Fbg.

Las lipoproteínas plasmáticas también influyen en condiciones fisiológicas en la AE, habiéndose demostrado que el colesterol LDL y VLDL la aumentan, y el colesterol HDL la disminuye (176; 177). En nuestro trabajo, el aumento de AE en sujetos obesos respecto al grupo control persiste tras ajustar por HDL. Asimismo, la pérdida de peso se acompaña de una mejoría significativa de la AE, mientras que los lípidos plasmáticos no se modifican. Ambos datos sugieren que los lípidos no juegan un papel determinante en el aumento de AE de nuestros pacientes. Esto no es de extrañar, ya que uno de los criterios de exclusión del presente trabajo era la hiperlipemia.

Samocha y cols atribuyen el aumento de AE en el paciente obeso a factores plasmáticos entre los cuales, además del Fbg, incluyen la PCR (410; 420), ya que algunos estudios han sugerido que los niveles de ésta última podrían ejercer algún papel sobre la AE (178-180). En nuestro trabajo, los niveles de PCR se encuentran aumentados en los sujetos obesos, pero las diferencias de AE entre casos y controles no desaparecen tras ajustar por PCR. Asimismo, no hemos encontrado un descenso significativo de la PCR tras la pérdida de peso, en contraposición a la disminución de la AE. Todo ello indica que los niveles elevados de PCR tampoco son responsables del aumento de AE encontrado en el sujeto obeso.

A diferencia de lo que ocurre tras ajustar por Fbg, LDL o PCR, las diferencias de AE entre casos y controles desaparecen tras ajustar por IMC o por HOMA. Tanto el IMC como el HOMA mejoran de forma importante con la pérdida ponderal, al igual que la AE. De hecho, el porcentaje de cambio de AE_1 se correlaciona de forma significativa con el porcentaje de cambio de IMC y de peso. Esto sugiere que el exceso de peso por sí mismo y la RI son los responsables de la mayor AE encontrada en el paciente obeso. Por tanto, en el presente estudio hemos encontrado un aumento de la AE en el paciente obeso, aumento que no se debe al incremento de Fbg ni de los lípidos plasmáticos, sino a la propia obesidad y a la RI.

Pérez-Martín y cols estudiaron a 108 sujetos no diabéticos con sobrepeso y obesidad (IMC medio 29,1 kg/m²), clasificados en función de la RI determinada mediante la técnica del modelo mínimo (55), y encontraron que los pacientes con RI en el cuartil superior presentaban mayor AE, existiendo una correlación positiva entre la RI y la AE. La regresión lineal mostró que la insulinemia era el único determinante de la AE en estos pacientes (405). El mismo grupo estudió posteriormente a 158 sujetos no diabéticos con sobrepeso y obesidad (IMC medio 29,1 kg/m²), divididos por IMC y por RI, no encontrando mayor AE en el grupo de sujetos con mayor IMC, pero sí en el grupo de sujetos con mayor RI (401). Ambos trabajos

concluyen que el aumento de AE es un marcador de hiperinsulinismo, lo que es acorde con los resultados del presente estudio. Los mecanismos a través de los cuales la RI influye sobre la AE en el paciente obeso están por determinar. No parece deberse a factores plasmáticos, dado que ni el Fbg ni la PCR parecen implicados en la hiperagregabilidad del paciente obeso. Parece más bien ser debida a factores celulares del propio eritrocito, que, tal y como se ha comentado previamente, posee receptores de unión para insulina en su membrana (288).

V.1.e. Composición de la membrana del hematíe

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la composición de la membrana del hematíe (cociente colesterol/fosfolípidos, contenido de ácido siálico, y expresión de FS en la porción externa de la membrana) en un grupo de pacientes obesos y en un grupo control.

V.1.e.1) Cociente colesterol / fosfolípidos

La composición de la membrana del hematíe en los pacientes con obesidad ha sido valorada en diversos trabajos. La mayoría de los autores han encontrado, a diferencia de nosotros, un aumento del colesterol de membrana en pacientes obesos comparados con un grupo control (411; 412; 414; 415).

Algunos de estos autores no han excluido a los pacientes con dislipemias moderadas, presentando los pacientes obesos cifras clínica y significativamente superiores de CT plasmático que los controles (412; 415). Es sabido que el colesterol transportado por las lipoproteínas plasmáticas se intercambia con el colesterol libre de la membrana del hematíe, aumentando éste en relación al nivel de hipercolesterolemia plasmática (535). También es conocido que la composición lipídica de la membrana del hematíe es sensible a

pequeños cambios en las lipoproteínas plasmáticas, aunque sus niveles se encuentren en rangos normales (536). Por tanto, el aumento del colesterol de membrana y el aumento del cociente colesterol / fosfolípidos obtenido en los sujetos obesos en los mencionados trabajos podría atribuirse al aumento de los niveles de CT plasmático. En nuestro estudio, los valores de CT superiores a 250 mg/dL constituían un criterio de exclusión, pues nuestro objetivo era valorar el efecto aislado de la obesidad sobre los componentes de la membrana eritrocitaria. Aunque en nuestro trabajo los pacientes obesos también presentaron cifras de CT plasmático superiores a los controles, el valor medio de CT plasmático en los pacientes obesos en los que se determinó la composición de la membrana fue de 194,8 mg/dL, bastante inferior al referido por estos autores, cuyos pacientes obesos presentaron un CT medio plasmático de 208,5 mg/dL (412) y 219 mg/dL (415).

Sin embargo, otros autores han encontrado un mayor cociente colesterol/fosfolípidos en las membranas eritrocitarias de los pacientes obesos incluso habiendo excluido a los pacientes hiperlipémicos (411; 413; 537). Algunos de ellos han atribuido este mayor cociente a un aumento del colesterol de membrana (411), otros a una disminución de los fosfolípidos (413), y otros a ambos factores (414). Se ha demostrado recientemente que existe en el interior del hematíe una cantidad variable de colesterol unido a la hemoglobina en forma de complejos hemoglobina-colesterol (538). Para conseguir membranas eritrocitarias libres de hemoglobina, la técnica utilizada en el presente trabajo incluye un proceso de crio fractura y 6 ciclos de lavados de las membranas fragmentadas. En las técnicas que utilizan la hemólisis para fragmentar las membranas, la eliminación de la hemoglobina de las mismas puede ser incompleta, pudiendo quedar complejos de hemoglobina-colesterol en los restos de las membranas, que se denominan “*ghosts*”. Por tanto, los resultados de los trabajos en los que se ha encontrado un aumento de colesterol de membrana utilizando “*ghosts*” deben ser valorados con precaución (411; 414), ya que este aumento podría deberse a una deficiente eliminación de la hemoglobina de los mismos.

Por otra parte, en algunos de estos estudios no se han expresado los resultados en contenido de colesterol y fosfolípidos por contenido de proteína de membrana, sino en μg de colesterol o de fosfolípidos por 10^8 células (414), o en mmol de colesterol o fosfolípidos por litro (413). Esta estimación es mucho más inexacta que la expresada en forma de contenido de colesterol o fosfolípidos por contenido de proteína de membrana, utilizada por nosotros y por la mayoría de los autores en el momento actual.

Nuestros resultados indican que la obesidad no parece tener por sí misma un efecto sobre la cantidad de colesterol ni de fosfolípidos totales de la membrana eritrocitaria, sino que las alteraciones que se han descrito en estudios previos serían atribuibles a las elevaciones de colesterol plasmático, muchas veces pequeñas, que con frecuencia acompañan a la obesidad. Sin embargo, debemos tener en cuenta que, al haber determinado la composición lipídica de la membrana sólo en 20 casos y 20 controles, la consecuente disminución de la potencia estadística a 70% no excluye que existieran diferencias entre casos y controles que no hayamos podido detectar.

V.1.e.2) Contenido en ácido siálico

En condiciones normales, el contenido en ácido siálico de la membrana del hematíe se relaciona directamente con la AE favoreciendo la repulsión entre los hematíes, ya que contribuye fuertemente a crear la carga global negativa de la superficie celular. En patologías como la hipercolesterolemia, se ha propuesto que el exceso de colesterol plasmático inhibiría la enzima sialil-transferasa, disminuyendo así el contenido en ácido siálico de la membrana eritrocitaria, y contribuyendo al aumento de AE de estos pacientes (539). Hasta la fecha no se han publicado estudios en la bibliografía consultada que valoren el contenido en ácido siálico de la membrana eritrocitaria en el paciente obeso. Hemos considerado importante determinar dicho contenido, dado que su

disminución podría contribuir a la hiperagregabilidad eritrocitaria que presentan estos pacientes.

En la presente serie de sujetos obesos, no se han observado diferencias en el contenido de ácido siálico de la membrana eritrocitaria entre el grupo de pacientes obesos y el grupo control. Los datos obtenidos indican que la obesidad, a diferencia de la hiperlipemia, no modificaría el contenido en ácido siálico de la membrana eritrocitaria. Por tanto, el aumento de AE que tanto nosotros como otros autores han encontrado en el paciente obeso, no podría atribuirse a una disminución del contenido en ácido siálico de la membrana.

V.1.e.3) Expresión de fosfatidilserina en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria

Otro aspecto que se ha valorado en el presente trabajo ha sido la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria. En el presente estudio, observamos que el grupo de pacientes obesos tiene más expresión de FS que el grupo control. Hay un único trabajo publicado por Samocha-Bonet y cols que analiza mediante citometría de flujo la expresión de FS en un grupo de 30 pacientes obesos, comparándolos con un grupo control (420). Estos autores no encuentran diferencias en el porcentaje de FS expresada en la hoja externa de la bicapa. La discrepancia de nuestros resultados con los de dicho estudio no parece deberse a aspectos metodológicos, dado que en ambos casos la técnica utilizada ha sido la citometría de flujo. Las diferencias podrían explicarse por el menor tamaño muestral del trabajo de Samocha-Bonet y cols (30 casos y 30 controles). Por otra parte, hemos encontrado en el presente trabajo que el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa disminuye con la pérdida de peso.

La expresión anormal de FS, aminofosfolípido cargado negativamente, en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria, se ha propuesto como uno de los

mecanismos fisiopatológicos implicados en determinadas enfermedades, tanto hematológicas como no hematológicas. La expresión de FS en la hemicapa externa de la membrana celular puede activar los factores V y X, produciendo una situación de hipercoagulabilidad (418; 419). Se cree que éste es uno de los principales mecanismos protrombóticos implicados en la anemia de células falciformes (540) y en la talasemia (541). En el presente trabajo hemos encontrado que el paciente obeso presenta una hipercoagulabilidad determinada por un aumento del fragmento F1+2, hipercoagulabilidad que mejora con la pérdida ponderal. El aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria del paciente obeso podría ser uno de los mecanismos responsables del estado procoagulante que presentan estos pacientes. No obstante, no hemos encontrado una correlación entre la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa y los niveles de F1+2, ni tampoco entre el porcentaje de cambio de ambas variables tras la pérdida de peso. Esto indica que el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la membrana eritrocitaria no es el único mecanismo procoagulante que puede contribuir al aumento de los niveles de F1+2. De hecho, muchas otras causas de hipercoagulabilidad han sido descritas en el paciente obeso, como el aumento de factor VII (388) y de factor VIII (438), que también pueden influir en el aumento de los niveles de F1+2, y que explicarían la falta de correlación entre la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa, y los niveles de F1+2 .

Es sabido que la AE está condicionada en cierta medida por la composición fosfolipídica de la membrana, ya que cambios en los fosfolípidos de la hoja externa de la bicapa pueden modificar la carga negativa neta global de la membrana, favoreciendo así la adherencia de los eritrocitos al endotelio (542). Mediante estos mecanismos, el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa eritrocitaria podría alterar la carga negativa global de la membrana, aumentando así la AE y la adherencia de los eritrocitos al endotelio, y siendo éste otro posible mecanismo mediante el cual el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa podría favorecer la aparición de fenómenos trombóticos. De hecho, los pacientes con diabetes

mellitus presentan un aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa (543), y se ha propuesto que este mecanismo podría contribuir al aumento de la AE y de la adhesión de los eritrocitos al endotelio vascular que presentan (544; 545). En este sentido, el mencionado aumento de la expresión de FS podría ser uno de los mecanismos responsables de la hiperagregabilidad eritrocitaria en el paciente obeso, produciendo mayores interacciones hematíe-hematíe. Sin embargo, la falta de correlación entre la expresión de FS y la AE determinada con ambos agregómetros en el grupo de pacientes obesos, así como los resultados de la regresión lineal, no nos permiten afirmar que el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa esté relacionado con la hiperagregabilidad eritrocitaria del paciente obeso. Al igual que nosotros, Samocha-Bonet y cols tampoco han encontrado una correlación entre la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa y la AE, sugiriendo que esta modificación en la membrana del hematíe no juega un papel importante en la hiperagregabilidad eritrocitaria del paciente obeso.

Asimismo, se ha descrito que los fosfolípidos de la hoja externa de la bicapa eritrocitaria presentan una mayor libertad de movimiento o fluidez que los que están ubicados en la hoja interna, pudiendo conferirles este hecho mayor deformabilidad (183). Así, el aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa podría causar una disminución de la DE. Sin embargo, no hemos encontrado que dicha alteración de los fosfolípidos repercuta sobre la DE de nuestros pacientes, dado que este parámetro reológico no ha presentado diferencias entre el grupo de casos y el grupo control.

Adicionalmente, la expresión de FS en la capa externa de la membrana eritrocitaria es uno de los mecanismos de reconocimiento de las células dañadas o apoptóticas por parte de los macrófagos (546). Se ha implicado a este mecanismo en el acortamiento de la vida eritrocitaria presente en la anemia de células falciformes (547) y en los pacientes urémicos (548). Así, otra posible consecuencia del aumento de la expresión de la FS en la hoja

externa de la bicapa eritrocitaria en nuestros pacientes, podría ser el acortamiento de su vida media eritrocitaria.

Uno de los posibles mecanismos responsables del aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa del paciente obeso podría ser el estrés oxidativo (549; 550). Los radicales libres generados durante los fenómenos oxidativos pueden atacar a los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana, causando una peroxidación lipídica de la misma, que se acompaña de un aumento de la formación de malonildialdehído, producto final de la peroxidación lipídica (551). La peroxidación lipídica de las membranas eritrocitarias, con la consiguiente formación de malonildialdehído, inactiva la flipasa, lo que provoca un aumento de la expresión de FS en la hoja externa de la bicapa (550). Por tanto, el aumento de la expresión de FS que hemos observado en nuestros pacientes podría estar en relación con los fenómenos oxidativos que acompañan a la obesidad y que disminuyen con la pérdida de peso (123; 131). Sin embargo, no todos los autores han confirmado que los fenómenos oxidativos produzcan una alteración en la disposición de los fosfolípidos de la membrana del hematíe (552).

V.1.f. Viscosidad sanguínea

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la VS en un grupo de pacientes obesos sin diabetes mellitus, hiperlipemia o hipertensión arterial, y en un grupo control, así como estudiar si las posibles diferencias pueden explicarse por la RI, y determinar si la VS muestra variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

En el presente estudio, la VSc se encuentra aumentada en el paciente obeso, y las diferencias entre los pacientes obesos y el grupo control

desaparecen al ajustar por prácticamente todas las demás variables: parámetros antropométricos, lípidos plasmáticos, marcadores de inflamación, marcadores de RI, y parámetros hemorreológicos como Fbg, AE o VP. Esto probablemente sea debido a que se trata de una prueba analítica global donde todas las variables analizadas influyen en mayor o menor medida. Las diferencias se mantienen al ajustar por la DE, como era de esperar, dado que no ha habido diferencias en dicho parámetro hemorreológico entre casos y controles.

Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en los valores de VS_n entre casos y controles. Esto no es de extrañar, dado que el Htc es el principal factor determinante de la VS_n, y este parámetro no ha mostrado diferencias entre los pacientes obesos y el grupo control. Los hombres obesos han presentado valores de VS_n significativamente mayores a las mujeres obesas, que parecen debidos al mayor Htc de los primeros, dado que dichas diferencias desaparecen al ajustar por esta variable. Este aumento del Htc y de la VS_n en hombres se ha descrito igualmente en población general (553), aunque en nuestros pacientes podrían estar ejerciendo un efecto aditivo otros factores, como los elevados niveles de insulinemia encontrados en los hombres obesos, dado que se ha sugerido que la insulina estimula la eritropoyesis (554). Además, los pacientes con obesidad mórbida tienen una frecuencia de síndrome de apneas-hipopneas del sueño que oscila entre 33 y 98% (555), y que es mayor en hombres que en mujeres (409). Dicho trastorno respiratorio produce un aumento del Htc, y podría contribuir al aumento del Htc y de la VS_n presente en los obesos hombres, aunque este aspecto no ha sido objeto del presente trabajo.

No hemos encontrado diferencias al comparar la VS entre los pacientes con $IMC \geq 45 \text{ kg/m}^2$ y los pacientes con $IMC < 45 \text{ kg/m}^2$, ni al compararla entre los pacientes con SM y los pacientes sin SM. Tampoco hemos encontrado cambios en la VS tras la pérdida ponderal. Diversos autores han obtenido resultados similares (389), aunque otros han encontrado una disminución de la VS con la pérdida de peso (127; 384; 387; 400).

V.2. ALTERACIONES DE LA HEMOSTASIA EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD

V.2.a. Resistencia a la proteína C activada

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la existencia de R-PCa adquirida, en un grupo de pacientes obesos y en un grupo control, y determinar si la R-PCa muestra variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

Es conocido que la R-PCa adquirida se asocia a un estado de hipercoagulabilidad sanguínea, ya que produce un aumento de la generación de trombina (218). En el presente estudio se ha valorado la R-PCa mediante la técnica descrita por Dahlback (213; 216), donde un Rs-PCa menor supone una mayor R-PCa. No hemos observado diferencias significativas entre casos y controles, por lo que no parece que éste sea un mecanismo responsable de la hipercoagulabilidad que presenta el sujeto obeso. De igual manera, ninguno de nuestros pacientes obesos ha presentado valores de Rs-PCa o Rsn-PCa por debajo de la normalidad. Tampoco hemos encontrado cambios en la R-PCa en los pacientes obesos tras el tratamiento dietético.

Son muchas las situaciones que se han visto asociadas a una R-PCa adquirida. Entre ellas, destaca el aumento de ciertos factores de la coagulación, en especial del factor VIII, cuyos niveles se han correlacionado con la R-PCa en el embarazo (556), en estados de inflamación (557), y en población general (443). También se ha asociado la R-PCa adquirida con la presencia de anticuerpos antifosfolípido (558), con el consumo de anticonceptivos orales, sobre todo de tercera generación (559), con el tratamiento hormonal sustitutivo (443), y con la presencia de reactantes de fase aguda (560). Determinados factores demográficos y factores de riesgo cardiovascular se han asociado asimismo a R-PCa adquirida, como la edad, el sexo femenino, la presión

arterial, los niveles de CT y los de TG; por el contrario, el tabaco parece ejercer un efecto protector (442; 443). En nuestro trabajo, la toma de anticonceptivos orales, el embarazo, el tratamiento hormonal sustitutivo, la hipertensión arterial y la dislipemia han constituido criterios de exclusión, tanto en casos como en controles. Además, ningún sujeto se encontraba en una fase reactante aguda. Los casos y los controles no presentaron diferencias en cuanto al sexo, a la edad, o a la frecuencia de fumadores. Por ello, todas estas variables no han podido actuar como posibles factores de confusión. Nuestros resultados indican que, en nuestros pacientes seleccionados, la obesidad no se asocia por sí misma a un estado adquirido de R-PCa.

En los últimos años se ha estudiado la influencia de lípidos y lipoproteínas sobre la función anticoagulante de la PCa (561). Así, se ha visto que tanto la fosfatidiletanolamina como la cardiolipina, los glicoesfingolípidos neutros glucosilceramida y Gb3 ceramida y el colesterol HDL estimulan la inactivación de F Va y F VIIIa por la PCa, mientras que otros lípidos como el colesterol LDL no presentan este efecto (562; 563). Esta acción es debida a la incorporación de una mayor concentración de dichos lípidos en la membrana lipídica, lo que le confiere un aumento de afinidad por la PCa y por tanto una mayor capacidad para facilitar la inactivación de F Va y F VIIIa por el complejo PCa - proteína S. De hecho, Deguchi y cols han descrito que una de las causas de la R-PCa en mujeres usuarias de contraceptivos orales de segunda y tercera generación es la reducción que éstos producen de los niveles de glucosilceramida, un lípido neutro presente en plasma y en membranas celulares que actúa estimulando la actividad anticoagulante de la PCa (564). A pesar de los menores niveles de colesterol HDL de nuestros pacientes obesos respecto al grupo control, no hemos encontrado diferencias en la R-PCa entre ambos grupos, lo que sugiere que la cantidad de colesterol HDL no está jugando un papel importante en la inactivación de F Va y F VIIIa por la PCa. Sin embargo, la técnica estándar utilizada por nosotros para la medida de la R-PCa no permite estudiar el efecto de la variación de estos lípidos sobre la R-PCa en pacientes obesos.

Dos estudios poblacionales previos han encontrado una asociación entre R-PCa e IMC, aunque sólo uno de ellos ha comparado la R-PCa entre sujetos obesos y sujetos normopeso, y encontrando una mayor R-PCa en los primeros. El primer estudio, realizado en 4.000 sujetos, tenía como objetivo analizar la influencia de determinadas variables demográficas sobre los valores de Rs-PCa, y observó que el IMC era uno de sus predictores (442). En el otro trabajo (443), realizado en 943 sujetos, Lowe y cols encontraron una correlación entre el IMC y el Rs-PCa sólo en mujeres. Además, clasificaron a los sujetos en base a la presencia o ausencia de obesidad, encontrando menor Rs-PCa en los sujetos obesos comparados con el grupo control. Sin embargo, el valor medio del Rs-PCa obtenido en el grupo de obesos se encontraba dentro de la normalidad (2,69, intervalo de confianza al 95%: 2,62 a 2,78), siendo incluso superior al encontrado por nosotros en el grupo de pacientes obesos. Por tanto, la relación encontrada entre obesidad y R-PCa adquirida en dicho trabajo, pese a ser estadísticamente significativa, no parece clínicamente relevante. Además, en estos estudios no constituyeron criterios de exclusión la dislipemia, los anticonceptivos orales, el tratamiento hormonal sustitutivo o los procesos de fase aguda, de manera que la relación encontrada entre R-PCa y obesidad podría atribuirse, por ejemplo, a la dislipemia que con frecuencia acompaña a la obesidad. No podemos descartar, sin embargo, que la falta de diferencias entre casos y controles encontrada en nuestro trabajo se deba a una falta de potencia estadística por el pequeño tamaño muestral, muy inferior al trabajo de Lowe y cols (150 casos y 793 controles). Otros estudios poblacionales no han encontrado una correlación significativa entre IMC y Rs-PCa (311; 444).

V.2.b. Niveles de proteína C activada

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar los niveles de PCa circulante en pacientes obesos y en un grupo control, y determinar si muestran variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante tratamiento dietético.

Hemos encontrado niveles medios de PCa, PC y F1+2 significativamente mayores en el grupo de pacientes obesos que en el grupo control. El nivel elevado de PCa en el grupo de pacientes obesos puede explicarse por la mayor generación de trombina, reflejada en los mayores niveles de F1+2 en estos pacientes. La correlación positiva entre los niveles de PCa y los de F1+2 en el grupo control indica que, como es conocido, los niveles de PCa vienen determinados en condiciones normales en parte por el grado de generación de trombina (506).

La presencia de niveles de F1+2 significativamente mayores en el grupo de pacientes obesos confirma un estado de hipercoagulabilidad en estos individuos (432). Este estado de hipercoagulabilidad no es debido a alteraciones en el sistema de activación de la PC (313), ya que los niveles de PCa están incluso elevados en el grupo de obesos. Sin embargo, la falta de correlación en el grupo de pacientes obesos en situación basal entre los niveles de PCa y de F1+2 sugiere que el aumento de PCa no viene determinado, al menos en su totalidad, por el aumento observado en F1+2, sino que existe algún otro factor o factores que influyen en los niveles aumentados de PCa. Uno de estos factores podría ser el aumento de los niveles de PC que hemos observado en el paciente obeso, que podría suponer un mecanismo compensador frente a la mayor tendencia trombótica de estos pacientes. No obstante, la falta de correlación entre los niveles de PCa y los de PC sugiere que algún otro factor debe estar implicado en los niveles aumentados de PCa, además del aumento de F1+2 y de PC.

En referencia a la mayor concentración de PC en los pacientes obesos, varios trabajos publicados ya sugieren la existencia de un incremento de los inhibidores de la coagulación en el individuo obeso, como respuesta protectora frente al aumento de los factores protrombóticos (565). De hecho, un importante estudio poblacional, realizado en 746 hombres y 816 mujeres, mostró una correlación positiva entre el IMC y los niveles de PC y PS en ambos sexos, y entre el IMC y los niveles de antitrombina en mujeres (277).

Otra posible explicación para el elevado nivel de PCa en los pacientes obesos sería una mayor presencia de polimorfismos de los genes que codifican a la trombomodulina y/o al EPCR y que generen una ganancia de función, lo que produciría un aumento de la expresión de estos receptores, con el consiguiente aumento en la generación de PCa. De hecho, se ha descrito un polimorfismo en la región 3' no traducida del gen del EPCR, el 4678G/C, asociado con un aumento del nivel de PCa circulante y con una disminución del riesgo de TVP (566; 567). Aunque improbable, es posible que entre los individuos obesos estudiados por nosotros exista un mayor porcentaje con el genotipo 4678CC, asociado con una mayor concentración de PCa circulante.

De la misma forma que los trastornos lipídicos pueden alterar la función anticoagulante de la PCa, tal y como se ha explicado previamente (562; 563), también sería posible que dichos trastornos alterasen la activación de la PC, dado que ambos fenómenos ocurren en las superficies fosfolipídicas celulares. Así, aunque la dislipemia constituyó un criterio de exclusión en nuestro trabajo, los pacientes obesos podrían tener aumentados los niveles de glucosilceramida, que podría explicar, en parte, los mayores niveles de PCa.

La disminución de los niveles de PCa tras la pérdida de peso puede ser explicada, al menos en parte, por la reducción de F1+2 concomitante. Sin embargo, la falta de correlación significativa entre el descenso de los niveles de PCa y el de F1+2 indica que quizá otros factores diferentes a la mejoría de la hipercoagulabilidad influyan en este descenso, como podría ser por ejemplo una reducción de los niveles de glucosilceramida.

Otra explicación para el aumento de PCa en los pacientes obesos es que presentaran un descenso concomitante de su inhibidor, el PCI. Aunque nosotros no hemos valorado dicho inhibidor, los datos de la literatura indican que una deficiencia de PCI es extremadamente rara. De hecho, en más de 2.000 muestras plasmáticas de controles y pacientes con patología trombótica no se ha encontrado ningún caso de deficiencia de PCI (568).

V.3. ALTERACIONES DE LA FIBRINOLISIS EN LOS PACIENTES CON OBESIDAD

V.3.a. Comparación de los niveles de PAI-1 entre casos y controles

Uno de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar los parámetros fibrinolíticos en pacientes obesos y en un grupo control. La comparación de los niveles basales de PAI-1 y t-PA entre ambos grupos muestra que los pacientes obesos tienen niveles significativamente aumentados de PAI-1ag, PAI-1fc y t-PA. Esto coincide con los resultados de los autores que han analizado los niveles de PAI-1 en la obesidad mórbida (102). El aumento en los niveles de t-PA antigénico se considera un marcador de disfunción endotelial (336), situación asociada a la obesidad (96; 100; 132; 133; 421), por lo que no es de extrañar que tanto nosotros como otros autores hayamos encontrado un aumento de los niveles de t-PA antigénico en pacientes obesos (435; 437; 471). Muchas de las determinaciones de t-PA, incluida la empleada en nuestro trabajo, detectan tanto el t-PA libre como el t-PA que forma complejos circulantes con el PAI-1 (569). Así, el aumento de los niveles de t-PA no siempre indica un aumento de la actividad fibrinolítica, ya que, en caso de existir un aumento de los niveles de PAI-1, el t-PA evaluado puede estar mayoritariamente formando complejos con el PAI-1.

Existe además un aumento porcentual mucho mayor de PAI-1ag (272%) que de t-PA antigénico (81%), lo que implica una hipofibrinólisis, confirmada con el aumento del PAI-1fc que hemos encontrado. Otros autores han demostrado esta hipofibrinólisis en pacientes con obesidad objetivando niveles disminuidos de t-PA funcional (435) o alargamiento del tiempo de lisis de las euglobulinas (421; 570).

Hemos observado que el IMC no se correlaciona con los niveles basales de PAI-1 en pacientes con obesidad, pese a que al dividir a los pacientes en

función del IMC superior o inferior a 45 kg/m^2 , se aprecia una tendencia no significativa a mayores niveles de PAI-1 en los primeros. Por el contrario, en el grupo control con normopeso, se observa una correlación positiva significativa entre los niveles de PAI-1 y el IMC. No obstante, cuando los sujetos obesos pierden peso, aparece una tendencia no significativa a la correlación entre los niveles de PAI-1 y el IMC. La mayoría de los estudios previos han encontrado, a diferencia del presente trabajo, una correlación entre los niveles de PAI-1 y el IMC en el paciente obeso, pero se han realizado en pacientes con IMC medio entre 28 y 38 kg/m^2 , muy inferior al de nuestros pacientes. El único trabajo que hemos encontrado en la literatura revisada que ha analizado la correlación entre los niveles de PAI-1 y el IMC en pacientes con obesidad mórbida, lo hizo después de la cirugía bariátrica (482), encontrando una buena correlación entre ambas variables determinadas tras una pérdida de peso media de 13 kg/m^2 (IMC medio inicial: 53 kg/m^2 , IMC medio tras la cirugía: 40 kg/m^2). Sin embargo, los autores no analizaron la correlación entre los niveles de PAI-1 y el IMC antes del tratamiento quirúrgico. Nuestros resultados parecen indicar que, en los pacientes con obesidad grave o mórbida, se establece un umbral de peso a partir del cual la influencia de la adiposidad es máxima, y no aumenta pese al aumento ulterior de grasa por encima de este umbral.

La hipofibrinólisis del paciente obeso podría contribuir al exceso de riesgo cardiovascular de estos pacientes. Un importante estudio prospectivo realizado en hombres de edad media, el “*Northwick Park Heart Study*”, demostró, tras un seguimiento de 16 años, una relación independiente entre la actividad fibrinolítica disminuida y el riesgo de cardiopatía isquémica (272). El aumento de t-PA antigénico también se ha asociado a enfermedad cardiovascular, como muestra un metaanálisis recientemente publicado que analizó 7 estudios prospectivos realizados en población general (322). El aumento de PAI-1 se ha relacionado con enfermedad cardiovascular de forma menos consistente (300; 320). No existen estudios prospectivos que analicen el riesgo cardiovascular asociado a la hipofibrinólisis en pacientes con obesidad.

Se ha descrito la presencia de hipofibrinólisis (359) y el aumento de los niveles de PAI-1 (362) en pacientes con TVP, aunque los estudios prospectivos al respecto son muy escasos. Uno de estos estudios no encontró que los niveles de PAI-1 o de t-PA predijeran el desarrollo de TVP en personas sanas (363). Se ha demostrado que tanto la hipofibrinólisis (364) como los niveles elevados de PAI-1 (224) se asocian a recurrencias de TVP. Por tanto, la asociación entre aumento de PAI-1 y TVP no es consistente y requiere más estudios (367). La asociación entre hipofibrinólisis y TVP en pacientes con obesidad no ha sido estudiada.

V.3.b. Comparación del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 entre casos y controles

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar el polimorfismo 4G/5G del gen del promotor del PAI-1 en pacientes con obesidad y en un grupo control y su contribución a los niveles totales de PAI-1.

Estudios preliminares en ratas sugieren que los niveles de PAI-1 pueden jugar un papel en el desarrollo de la obesidad y en la diferenciación de los adipocitos (462), aunque los resultados de estos trabajos han sido contradictorios (463-466). Se ha involucrado al PAI-1 en la migración celular en el tejido adiposo, actuando como regulador de la adipogénesis (571). Diversos trabajos en humanos han intentado relacionar el polimorfismo 4G/5G del gen del promotor del PAI-1 con la presencia de obesidad, con resultados contradictorios. Un estudio en 505 pacientes mostró una frecuencia doble de obesidad en portadores del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, comparada con la de los portadores del alelo 5G (467), aunque la metodología de este trabajo ha sido criticada (572). Otro estudio realizado en 93 pacientes no encontró diferencias en la distribución del genotipo de dicho gen entre pacientes con obesidad y un grupo control (469). Otro trabajo

realizado en 91 pacientes con amplio rango de peso concluyó que el genotipo 5G/5G se asociaba a mayor IMC (245). Un estudio reciente de características similares en 666 pacientes ha encontrado una asociación entre el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y el IMC en mujeres, pero no en hombres (573). Un estudio realizado en 102 en niños obesos ha encontrado igualmente un aumento en la frecuencia del genotipo 4G/4G (466). Otro trabajo reciente en niños concluye que aquellos con historia familiar de obesidad o SM presentan una frecuencia mayor del genotipo 4G/4G que aquellos sin historia familiar o que el grupo control (574). Nuestros resultados sugieren una relación entre el alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, y la presencia de obesidad, dado que, aunque no existen diferencias significativas en la proporción de los distintos genotipos entre casos y controles, se aprecia una tendencia a la mayor presencia del alelo 4G en el grupo de pacientes obesos. Es posible que el tamaño de nuestra muestra fuera insuficiente para que estas diferencias fueran significativas.

Por otra parte, también hemos analizado en nuestro estudio la posible relación del alelo 4G con los niveles de PAI-1 que han descrito otros autores en población general (238; 241) y en pacientes obesos (469). Nuestros resultados en el grupo control confirman estos datos en población sana. Sin embargo, no hemos encontrado una asociación entre el alelo 4G y los niveles de PAI-1 en los pacientes obesos en situación basal. No obstante, tras la pérdida de peso, los pacientes obesos con el alelo 4G muestran una tendencia a presentar niveles superiores de PAI-1, que no alcanza la significación estadística. Nuestros datos en pacientes obesos respecto a la asociación del alelo 4G con los niveles de PAI-1 sugieren que, en obesidad mórbida, la influencia del exceso de peso sería tal, que los niveles de PAI-1 habrían llegado a unos niveles máximos por encima de los cuales no podrían aumentar más en respuesta a los factores genéticos. Al disminuir estos niveles con la pérdida ponderal, empezaría a manifestarse la influencia de estos factores genéticos sobre los niveles de PAI-1. De hecho, el único trabajo que se ha publicado al respecto en pacientes adultos con obesidad (469), y que encontró

una relación entre el alelo 4G y los niveles de PAI-1, estudió a 93 pacientes con un IMC superior a igual a 25 kg/m² (IMC medio 36,3 ± 6,9 kg/m²), inferior al IMC de nuestros pacientes. Estos autores concluyeron que el polimorfismo 4G/5G era un determinante de los niveles plasmáticos de PAI-1, que eran mayores en el genotipo 4G/4G, intermedios en el 4G/5G, e inferiores en el 5G/5G.

La posible influencia del genotipo 4G/5G del gen del PAI-1 en la respuesta de los niveles de PAI-1 al tratamiento dietético se analiza más adelante.

V.3.c. Asociación del PAI-1 en la obesidad con la resistencia insulínica

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido valorar la asociación de los niveles de PAI-1 con factores metabólicos como la RI o los niveles de TG en pacientes con obesidad y en un grupo control.

El estudio basal de correlaciones ha mostrado que los niveles de PAI-1 se relacionan con los marcadores de RI (HOMA, insulina) en los pacientes obesos. En el grupo control con normopeso, no se ha observado esta correlación entre los niveles de PAI-1 y los marcadores de RI. Al igual que en el presente trabajo, otros autores han encontrado una correlación entre los niveles de PAI-1ag y la RI en pacientes obesos adultos (102; 437; 468; 476-479; 487; 575).

Asimismo, hemos encontrado una tendencia de los pacientes obesos con SM a presentar cifras mayores de PAI-1 que los pacientes obesos sin SM. Dichas diferencias probablemente no sean significativas en nuestro trabajo por la reducción muestral resultante de la estratificación de la muestra. Así, un estudio reciente realizado en 32 mujeres obesas demostró que aquellas con RI presentaban mayores concentraciones de PAI-1 (102). En diversos estudios se

ha propuesto que tras la relación entre PAI-1 y obesidad subyace la RI (576), que se considera actualmente uno de los principales reguladores del PAI-1 (246). De hecho, el aumento de PAI-1 se considera en la actualidad un componente más del SM (447-450).

La RI y el hiperinsulinismo resultante podrían ser los responsables del aumento de PAI-1 en la obesidad (483), dado que la insulina estimula la síntesis de PAI-1 a nivel hepático (459) y adiposo (257; 263). Otros autores opinan que no sería la insulina, sino el aumento de la producción de citoquinas TNF- α y TGF- β por el tejido adiposo (93), lo que estimularía la síntesis de PAI-1 por el tejido adiposo, de una manera autocrina o paracrina. El aumento de estas citoquinas sería asimismo el responsable de la RI (70)

Destaca la falta de correlación en nuestro trabajo entre los niveles basales de PAI-1 y los de TG, tanto en el grupo de casos como en el grupo control, pese a que se ha sugerido que éstos últimos son, junto con el IMC, los principales predictores de los niveles de PAI-1 en población general (250). Probablemente este hecho se encuentre en relación con los criterios de exclusión de nuestro trabajo, dado que los individuos con cifras de TG superiores a 250 mg/dL eran excluidos del estudio. Tampoco hemos encontrado una asociación entre los niveles plasmáticos de leptina y los de PAI-1, a diferencia del único otro estudio publicado en obesidad mórbida, aunque cabe destacar que dicho trabajo carecía de grupo control (482).

V.3.d. Efecto de la pérdida de peso sobre los niveles de PAI-1 en la obesidad

Otro de los objetivos del presente trabajo doctoral ha sido determinar si los niveles de PAI-1 mostraban variaciones significativas con la pérdida ponderal obtenida mediante dieta. Hemos observado una mejoría importante y

significativa de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc tras el tratamiento dietético, con un porcentaje medio de descenso de los mismos de 23,3% y 31,6% respectivamente ($p < 0,001$). Estos resultados están en consonancia con los descritos por otros autores que han analizado la influencia de la pérdida de peso sobre la fibrinólisis en pacientes con obesidad mórbida (421; 482; 484). Asimismo, hemos encontrado que los pacientes que presentan mayores descensos porcentuales de PAI-1 son aquellos con mayores niveles iniciales del mismo. Éste hecho ha sido previamente descrito en un anterior trabajo realizado en mujeres premenopáusicas con IMC medio de 30,8 kg/m² (430).

Además, hemos observado que el porcentaje de cambio de PAI-1 es proporcional al porcentaje de cambio de IMC, y no al porcentaje de cambio del índice HOMA o de TG. Este dato parece indicarnos que sería la disminución de la masa grasa la responsable de la mejoría de los niveles de PAI-1, más que la mejoría de factores metabólicos tales como la RI o los TG. Los demás autores que han analizado la posible relación entre cambios de IMC y cambios de PAI-1 han utilizado valores absolutos como la diferencia entre la variable inicial y la variable final, y no el porcentaje de cambio, más recomendable dado que es independiente de las unidades de medida. Algunos de ellos han encontrado resultados similares a los nuestros, con correlaciones entre los descensos de los niveles de PAI-1 y los descensos de IMC o grasa corporal (477; 482), y otros no han encontrado correlación (257; 421).

Hemos observado asimismo un descenso de PAI-1 mayor en el genotipo 5G/5G, al límite de la significación estadística. Estas diferencias no se pueden atribuir a diferentes pérdidas de peso pues el porcentaje de cambio de IMC fue similar en todos los genotipos. Se sabe que el polimorfismo 4G/5G puede modular la influencia de determinados factores sobre los niveles de PAI-1, como el ritmo circadiano (577), los lípidos (238; 578), el SRAA (579), la actividad física (580), y el tratamiento hormonal sustitutivo con estrógenos (581). Nuestros resultados indican que el polimorfismo 4G/5G puede modular igualmente la respuesta de los niveles de PAI-1 a la pérdida de peso en

pacientes con obesidad, presentando los sujetos sin el alelo 4G mejor respuesta a la misma. No hemos encontrado en la literatura revisada ningún estudio que analice la respuesta de los niveles de PAI-1 a la pérdida de peso en obesidad mórbida en función del genotipo. Es probable que las diferencias de cambio de PAI-1 en función del genotipo no alcancen la significación estadística en nuestro trabajo por la reducción de la muestra debida a la estratificación por genotipo.

VI. CONCLUSIONES

1) Las alteraciones hemorreológicas asociadas a la obesidad y los cambios obtenidos con la pérdida ponderal se resumen en los siguientes puntos:

- Los pacientes obesos presentan un perfil hemorreológico alterado, caracterizado por un aumento de los niveles de fibrinógeno, de la viscosidad plasmática, de la viscosidad sanguínea a hematocrito corregido, y de la agregabilidad eritrocitaria. Esta hiperagregabilidad no parece deberse al aumento de los niveles de fibrinógeno ni de los lípidos plasmáticos, sino a la propia obesidad y a la resistencia insulínica asociada a la misma.
- La deformabilidad eritrocitaria no se encuentra disminuida en los pacientes obesos, posiblemente debido a la ausencia de alteraciones en el contenido en colesterol y fosfolípidos de la membrana eritrocitaria. Sin embargo, los pacientes obesos con síndrome metabólico presentan una menor deformabilidad eritrocitaria, correlacionándose ésta de forma negativa con la resistencia insulínica.
- Los niveles aumentados de fibrinógeno, de viscosidad plasmática y de viscosidad sanguínea no se modifican con la pérdida de peso alcanzada tras tres meses de dieta hipocalórica. Sin embargo, la agregabilidad eritrocitaria mejora de forma significativa con la pérdida de peso, al igual que la resistencia insulínica.
- Como hallazgo no descrito hasta el momento actual, hemos encontrado un aumento de la expresión de fosfatidilserina en la hoja externa de la membrana eritrocitaria en los pacientes obesos, lo que podría contribuir al riesgo protrombótico de estos pacientes.

2) Las alteraciones del sistema de la proteína C asociadas a la obesidad y los cambios obtenidos con la pérdida ponderal se resumen en los siguientes puntos:

- No hemos encontrado en los pacientes obesos un estado de resistencia a la proteína C activada adquirida. Tampoco hemos encontrado cambios significativos en dicho parámetro tras la pérdida de peso.
- Los niveles de proteína C activada están aumentados en los pacientes obesos, debido en parte a la mayor generación de trombina y a los mayores niveles de proteína C. Tras la pérdida de peso, hemos observado una disminución de los niveles de proteína C activada, debida en parte a una reducción de la generación de trombina.

3) Las alteraciones fibrinolíticas asociadas a la obesidad y los cambios obtenidos con la pérdida ponderal se resumen en los siguientes puntos:

- Los pacientes obesos presentan una hipofibrinólisis manifestada por un aumento de los niveles de PAI-1 antigénico y funcional. No se ha encontrado en estos pacientes una asociación significativa entre dichos niveles y la presencia del alelo 4G.
- En los pacientes obesos, la resistencia insulínica se relaciona con los niveles de PAI-1. Los pacientes obesos con síndrome metabólico muestran una tendencia no significativa a presentar cifras mayores de PAI-1.
- Tras la pérdida de peso, se observa una disminución significativa de los niveles de PAI-1 antigénico y funcional. El porcentaje de cambio de PAI-1 se correlaciona con el porcentaje de cambio del índice de masa

corporal. Se observa una tendencia no significativa en los pacientes obesos portadores del alelo 4G a un menor descenso de PAI-1 en respuesta a la pérdida de peso.

Como conclusión final, hemos evidenciado alteraciones hemorreológicas, fibrinolíticas y de la hemostasia asociadas a la obesidad. Algunas de estas alteraciones han mejorado de forma significativa con la pérdida de peso, lo que podría ayudar a reducir el riesgo trombótico de estos pacientes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. American Association of Clinical Endocrinologists / American College of Endocrinology. AACE/ACE position statement on the prevention, diagnosis and treatment of obesity (1998 Revision). *Endocr Pract* 1998;4:297-330.
2. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad. Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutico. *Med Clin (Barc)* 2000;115:587-97.
3. Grupo de Trabajo sobre la Obesidad de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. Guía de práctica clínica para el manejo del sobrepeso y la obesidad en personas adultas. *Endocrinología y Nutrición* 2003;50 (Supl 1):1-38.
4. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 2002;288:1723-7.
5. Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Serra Majem L, Ribas L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, et al. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO'97. *Med Clin (Barc)* 1998;111:441-5.
6. Aranceta J, Pérez 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.
7. Nielsen S, Jensen MD. Obesity and cardiovascular disease: is body structure a factor? *Curr Opin Lipidol* 1997;8:200-4.
8. Despres JP. Health consequences of visceral obesity. *Ann Med* 2001;33:534-41.
9. Pi-Sunyer X. A clinical view of the obesity problem. *Science* 2003;299:859-60.

10. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71.
11. Porte D Jr, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 2002;60:S20-9; discussion S68-84, 85-7.
12. Wadden TA, Considine RV, Foster GD, Anderson DA, Sarwer DB, Caro JS. Short- and long-term changes in serum leptin dieting obese women: effects of caloric restriction and weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:214-8.
13. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.
14. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-8.
15. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.
16. Bouchard C, Perusse L. Genetics of obesity. *Annu Rev Nutr* 1993;13:337-54.
17. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 1999;341:1097-105.
18. Garaulet M, Marín C, Pérez-Llamas F, Canteras M, Tébar FJ, Zamora S. Adiposity and dietary intake in cardiovascular risk in an obese population from a Mediterranean area. *J Physiol Biochem* 2004;60:39-49.

19. Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes* 1985;34:1055-8.
20. Valverde JC, Tormo MJ, Navarro C, Rodríguez-Barranco M, Marco R, Egea JM, et al. Prevalence of diabetes in Murcia (Spain): A Mediterranean area characterised by obesity. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;71:202-209.
21. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. Overweight, obesity, and health risk. *Arch Intern Med* 2000;160:898-904.
22. Sternfeld B, Sidney S, Jacobs DR Jr, Sadler MC, Haskell WL, Schreiner PJ. Seven-year changes in physical fitness, physical activity, and lipid profile in the CARDIA study. *Coronary Artery Risk Development in Young Adults*. *Ann Epidemiol* 1999;9:25-33.
23. Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An under-recognized contributor to dyslipidemia in white American women. *Arch Intern Med* 1994;154:401-10.
24. Williams PT, Krauss RM. Associations of age, adiposity, menopause, and alcohol intake with low-density lipoprotein subclasses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1082-90.
25. Denke MA, Sempos CT, Grundy SM. Excess body weight. An underrecognized contributor to high blood cholesterol levels in white American men. *Arch Intern Med* 1993;153:1093-103.
26. Brown CD, Higgins M, Donato KA, Rohde FC, Garrison R, Obarzanek E, et al. Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. *Obes Res* 2000;8:605-19.

27. Kannel WB, Brand N, Skinner JJ Jr, Dawber TR, McNamara PM. The relation of adiposity to blood pressure and development of hypertension. The Framingham study. *Ann Intern Med* 1967;67:48-59.
28. Van Itallie TB. Health implications of overweight and obesity in the United States. *Ann Intern Med* 1985;103:983-8.
29. Formiguera X, Canton A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:1125-46.
30. Stampfer MJ, Maclure KM, Colditz GA, Manson JE, Willett WC. Risk of symptomatic gallstones in women with severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1992;55:652-8.
31. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
32. Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005;50:171-80.
33. Young T, Shahar E, Nieto FJ, Redline S, Newman AB, Gottlieb DJ, et al. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch Intern Med* 2002;162:893-900.
34. Jubber AS. Respiratory complications of obesity. *Int J Clin Pract* 2004;58:573-80.
35. Hart DJ, Spector TD. The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol* 1993;20:331-5.
36. Deslypere JP . Obesity and cancer. *Metabolism* 1995;44:24-7.

37. Fitzgibbon ML, Stolley MR, Kirschenbaum DS. Obese people who seek treatment have different characteristics than those who do not seek treatment. *Health Psychol* 1993;12:342-5.
38. Gortmaker SL, Must A, Perrin JM, Sobol AM, Dietz WH. Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med* 1993;329:1008-12.
39. Arslanian SA, Lewy V, Danadian K, Saad R. Metformin therapy in obese adolescents with polycystic ovary syndrome and impaired glucose tolerance: amelioration of exaggerated adrenal response to adrenocorticotropin with reduction of insulinemia/insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1555-9.
40. Meistas MT, Foster GV, Margolis S, Kowarski AA. Integrated concentrations of growth hormone, insulin, C-peptide and prolactin in human obesity. *Metabolism* 1982;31:1224-8.
41. De Jong PE, Verhave JC, Pinto-Sietsma SJ, Hillege HL. Obesity and target organ damage: the kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26 Suppl 4:S21-4.
42. Padberg F Jr, Cerveira JJ, Lal BK, Pappas PJ, Varma S, Hobson RW 2nd. Does severe venous insufficiency have a different etiology in the morbidly obese? Is it venous? *J Vasc Surg* 2003;37:79-85.
43. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol* 2005;15:175-84.
44. Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernández AM, Tébar FJ, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart* 2003;89:1152-6.

45. Langer O, Yogev Y, Xenakis EM, Brustman L. Overweight and obese in gestational diabetes: the impact on pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1768-76.
46. Faure E, Moreno R, Thisted R. Incidence of postdural puncture headache in morbidly obese parturients. *Reg Anesth* 1994;19:361-3.
47. Dietl J. Maternal obesity and complications during pregnancy. *J Perinat Med* 2005;33:100-5.
48. Banerji MA, Lebowitz J, Chaiken RL, Gordon D, Kral JG, Lebowitz HE. Relationship of visceral adipose tissue and glucose disposal is independent of sex in black NIDDM subjects. *Am J Physiol* 1997;273:E425-32.
49. Herranz L, Zapata A, Grande C, Megía A, Pallardó LF. Body fat distribution, insulin mediated suppression of non-esterified fatty acids and plasma triglycerides in obese subjects. *Horm Metab Res* 1998;30:141-5.
50. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:351-6.
51. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Lorente RI, Martínez-Valls J, Carmena R. Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur J Intern Med* 2003;14:101-106.
52. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:2289-304.
53. American Diabetes Association. Consensus Development Conference on Insulin Resistance. *Diabetes Care* 1998;21:310-4.

54. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979;237:E214-23.
55. Bergman RN, Finegood DT, Ader M. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev* 1985;6:45-86.
56. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Cuantificación de insulinoresistencia con los valores de insulina basal e índice HOMA en una población no diabética. *Med Clin (Barc)* 2001;117:530-3.
57. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
58. Emoto M, Nishizawa Y, Maekawa K, Hiura Y, Kanda H, Kawagishi T, et al. Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Diabetes Care* 1999;22:818-22.
59. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000;23:57-63.
60. Hernández Mijares A, Riera Fortuny C, Solá Izquierdo E, Oliver Oliver MJ, Martínez Triguero ML, Morillas Ariño C, et al. Prevalencia del síndrome metabólico entre pacientes con cardiopatía isquémica. *Med Clin (Barc)* 2003;121:204-8

61. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15:539-53.
62. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 1999;16:442-3.
63. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97.
64. International Diabetes Federation [homepage on the Internet]. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. Available from: http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Metasyndrome_definition. [Accessed 07 Jun 2005].
65. Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27 Suppl 3:S25-8.
66. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:972-8.
67. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* 2000;102:42-7.

68. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
69. Lee YH, Pratley RE. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2005;5:70-5.
70. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:278-301.
71. Ryan AS, Nicklas BJ. Reductions in plasma cytokine levels with weight loss improve insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *Diabetes Care* 2004;27:1699-705.
72. Engstrom G, Hedblad B, Stavenow L, et al. Incidence of obesity-associated cardiovascular disease is related to inflammation-sensitive plasma proteins: a population-based cohort study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1498-502.
73. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4196-200.
74. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:847-50.
75. Papanicolaou DA, Vgontzas AN. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1331-3.
76. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.

77. Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D. Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* 1992;52:4113-6.
78. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-78.
79. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002;51:3391-9.
80. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990;265:621-36.
81. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148:209-14.
82. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2084-9.
83. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, et al. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3338-42.
84. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, et al. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1042-7.
85. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001;286:327-34.

86. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13:151-3.
87. Hardardottir I, Grunfeld C, Feingold KR. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:207-15.
88. Kawakami M, Pekala PH, Lane MD, Cerami A. Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:912-6.
89. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1994;94:1543-9.
90. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-9
91. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, et al. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 2001;409:729-33.
92. Pang G, Couch L, Batey R, Clancy R, Cripps A. GM-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression and cytokine production in human duodenal fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide, IL-1 alpha and TNF-alpha. *Clin Exp Immunol* 1994;96:437-43.
93. Irigoyen JP, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:104-32.

94. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995;95:2111-9.
95. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995;95:2409-15.
96. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002;105:804-9.
97. Laimer M, Ebenbichler CF, Kaser S, Sandhofer A, Weiss H, Nehoda H, et al. Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:659-62.
98. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2907-10.
99. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism* 2004;53:1268-73.
100. Vázquez LA, Pazos F, Berrazueta JR, Fernández-Escalante C, García-Unzueta MT, Freijanes J, et al. Effects of changes in body weight and insulin resistance on inflammation and endothelial function in morbid obesity after bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:316-22.

101. Bruun JM, Verdich C, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur J Endocrinol* 2003;148:535-42.
102. Romano M, Guagnano MT, Pacini G, Vigneri S, Falcó A, Marinopicolli M, et al. Association of inflammation markers with impaired insulin sensitivity and coagulative activation in obese healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5321-6.
103. Khaodhlar L, Ling PR, Blackburn GL, Bistrian BR. Serum levels of interleukin-6 and C-reactive protein correlate with body mass index across the broad range of obesity. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2004;28:410-5.
104. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996;144:537-47.
105. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;336:973-9.
106. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-24.
107. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997;349:462-6.

108. 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.
109. Lee AJ, Mowbray PI, Lowe GD, Rumley A, Fowkes FG, Allan PL. Blood viscosity and elevated carotid intima-media thickness in men and women: the Edinburgh Artery Study. *Circulation* 1998;97:1467-73.
110. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999;282:2131-5.
111. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999;22:1971-7.
112. Lemieux I, Pascot A, Prud'homme D, Almeras N, Bogaty P, Nadeau A, et al. Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:961-7.
113. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* 2002;51:1131-7.
114. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997;78:273-7.
115. Maachi M, Pieroni L, Bruckert E, Jardel C, Fellahi S, Hainque B, et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNFalpha, leptin and IL-6 levels in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:993-7.

116. Heilbronn LK, Noakes M, Clifton PM. Energy restriction and weight loss on very-low-fat diets reduce C-reactive protein concentrations in obese, healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:968-70.
117. Jellema A, Plat J, Mensink RP. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 2004;34:766-73.
118. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002;105:564-9.
119. Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, Giugliano G, Masella M, Marfella R, et al. Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *JAMA* 2003;289:1799-804.
120. Nicoletti G, Giugliano G, Pontillo A, Cioffi M, D'Andrea F, Giugliano D, et al. Effect of a multidisciplinary program of weight reduction on endothelial functions in obese women. *J Endocrinol Invest* 2003;26:RC5-8.
121. Arvidsson E, Viguerie N, Andersson I, Verdich C, Langin D, Arner P. Effects of different hypocaloric diets on protein secretion from adipose tissue of obese women. *Diabetes* 2004;53:1966-71.
122. Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, et al. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2697-703.

123. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:355-62.
124. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem Biol Interact* 1996;102:17-36.
125. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;13:341-90.
126. Davi G, Guagnano MT, Ciabattini G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 2002;288:2008-14
127. Tozzi E , Tozzi-Ciancarelli MG, Di Massimo C, Mascioli A, Gentile T, De Matteis F. Hemorheological parameters and body weight loss in obese children. *Clinical Hemorheology* 1994;14:203-211.
128. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, et al. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4673-6.
129. Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434-9.
130. Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, et al. Circulating Levels of Oxidative Stress Markers and Endothelial Adhesion Molecules in Men With Abdominal Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6454-6459.

131. Yesilbursa D, Serdar Z, Serdar A, Sarac M, Coskun S, Jale C. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:142-5.
132. Pontiroli AE, Pizzocri P, Koprivec D, Vedani P, Marchi M, Arcelloni C, et al. Body weight and glucose metabolism have a different effect on circulating levels of ICAM-1, E-selectin, and endothelin-1 in humans. *Eur J Endocrinol* 2004;150:195-200.
133. Weyer C, Yudkin JS, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Pratley RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. *Atherosclerosis* 2002;161:233-42.
134. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
135. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
136. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
137. Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress: a direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:365-7.
138. Skrha J, Kunesova M, Hilgertova J, Weiserova H, Krizova J, Kotrlikova E. Short-term very low calorie diet reduces oxidative stress in obese type 2 diabetic patients. *Physiol Res* 2005;54:33-9.
139. Mather KJ, Steinberg HO, Baron AD. Weight loss and endothelial function in obesity. *Diabetes Care* 2003;26:1927-8.

140. Wing RR, Koeske R, Epstein LH, Nowalk MP, Gooding W, Becker D. Long-term effects of modest weight loss in type II diabetic patients. *Arch Intern Med* 1987;147:1749-53.
141. Carmena R, Ascaso JF, Tébar J, Soriano J. Changes in plasma high-density lipoproteins after body weight reduction in obese women. *Int J Obes* 1984;8:135-40.
142. Dattilo AM, Kris-Etherton PM. Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1992;56:320-8.
143. Vasankari T, Fogelholm M, Kukkonen-Harjula K, Nenonen A, Kujala U, Oja P, et al. Reduced oxidized low-density lipoprotein after weight reduction in obese premenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:205-11.
144. Stevens VJ, Obarzanek E, Cook NR, Lee IM, Appel LJ, Smith West D, et al. Long-term weight loss and changes in blood pressure: results of the Trials of Hypertension Prevention, phase II. *Ann Intern Med* 2001;134:1-11.
145. Wilson PW, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1999;159:1104-9.
146. Blanch Miró S, Recasens Gracia MA, Sola Alberich R, Salas-Salvado J. Efecto de una dieta altamente hipocalórica sobre el control de la obesidad mórbida a corto y medio plazo. *Med Clin (Barc)* 1993;100:450-3.
147. Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Livingston EH, et al. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med* 2005;142:547-59.

148. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity, National Institutes of Health. Very low-calorie diets. *JAMA* 1993;270:967-74.
149. Saris WH. Very-low-calorie diets and sustained weight loss. *Obes Res* 2001;9 Suppl 4:295S-301S.
150. Toubro S, Astrup A. Randomised comparison of diets for maintaining obese subjects' weight after major weight loss: ad lib, low fat, high carbohydrate diet v fixed energy intake. *BMJ* 1997;314:29-34.
151. Pekkarinen T, Takala I, Mustajoki P. Weight loss with very-low-calorie diet and cardiovascular risk factors in moderately obese women: one-year follow-up study including ambulatory blood pressure monitoring. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:661-6.
152. Solá Izquierdo E, Morillas Ariño C, Royo Taberner R, García Torres S, Nuñez Tortajada A, Hernández Mijares A. Estudio del metabolismo hidrocarbonado en pacientes con obesidad mórbida: influencia de la pérdida de peso. *Rev Clin Esp* 2005;205:103-7.
153. Solá Izquierdo E, Morillas Ariño C, Garzón Pastor S, Royo Taberner R, Nuñez Tortajada A, Bautista Rentero D. Factores de riesgo cardiovascular en pacientes con obesidad mórbida: influencia de la pérdida de peso. *Med Clin (Barc)* 2002;119:485-8.
154. Mustajoki P, Pekkarinen T. Very low energy diets in the treatment of obesity. *Obes Rev* 2001;2:61-72.
155. Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH, Gorman J. An eight-year experience with a very-low-calorie formula diet for control of major obesity. *Int J Obes* 1988;12:69-80.

156. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1983;67:968-77.
157. De Moerloose P, Wutschert R, Heinzmann M, Perneger T, Reber G, Bounameaux H. Superficial vein thrombosis of lower limbs: influence of factor V Leiden, factor II G20210A and overweight. *Thromb Haemost* 1998;80:239-41.
158. Blaszyk H, Bjornsson J. Factor V leiden and morbid obesity in fatal postoperative pulmonary embolism. *Arch Surg* 2000;135:1410-3.
159. Nieuwenhuizen W. Biochemistry and measurement of fibrinogen. *Eur Heart J* 1995;16 Suppl A:6-10; discussion 10.
160. 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.
161. Mertens I, Van Gaal LF. Obesity, haemostasis and the fibrinolytic system. *Obes Rev* 2002;3:85-101.
162. Folsom AR. Fibrinogen and cardiovascular risk markers. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10 Suppl 1:S13-6.
163. Grant PJ. Polymorphisms of coagulation/fibrinolysis genes: gene environment interactions and vascular risk. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;57:473-7.
164. Somer T, Meiselman HJ. Disorders of blood viscosity. *Ann Med* 1993;25:31-9.
165. Mel HC, Yee JP. Erythrocyte size and deformability studies by resistive pulse spectroscopy. *Blood Cells* 1975;1:391-5.
166. Cokelet GR, Meiselman HJ. Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science* 1968;162:275-7.

167. Chien S, Jan KM. Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. *J Supramol Struct* 1973;1:385-409.
168. Cook GM, Heard DH, Seaman GV. Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte. *Nature* 1961;191:44-7.
169. 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.
170. Reinhart WH, Singh A. Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. *Eur J Clin Invest* 1990;20:458-62.
171. Nash GB , Meishelman HJ. Red cell aging: changes in deformability and other possible determinants of in vivo survival. *Microcirculation* 1981;1:255-262.
172. 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.
173. Copley AL. On erythrocyte aggregation and disaggregation. *Clin Hemorheol* 1987;7:3-8.
174. Agosti R, D'Ettore M, Cherubini P. New aspects of erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol* 1988;8:603-10.
175. 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.
176. Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993;72:119-26.

177. 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. PCVMEIRA Group. *Arterioscler Thromb* 1994;14:361-6.
178. Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO. Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 1996;271:H2346-52.
179. 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.
180. 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.
181. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175:720-31.
182. Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 1993;294:1-14.
183. Cogan U, Schachter D. Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with impermeant fluorophores. *Biochemistry* 1981;20:6396-403.
184. Daleke DL, Lyles JV. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1486:108-27.

185. Devaux PF. Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:417-39.
186. Mohandas N, Rossi M, Bernstein S, Ballas S, Ravindranath Y, Wyatt J, et al. The structural organization of skeletal proteins influences lipid translocation across erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1985;260:14264-8.
187. Verkleij AJ, Zwaal RF, Roelofsen B, Comfurius P, Kastelijn D, van Deenen LL. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1973;323:178-93.
188. Cooper RA, Arner EC, Wiley JS, Shattil SJ. Modification of red cell membrane structure by cholesterol-rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. *J Clin Invest* 1975;55:115-26.
189. Cooper RA, Leslie MH, Fischkoff S, Shinitzky M, Shattil SJ. Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro: production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid. *Biochemistry* 1978;17:327-31.
190. Flamm M, Schachter D. Acanthocytosis and cholesterol enrichment decrease lipid fluidity of only the outer human erythrocyte membrane leaflet. *Nature* 1982;298:290-2.
191. Suda T, Maeda N, Sekiya M, Matsuoka K, Tokita R, Shiga T. Influences of membrane cholesterol on the human red cell properties. *Med J Osaka Univ* 1978;29:21-8.
192. Shiga T, Maeda N, Suda T, Kon K, Sekiya M. Rheological and functional impairments in cholesterol-loaded human erythrocytes. *Experientia* 1980;36:127-8.

193. Martínez M, Vayá A, Martí R, Gil L, Lluch I, Carmena R, et al. Erythrocyte membrane cholesterol/phospholipid changes and hemorheological modifications in familial hypercholesterolemia treated with lovastatin. *Thromb Res* 1996;83:375-88.
194. Atkinson JB, Stacpoole PW, Swift LL. Morphologic abnormalities of erythrocytes from patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Biochim Biophys Acta* 1982;712:211-6.
195. 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.
196. Del Vecchio PJ, Siflinger-Birnboim A, Shepard JM, Bizios R, Cooper JA, Malik AB. Endothelial monolayer permeability to macromolecules. *Fed Proc* 1987;46:2511-5.
197. Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* 1999;82:165-74.
198. Rapaport SI, Rao LV. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 1995;74:7-17.
199. Lawrence DA. The serpin-proteinase complex revealed. *Nat Struct Biol* 1997;4:339-41.
200. 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.
201. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995;74:90-3.
202. 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.

203. 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.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. Estellés A, García-Plaza I, Dasí A, Aznar J, Duart M, Sanz G, et al. Severe inherited "homozygous" protein C deficiency in a newborn infant. *Thromb Haemost* 1984;52:53-6.
208. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V, et al. Inherited thrombophilia: Part 2. *Thromb Haemost* 1996;76:824-34.
209. 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.
210. 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.
211. 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.

212. 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.
213. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1004-8.
214. 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.
215. Martinelli I, Legnani C, Bucciarelli P, Grandone E, De Stefano V, Mannucci PM. Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia. *Thromb Haemost* 2001;86:800-3.
216. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor VR506Q mutation is a common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78:483-8.
217. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 1995;346:1133-4.
218. Clark P, Walker ID. The phenomenon known as acquired activated protein C resistance. *Br J Haematol* 2001;115:767-73.
219. Brenner B. Haemostatic changes in pregnancy. *Thromb Res* 2004;114:409-14.
220. Stief TW, Radtke KP, Heimburger 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.

221. Kruithof EK. Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* 1988;40:113-21.
222. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270:14477-84.
223. Grimaudo V, Bachmann F, Hauert J, Christe MA, Kruithof EK. Hypofibrinolysis in patients with a history of idiopathic deep vein thrombosis and/or pulmonary embolism. *Thromb Haemost* 1992;67:397-401.
224. Schulman S, Wiman B. The significance of hypofibrinolysis for the risk of recurrence of venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation (DURAC) Trial Study Group. *Thromb Haemost* 1996;75:607-11.
225. Kluft C, Verheijen JH, Jie AF, Rijken DC, Preston FE, Sue-Ling HM, et al. The postoperative fibrinolytic shutdown: a rapidly reverting acute phase pattern for the fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator after trauma. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:605-10.
226. Kruithof EK, Tran-Thang C, Ransijn A, Bachmann F. Demonstration of a fast-acting inhibitor of plasminogen activators in human plasma. *Blood* 1984;64:907-13.
227. Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence D. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2956-60.
228. Booth NA, Simpson AJ, Croll A, Bennett B, MacGregor IR. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in plasma and platelets. *Br J Haematol* 1988;70:327-33.

229. Arndt A, Murphy P, Hart DA. Human HuH-7 hepatoma cells express urokinase and plasminogen activator inhibitor-1: identification, characterization and regulation by inflammatory mediators. *Biochim Biophys Acta* 1992;1138:149-56.
230. Morange PE, Alessi MC, Verdier M, Casanova D, Magalon G, Juhan-Vague I. PAI-1 produced ex vivo by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1361-5.
231. Chapman HA, Yang XL, Sailor LZ, Sugarbaker DJ. Developmental expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human alveolar macrophages. Possible role in lung injury. *J Immunol* 1990;145:3398-405.
232. Skurk T, Hauner H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1357-64.
233. Hansen M, Busse MN, Andreasen PA. Importance of the amino-acid composition of the shutter region of plasminogen activator inhibitor-1 for its transitions to latent and substrate forms. *Eur J Biochem* 2001;268:6274-83.
234. Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, et al. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 1992;355:270-3.
235. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:10739-45.
236. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:1792-801.

237. Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, Colaizzo D, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2082-7.
238. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, et al. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost* 1998;79:354-8.
239. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 1995;74:842-7.
240. Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1851-5.
241. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:152-6.
242. Grubic N, Stegnar M, Peternel P, Kaider A, Binder BR. A novel G/A and the 4G/5G polymorphism within the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1996;84:431-43.
243. Seguí R, Estellés A, Mira Y, España F, Villa P, Falcó C, et al. PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects. *Br J Haematol* 2000;111:122-8.

244. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Reitsma PH, Rosendaal FR. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999;82:115-20.
245. Van Harmelen V, Wahrenberg H, Eriksson P, Arner P. Role of gender and genetic variance in plasminogen activator inhibitor-1 secretion from human adipose tissue. *Thromb Haemost* 2000;83:304-8.
246. Henry M, Tregouet DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, et al. Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations: a family study with part of the Stanislas Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:84-91.
247. Hong Y, Pedersen NL, Egberg N, de Faire U. Moderate genetic influences on plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1 and evidence of genetic and environmental influences shared by plasminogen activator inhibitor-1, triglycerides, and body mass index. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2776-82.
248. Humphries SE, Panahloo A, Montgomery HE, Green F, Yudkin J. Gene-environment interaction in the determination of levels of haemostatic variables involved in thrombosis and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997;78:457-61.
249. Irokawa M, Nishinaga M, Funayama H, Ikeda U, Shimada K. Effect of a Change in the Sleep/Wake Cycle on the Diurnal Variation of Fibrinolytic Parameters. *J Thromb Thrombolysis* 1998;5:165-168.
250. Giltay EJ, Elbers JM, Gooren LJ, Emeis JJ, Kooistra T, Asscheman H, et al. Visceral fat accumulation is an important determinant of PAI-1 levels in young, nonobese men and women: modulation by cross-sex hormone administration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1716-22.

251. Páramo JA, Olavide I, Barba J, Montes R, Panizo C, Muñoz MC, et al. Long-term cardiac rehabilitation program favorably influences fibrinolysis and lipid concentrations in acute myocardial infarction. *Haematologica* 1998;83:519-24.
252. Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation* 1995;91:1952-8.
253. Teede HJ, McGrath BP, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Liang YL, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1404-9.
254. Vaughan DE. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *Am J Hypertens* 2002;15:3S-8S.
255. Djousse L, Pankow JS, Arnett DK, Zhang Y, Hong Y, Province MA, et al. Alcohol consumption and plasminogen activator inhibitor type 1: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am Heart J* 2000;139:704-9.
256. Reaven GM, Scott EM, Grant PJ, Lowe GD, Rumley A, Wannamethee SG, et al. Hemostatic abnormalities associated with obesity and the metabolic syndrome. *J Thromb Haemost* 2005;3:1074-85.
257. Bastard JP, Pieroni L, Hainque B. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:192-201.

258. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation* 1996;94:2057-63.
259. Silveira A. Postprandial triglycerides and blood coagulation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:S527-32.
260. Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, et al. Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1991;11:1821-9.
261. Hoekstra T, Geleijnse JM, Schouten EG, Kluft C. Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb Haemost* 2004;91:861-72.
262. Mutch NJ, Wilson HM, Booth NA. Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. *Proc Nutr Soc* 2001;60:341-7.
263. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.
264. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:33-7.

265. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:20-6.
266. Schneider DJ, Absher PM, Ricci MA. Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;96:2868-76.
267. Pandolfi A, Iacoviello L, Capani F, Vitacolonna E, Donati MB, Consoli A. Glucose and insulin independently reduce the fibrinolytic potential of human vascular smooth muscle cells in culture. *Diabetologia* 1996;39:1425-31.
268. Bauer KA, Rosendaal FR, Heit JA. Hypercoagulability: too many tests, too much conflicting data. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2002;353-68.
269. Wilhelmsen L, Svardsudd K, Korsan-Bengtson K, Larsson B, Welin L, Tibblin G. Fibrinogen as a risk factor for stroke and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1984;311:501-5.
270. Meade TW, North WR, Chakrabarti R, Stirling Y, Haines AP, Thompson SG, et al. Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. *Lancet* 1980;1:1050-4.
271. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-7.

272. Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1993;342:1076-9.
273. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:54-9.
274. Kannel WB, D'Agostino RB, Belanger AJ. Update on fibrinogen as a cardiovascular risk factor. *Ann Epidemiol* 1992;2:457-66.
275. 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.
276. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995;332:635-41.
277. Woodward M, Lowe GD, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, Philippou H, Lane DA, et al. Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The Third Glasgow MONICA Survey. II. Relationships to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol* 1997;97:785-97.
278. 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.

279. 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.
280. 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.
281. 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.
282. 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.
283. 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.
284. 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.
285. 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.
286. Vayá A, Martínez M, Santos MT, Vallés J, Llopis I, Aznar J. Lipid peroxides and red blood cell deformability in familial hypercholesterolemia. *Clin Hemorheol* 1995;15:677-680.

287. Aarts PA, Heethaar RM, Sixma JJ. Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood. *Blood* 1984;64:1228-33.
288. Juhan I, Vague P, Buonocore M, Moulin JP, Jouve R, Vialettes B. Abnormalities of erythrocyte deformability and platelet aggregation in insulin-dependent diabetics corrected by insulin in vivo and in vitro. *Lancet* 1982;1:535-7.
289. Vayá A, Martínez M, Aznar J. Erythrocyte deformability in patients with an ischemic pathology. *Thromb Res* 1990;57:669-71.
290. Demiroglu H, Barista I, Dündar S. Erythrocyte aggregability in patients with coronary heart disease. *Clin Hemorheol* 1996;16:313-7.
291. 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.
292. Demiroglu H. The importance of erythrocyte aggregation in blood rheology: considerations on the pathophysiology of thrombotic disorders. *Blood* 1997;89:4236.
293. 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.
294. Fowkes FG, Pell JP, Donnan PT, Housley E, Lowe GD, Riemersma RA, et al. Sex differences in susceptibility to etiologic factors for peripheral atherosclerosis. Importance of plasma fibrinogen and blood viscosity. *Arterioscler Thromb* 1994;14:862-8.

295. 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.
296. 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.
297. Welin L, Svardsudd K, Wilhelmsen L, Larsson B, Tibblin G. Analysis of risk factors for stroke in a cohort of men born in 1913. *N Engl J Med* 1987;317:521-6.
298. Fon EA, Mackey A, Cote R, Wolfson C, McIlraith DM, Leclerc J, et al. Hemostatic markers in acute transient ischemic attacks. *Stroke* 1994;25:282-6.
299. Meade TW, Cooper JA, Chakrabarti R, Miller GJ, Stirling Y, Howarth DJ. Fibrinolytic activity and clotting factors in ischaemic heart disease in women. *BMJ* 1996;312:1581.
300. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1997;96:1102-8.
301. Cortellaro M, Boschetti C, Cofrancesco E, Zanussi C, Catalano M, de Gaetano G, et al. The PLAT Study: hemostatic function in relation to atherothrombotic ischemic events in vascular disease patients. Principal results. PLAT Study Group. Progetto Lombardo Atero-Trombosi (PLAT) Study Group. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1063-70.

302. Folsom AR, Wu KK, Shahar E, Davis CE. Association of hemostatic variables with prevalent cardiovascular disease and asymptomatic carotid artery atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1829-36.
303. Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Yudkin JS, Nijpels G, et al. Von Willebrand factor, C-reactive protein, and 5-year mortality in diabetic and nondiabetic subjects: the Hoorn Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:3071-8.
304. Rumley A, Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell JW, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Br J Haematol* 1999;105:110-6.
305. Halbmayer WM, Haushofer A, Schon R, Fischer M. The prevalence of poor anticoagulant response to activated protein C (APC resistance) among patients suffering from stroke or venous thrombosis and among healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:51-7.
306. Marz W, Seydewitz H, Winkelmann B, Chen M, Nauck M, Witt I. Mutation in coagulation factor V associated with resistance to activated protein C in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1995;345:526.
307. Samani NJ, Lodwick D, Martin D, Kimber P. Resistance to activated protein C and risk of premature myocardial infarction. *Lancet* 1994;344:1709-10.
308. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;332:912-7.

309. Kontula K, Ylikorkala A, Miettinen H, Vuorio A, Kauppinen-Makelin R, Hamalainen L, et al. Arg506Gln factor V mutation (factor V Leiden) in patients with ischaemic cerebrovascular disease and survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1995;73:558-60.
310. Catto A, Carter A, Ireland H, Bayston TA, Philippou H, Barrett J, et al. Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation in relation to the development of acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:783-5.
311. Van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Slagboom PE, Meijer P, de Jong PT, et al. Reduced response to activated protein C is associated with increased risk for cerebrovascular disease. *Ann Intern Med* 1996;125:265-9.
312. 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).
313. 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.
314. Lindgren A, Lindoff C, Norrving B, Astedt B, Johansson BB. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in stroke patients. *Stroke* 1996;27:1066-71.
315. Takazoe K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Soejima H, Miyao Y, et al. Increased plasminogen activator inhibitor activity and diabetes predict subsequent coronary events in patients with angina pectoris. *Ann Med* 2001;33:206-12.
316. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1985;313:1557-63.

317. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.
318. Jansson JH, Nilsson TK, Olofsson BO. Tissue plasminogen activator and other risk factors as predictors of cardiovascular events in patients with severe angina pectoris. *Eur Heart J* 1991;12:157-61.
319. Lundblad D, Dinesen B, Rautio A, Roder ME, Eliasson M. Low level of tissue plasminogen activator activity in non-diabetic patients with a first myocardial infarction. *J Intern Med* 2005;258:13-20.
320. Lowe GD, Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Thomas HF, Elwood PC. Fibrin D-dimer, tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor, and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Study. *Thromb Haemost* 1998;79:129-33.
321. Cushman M, Lemaitre RN, Kuller LH, Psaty BM, Macy EM, Sharrett AR, et al. Fibrinolytic activation markers predict myocardial infarction in the elderly. The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:493-8.
322. Lowe GD, Danesh J, Lewington S, Walker M, Lennon L, Thomson A, et al. Tissue plasminogen activator antigen and coronary heart disease. Prospective study and meta-analysis. *Eur Heart J* 2004;25:252-9.
323. Juhan-Vague I, Alessi MC. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 1997;78:656-60.
324. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241-7.

325. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, Vecchione G, Celentano E, Cappucci G, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1741-5.
326. Johansson L, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Stegmayr B, Hallmans G. Tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor-1, and tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 complex as risk factors for the development of a first stroke. *Stroke* 2000;31:26-32.
327. Boekholdt SM, Bijsterveld NR, Moons AH, Levi M, Buller HR, Peters RJ. Genetic variation in coagulation and fibrinolytic proteins and their relation with acute myocardial infarction: a systematic review. *Circulation* 2001;104:3063-8.
328. Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-23.
329. Juhan-Vague I, Morange PE, Frere C, Aillaud MF, Alessi MC, Hawe E, et al. The plasminogen activator inhibitor-1 -675 4G/5G genotype influences the risk of myocardial infarction associated with elevated plasma proinsulin and insulin concentrations in men from Europe: the HIFMECH study. *J Thromb Haemost* 2003;1:2322-9.
330. Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Etude CasTemoins de l'infarctus du Myocarde. Thromb Haemost* 1995;74:837-41.

331. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.
332. Heijmans BT, Westendorp RG, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Angiotensin I-converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 gene variants: risk of mortality and fatal cardiovascular disease in an elderly population-based cohort. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1176-83.
333. Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Italian Study Group. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003;107:1117-22.
334. Roest M, van der Schouw YT, Banga JD, Tempelman MJ, de Groot PG, Sixma JJ, et al. Plasminogen activator inhibitor 4G polymorphism is associated with decreased risk of cerebrovascular mortality in older women. *Circulation* 2000;101:67-70.
335. Bang CO, Park HK, Ahn MY, Shin HK, Hwang KY, Hong SY. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2001;11:294-9.
336. Eliasson MC, Jansson JH, Lindahl B, Stegmayr B. High levels of tissue plasminogen activator (tPA) antigen precede the development of type 2 diabetes in a longitudinal population study. The Northern Sweden MONICA study. *Cardiovasc Diabetol* 2003;2:19.
337. Mannucci PM, Bernardinelli L, Foco L, Galli M, Ribichini F, Tubaro M, et al. Tissue plasminogen activator antigen is strongly associated with myocardial infarction in young women. *J Thromb Haemost* 2005;3:280-6.

338. Virchow R. [Thrombose und embolie]. Germany: Verlag von Johann Ambrosius Barth, 1910.
339. Dormandy JA, Edelman JB. High blood viscosity: an aetiological factor in venous thrombosis. *Br J Surg* 1973;60:187-90.
340. 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).
341. 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.
342. Chabanel A, Horellou MH, Conard J, Samama MM. Red blood cell aggregability in patients with a history of leg vein thrombosis: influence of post-thrombotic treatment. *Br J Haematol* 1994;88:174-9.
343. Reizenstein P. The haematological stress syndrome. *Br J Haematol* 1979;43:329-34.
344. 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.
345. 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.
346. 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.

347. 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.
348. Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, Henderson P, Blajchman MA. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med* 1992;116:754-61.
349. Tomczak JA, Ando RA, Sobel HG, Bovill EG, Long GL. Genetic analysis of a large kindred exhibiting type I protein C deficiency and associated thrombosis. *Thromb Res* 1994;74:243-54.
350. Simmonds RE, Ireland H, Lane DA, Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B. Clarification of the risk for venous thrombosis associated with hereditary protein S deficiency by investigation of a large kindred with a characterized gene defect. *Ann Intern Med* 1998;128:8-14.
351. Martinelli I. Risk factors in venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;86:395-403.
352. Kyrle PA, Minar E, Hirschl M, Bialonczyk C, Stain M, Schneider B, et al. High plasma levels of factor VIII and the risk of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000;343:457-62.
353. 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.
354. 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.

355. 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.
356. Rodeghiero F, Tosetto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999;130:643-50.
357. De Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999;93:1271-6.
358. Ohashi R, Sugimura M, Kawamura T, Tamura N, Kanayama N. Sensitivity to activated protein C in patients with deep vein thrombosis during early puerperium period. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84:799-801.
359. Páramo JA, Alfaro MJ, Rocha E. Postoperative changes in the plasmatic levels of tissue-type plasminogen activator and its fast-acting inhibitor--relationship to deep vein thrombosis and influence of prophylaxis. *Thromb Haemost* 1985;54:713-6.
360. Wiman B, Ljungberg B, Chmielewska J, Urden G, Blomback M, Johnsson H. The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. *J Lab Clin Med* 1985;105:265-70.
361. Lisman T, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. *Blood* 2005;105:1102-5.
362. Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philip-Joet C, et al. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1987;57:67-72.

363. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Shen C, Newcomer LM, et al. Baseline fibrinolytic state and the risk of future venous thrombosis. A prospective study of endogenous tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Circulation* 1992;85:1822-7.
364. Korninger C, Lechner K, Niessner H, Gossinger H, Kundi M. Impaired fibrinolytic capacity predisposes for recurrence of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1984;52:127-30.
365. Sartori MT, Danesin C, Saggiorato G, Tormene D, Simioni P, Spiezia L, et al. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. *Clin Appl Thromb Hemost* 2003;9:299-307.
366. Balta G, Altay C, Gurgey A. PAI-1 gene 4G/5G genotype: A risk factor for thrombosis in vessels of internal organs. *Am J Hematol* 2002;71:89-93.
367. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005;3:35-45.
368. Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ascherio A, Spiegelman D, Colditz GA, et al. Body size and fat distribution as predictors of coronary heart disease among middle-aged and older US men. *Am J Epidemiol* 1995;141:1117-27.
369. Manson JE, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Hunter DJ, Hankinson SE, et al. Body weight and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;333:677-85.
370. Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. AHA Nutrition Committee. *Circulation* 1998;97:2099-100.

371. Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Monson RR, et al. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1990;322:882-9.
372. Rexrode KM, Hennekens CH, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 1997;277:1539-45.
373. Goldhaber SZ, Savage DD, Garrison RJ, Castelli WP, Kannel WB, McNamara PM, et al. Risk factors for pulmonary embolism. The Framingham Study. *Am J Med* 1983;74:1023-8.
374. Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, et al. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *JAMA* 1997;277:642-5.
375. Hamad GG, Choban PS. Enoxaparin for thromboprophylaxis in morbidly obese patients undergoing bariatric surgery: findings of the prophylaxis against VTE outcomes in bariatric surgery patients receiving enoxaparin (PROBE) study. *Obes Surg* 2005;15:1368-74.
376. Samama MM. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. *Arch Intern Med* 2000;160:3415-20.
377. 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.
378. Hansson PO, Eriksson H, Welin L, Svardsudd K, Wilhelmsen L. Smoking and abdominal obesity: risk factors for venous thromboembolism among middle-aged men: "the study of men born in 1913". *Arch Intern Med* 1999;159:1886-90.

379. Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med* 2002;162:1182-9.
380. Serrano Ríos M. Relationship between obesity and the increased risk of major complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1998;28:14-7.
381. Quattrone A, Gambardella A, Carbone AM, Oliveri RL, Lavano A, De Marco EV, et al. A hypofibrinolytic state in overweight patients with cerebral venous thrombosis and isolated intracranial hypertension. *J Neurol* 1999;246:1086-9.
382. White RH, Gettner S, Newman JM, Trauner KB, Romano PS. Predictors of rehospitalization for symptomatic venous thromboembolism after total hip arthroplasty. *N Engl J Med* 2000;343:1758-64.
383. 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.
384. Ogren M, Eriksson H, Bergqvist D, Sternby NH. Subcutaneous fat accumulation and BMI associated with risk for pulmonary embolism in patients with proximal deep vein thrombosis: a population study based on 23 796 consecutive autopsies. *J Intern Med* 2005;258:166-71.
385. Kucher N, Tapson VF, Goldhaber SZ. Risk factors associated with symptomatic pulmonary embolism in a large cohort of deep vein thrombosis patients. *Thromb Haemost* 2005;93:494-8.
386. Ageno W, Piantanida E, Dentali F, Steidl L, Mera V, Squizzato A, et al. Body mass index is associated with the development of the post-thrombotic syndrome. *Thromb Haemost* 2003;89:305-9.

387. Rillaerts E, van Gaal L, Xiang DZ, Vansant G, De Leeuw I. Blood viscosity in human obesity: relation to glucose tolerance and insulin status. *Int J Obes* 1989;13:739-45.
388. Avellone G, Di Garbo V, Cordova R, Cucinella G, De Simone R, Raneli G, et al. Evaluation of cardiovascular risk factors in overweight and obese subjects. *Int Angiol* 1994;13:25-9.
389. Fanari P, Somazzi R, Nasrawi F, Ticozzelli P, Grugni G, Agosti R, et al. Haemorheological changes in obese adolescents after short-term diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:487-94.
390. Landin K, Stigendal L, Eriksson E, Krotkiewski M, Risberg B, Tengborn L, et al. Abdominal obesity is associated with an impaired fibrinolytic activity and elevated plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism* 1990;39:1044-8.
391. Avellone G, Di Garbo V, Cordova R, Raneli G, De Simone R, Bompiani G. Coagulation, fibrinolysis and haemorheology in premenopausal obese women with different body fat distribution. *Thromb Res* 1994;75:223-31.
392. Ditschuneit HH, Flechtner-Mors M, Adler G. Fibrinogen in obesity before and after weight reduction. *Obes Res* 1995;3:43-8.
393. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol* 2000;152:897-907.
394. Poggi M, Palareti G, Biagi R, Legnani C, Parenti M, Babini AC, et al. Prolonged very low calorie diet in highly obese subjects reduces plasma viscosity and red cell aggregation but not fibrinogen. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18:490-6.

395. Craveri A, Tornaghi G, Panagardi L, Ranieri R, Cietto S, Scaglioni S, et al. Hemorheological changes in obesity. *Clinical Hemorheology* 1988;8:723-36.
396. Rosito GA, D'Agostino RB, Massaro J, Lipinska I, Mittleman MA, Sutherland P, et al. Association between obesity and a prothrombotic state: the Framingham Offspring Study. *Thromb Haemost* 2004;91:683-9.
397. Haszon I, Papp F, Kovacs J, Bors M, Nemeth I, Bereczki C, et al. Platelet aggregation, blood viscosity and serum lipids in hypertensive and obese children. *Eur J Pediatr* 2003;162:385-90.
398. Cacciari E, Balsamo A, Palareti G, Cassio A, Argento R, Poggi M, et al. Haemorheologic and fibrinolytic evaluation in obese children and adolescents. *Eur J Pediatr* 1988;147:381-4.
399. Craveri A, Tornaghi G, Panagardi L, Ranieri R, Cietto S, Scaglioni S, et al. Hemorheological changes in obese children and the effect of weight loss. *Clinical Hemorheology* 1992;573-8.
400. Craveri A, Tornaghi G, Panagardi L, Ranieri R, Giavardi L. Weight loss does not affect the hemorheological and fibrinolytic changes in obesity. *Clinical Hemorheology* 1990;10:541-6.
401. Brun JF, Aloulou I, Varlet-Marie E. Hemorheological aspects of the metabolic syndrome: markers of insulin resistance, obesity or hyperinsulinemia? *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;30:203-9.
402. Solerte SB, Fioravanti M, Pezza N, Locatelli M, Schifino N, Cerutti N, et al. Hyperviscosity and microproteinuria in central obesity: relevance to cardiovascular risk. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:417-23.
403. Hankey CR, Rumley A, Lowe GD, Woodward M, Lean ME. Moderate weight reduction improves red cell aggregation and factor VII activity in overweight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:644-50.

404. Carroll S, Cooke CB, Butterly RJ. Plasma viscosity, fibrinogen and the metabolic syndrome: effect of obesity and cardiorespiratory fitness. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:71-8.
405. Pérez-Martín A, Dumortier M, Pierrisnard E, Raynaud E, Mercier J, Brun JF. Multivariate analysis of relationships between insulin sensitivity and blood rheology: is plasma viscosity a marker of insulin resistance? *Clin Hemorheol Microcirc* 2001;25:91-103.
406. Kobayashi S, Hamazaki T, Onishi K, Nomura F. Blood viscosity in fatty liver patients with obesity. *Clinical Hemorheology* 1986;6:629-33.
407. Valensi P, Paries J, Maheo P, Gaudey F, Attali JR. Erythrocyte rheological changes in obese patients: influence of hyperinsulinism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:814-9.
408. Le Devehat C, Khodabandehlou T, Dougny M. [Hemorheological parameters in isolated obesity]. *Diabete Metab* 1992;18:43-7.
409. Wysocki M, Krotkiewski M, Braide M, Bagge U. Hemorheological disturbances, metabolic parameters and blood pressure in different types of obesity. *Atherosclerosis* 1991;88:21-8.
410. Samocha-Bonet D, Ben-Ami R, Shapira I, Shenkerman G, Abu-Abeid S, Stern N, et al. Flow-resistant red blood cell aggregation in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1528-34.
411. Ferretti G, Dotti M, Bartolotta E, Giorgi PL, Curatola G, Bertoli E. Changes of erythrocyte membrane fluidity associated with childhood obesity: a molecular study using fluorescence spectroscopy. *Biochem Med Metab Biol* 1988;40:101-8.
412. Younsi M, Quilliot D, Al-Makdissy N, Delbachian I, Drouin P, Donner M, et al. Erythrocyte membrane phospholipid composition is related to hyperinsulinemia in obese nondiabetic women: effects of weight loss. *Metabolism* 2002;51:1261-8.

413. Faloia E, Garrapa GG, Martarelli D, Camilloni MA, Lucarelli G, Staffolani R, et al. Physicochemical and functional modifications induced by obesity on human erythrocyte membranes. *Eur J Clin Invest* 1999;29:432-7.
414. Béguinot F, Tramontano D, Duilio C, Formisano S, Béguinot L, Mattioli P, et al. Alteration of erythrocyte membrane lipid fluidity in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:1226-30.
415. Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *J Lipid Res* 2004;45:1846-51.
416. Candiloros H, Zeghari N, Ziegler O, Donner M, Drouin P. Hyperinsulinemia is related to erythrocyte phospholipid composition and membrane fluidity changes in obese nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2912-8.
417. Zeghari N, Vidal H, Younsi M, Ziegler O, Drouin P, Donner M. Adipocyte membrane phospholipids and PPAR-gamma expression in obese women: relationship to hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E736-43.
418. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121-32.
419. Schroit AJ, Zwaal RF. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991;1071:313-29.
420. Samochoa-Bonet D, Lichtenberg D, Tomer A, Deutsch V, Mardi T, Goldin Y, et al. Enhanced erythrocyte adhesiveness/aggregation in obesity corresponds to low-grade inflammation. *Obes Res* 2003;11:403-7.

421. Primrose JN, Davies JA, Prentice CR, Hughes R, Johnston D. Reduction in factor VII, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor-1 activity after surgical treatment of morbid obesity. *Thromb Haemost* 1992;68:396-9.
422. Marckmann P, Toubro S, Astrup A. Sustained improvement in blood lipids, coagulation, and fibrinolysis after major weight loss in obese subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:329-33.
423. Svendsen OL, Hassager C, Christiansen C, Nielsen JD, Winther K. Plasminogen activator inhibitor-1, tissue-type plasminogen activator, and fibrinogen: effect of dieting with or without exercise in overweight postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:381-5.
424. Slabber M, Barnard HC, Kuyl JM, Badenhorst CJ. Effect of a short-term very low calorie diet on plasma lipids, fibrinogen, and factor VII in obese subjects. *Clin Biochem* 1992;25:334-5.
425. Folsom AR, Qamhieh HT, Wing RR, et al. Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately overweight adults. *Arterioscler Thromb* 1993;13:162-9.
426. Peyreigne C, Bouix D, Aissa Benhaddad A, Raynaud E, Pérez-Martín A, Mercier J, et al. Hemorheologic effects of a short-term ketogenic diet. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999;21:147-53.
427. Luyckx FH, Scheen AJ, Desai C, Dewe W, Gielen JE, Lefebvre PJ. Effects of gastroplasty on body weight and related biological abnormalities in morbid obesity. *Diabetes Metab* 1998;24:355-61.

428. Lindahl B, Nilsson TK, Jansson JH, Asplund K, Hallmans G. Improved fibrinolysis by intense lifestyle intervention. A randomized trial in subjects with impaired glucose tolerance. *J Intern Med* 1999;246:105-12.
429. Rissanen P, Vahtera E, Krusius T, Uusitupa M, Rissanen A. Weight change and blood coagulability and fibrinolysis in healthy obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:212-8.
430. Mavri A, Stegnar M, Sentocnik JT, Videcnik V. Impact of weight reduction on early carotid atherosclerosis in obese premenopausal women. *Obes Res* 2001;9:511-6.
431. Levy Y, Elias N, Cogan U, Yeshurun D. Abnormal erythrocyte rheology in patients with morbid obesity. *Angiology* 1993;44:713-7.
432. Clagett GP, Anderson FA Jr, Geerts W, Heit JA, Knudson M, Lieberman JR, et al. Prevention of venous thromboembolism. *Chest* 1998;114:531S-560S.
433. Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schulte H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. *Thromb Haemost* 1985;54:475-9.
434. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Lindstedt G, Tengborn L. Hemostatic and metabolic variables in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1994;61:455-60.
435. Cigolini M, Targher G, Bergamo Andreis IA, Tonoli M, Agostino G, De Sandre G. Visceral fat accumulation and its relation to plasma hemostatic factors in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:368-74.

436. Cigolini M, Targher G, Agostino G, Tonoli M, Muggeo M, De Sandre G. Liver steatosis and its relation to plasma haemostatic factors in apparently healthy men--role of the metabolic syndrome. *Thromb Haemost* 1996;76:69-73.
437. De Pergola G, De Mitrio V, Giorgino F, Sciaraffia M, Minenna A, Di Bari L, et al. Increase in both pro-thrombotic and anti-thrombotic factors in obese premenopausal women: relationship with body fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:527-535.
438. Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G, et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993;70:380-5.
439. Meigs JB, Mittleman MA, Nathan DM, Tofler GH, Singer DE, Murphy-Sheehy PM, et al. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA* 2000;283:221-8.
440. Warner D, Mansfield MW, Grant PJ. Coagulation factor XIII and cardiovascular disease in UK Asian patients undergoing coronary angiography. *Thromb Haemost* 2001;85:408-11.
441. Rodeghiero F, Tosetto A. The epidemiology of inherited thrombophilia: the VITA Project. *Vicenza Thrombophilia and Atherosclerosis Project*. *Thromb Haemost* 1997;78:636-40.
442. Tosetto A, Missiaglia E, Gatto E, Rodeghiero F. The VITA project: phenotypic resistance to activated protein C and FV Leiden mutation in the general population. *Vicenza Thrombophilia and Atherosclerosis*. *Thromb Haemost* 1997;78:859-63.

443. Lowe GD, Rumley A, Woodward M, Reid E, Rumley J. Activated protein C resistance and the FV:R506Q mutation in a random population sample--associations with cardiovascular risk factors and coagulation variables. *Thromb Haemost* 1999;81:918-24.
444. Bowles LK, Cooper JA, Howarth DJ, Miller GJ, MacCallum PK. Associations of haemostatic variables with body mass index: a community-based study. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:569-73.
445. Pannacciulli N, De Mitrio V, Sciaraffia M, Giorgino R, De Pergola G. A family history of type 2 diabetes is associated with lower sensitivity to activated protein C in overweight and obese premenopausal women. *Thromb Haemost* 2001;86:1593-4.
446. Fendri S, Roussel B, Lormeau B, Tribout B, Lalau JD. Insulin sensitivity, insulin action, and fibrinolysis activity in nondiabetic and diabetic obese subjects. *Metabolism* 1998;47:1372-5.
447. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 1991;34:457-62.
448. Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:286-8.
449. Mavri A, Alessi MC, Juhan-Vague I. Hypofibrinolysis in the insulin resistance syndrome: implication in cardiovascular diseases. *J Intern Med* 2004;255:448-56.
450. Bastard JP, Pieroni L. Plasma plasminogen activator inhibitor 1, insulin resistance and android obesity. *Biomed Pharmacother* 1999;53:455-61.
451. Janand-Delenne B, Chagnaud C, Raccach D, Alessi MC, Juhan-Vague I, Vague P. Visceral fat as a main determinant of plasminogen activator inhibitor 1 level in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998;22:312-7.

452. Ferguson MA, Gutin B, Owens S, Litaker M, Tracy RP, Allison J. Fat distribution and hemostatic measures in obese children. *Am J Clin Nutr* 1998;67:1136-40.
453. De Lorenzo F, Mukherjee M, Kadziola Z, Suleiman S, Kakkar VV. Association of overall adiposity rather than body mass index with lipids and procoagulant factors. *Thromb Haemost* 1998;80:603-6.
454. Bastelica D, Morange P, Berthet B, Borghi H, Lacroix O, Grino M, et al. Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:173-8.
455. Eriksson P, Reynisdottir S, Lonnqvist F, Stemme V, Hamsten A, Arner P. Adipose tissue secretion of plasminogen activator inhibitor-1 in non-obese and obese individuals. *Diabetologia* 1998;41:65-71.
456. Cigolini M, Tonoli M, Borgato L, Frigotto L, Manzato F, Zeminian S, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF-alpha? *Atherosclerosis* 1999;143:81-90.
457. Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, et al. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta 1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 2000;49:1374-80.
458. Eriksson P, Van Harmelen V, Hoffstedt J, Lundquist P, Vidal H, Stemme V, et al. Regional variation in plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipose tissue from obese individuals. *Thromb Haemost* 2000;83:545-8.

459. Schneider DJ, Sobel BE. Augmentation of synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin and insulin-like growth factor type I: implications for vascular disease in hyperinsulinemic states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9959-63.
460. Oishi K, Ohkura N, Wakabayashi M, Shiri H, Sato K, Matsuda J, Atsumi G, Ishida N. CLOCK is involved in obesity-induced disordered fibrinolysis in ob/ob mice by regulating PAI-1 gene expression. *J Thromb Haemost* 2006;4:1774-80.
461. Morange PE, Lijnen HR, Alessi MC, Kopp F, Collen D, Juhan-Vague I. Influence of PAI-1 on adipose tissue growth and metabolic parameters in a murine model of diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1150-4.
462. Schafer K, Fujisawa K, Konstantinides S, Loskutoff DJ. Disruption of the plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces the adiposity and improves the metabolic profile of genetically obese and diabetic ob/ob mice. *FASEB J* 2001;15:1840-2.
463. Lijnen HR, Maquoi E, Morange P, Voros G, Van Hoef B, Kopp F, et al. Nutritionally induced obesity is attenuated in transgenic mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:78-84.
464. Liang X, Kanjanabuch T, Mao S, Hao CM, Tang TW, Declerck PJ, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E103-13.
465. Lijnen HR. Effect of plasminogen activator inhibitor-1 deficiency on nutritionally-induced obesity in mice. *Thromb Haemost* 2005;93:816-9.

466. Hoffstedt J, Andersson IL, Persson L, Isaksson B, Arner P. The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002;45:584-7.
467. Kinik ST, Atac FB, Verdi H, Cetintas S, Sahin FI, Ozbek N. The effect of plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism on glucose and lipid metabolisms in Turkish obese children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:607-10.
468. Sartori MT, Vettor R, De Pergola G, De Mitrio V, Saggiorato G, Della Mea P, et al. Role of the 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter on PAI-1 levels in obese patients: influence of fat distribution and insulin-resistance. *Thromb Haemost* 2001;86:1161-9.
469. McCormack LJ, Nagi DK, Stickland MH, Mansfield MW, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, et al. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype in Pima Indians: relationship to plasminogen activator inhibitor-1 levels and features of the insulin resistance syndrome. *Diabetologia* 1996;39:1512-8.
470. Estellés A, Dalmau J, Falcó C, Berbel O, Castelló R, España F, et al. Plasma PAI-1 levels in obese children--effect of weight loss and influence of PAI-1 promoter 4G/5G genotype. *Thromb Haemost* 2001;86:647-52.
471. Lopes C, Dina C, Durand E, Froguel P. PAI-1 polymorphisms modulate phenotypes associated with the metabolic syndrome in obese and diabetic Caucasian population. *Diabetologia* 2003;46:1284-90.
472. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.

473. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995;44:855-8.
474. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;98:1101-6.
475. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1995;1:950-3.
476. Mertens I, Considine RV, Van der Planken M, Van Gaal LF. Hemostasis and fibrinolysis in non-diabetic overweight and obese men and women. Is there still a role for leptin? *Eur J Endocrinol* 2006;155:477-84.
477. De Mitrio V, De Pergola G, Vettor R, Marino R, Sciaraffia M, Pagano C, et al. Plasma plasminogen activator inhibitor-I is associated with plasma leptin irrespective of body mass index, body fat mass, and plasma insulin and metabolic parameters in premenopausal women. *Metabolism* 1999;48:960-4.
478. Mavri A, Stegnar M, Krebs M, Sentocnik JT, Geiger M, Binder BR. Impact of adipose tissue on plasma plasminogen activator inhibitor-1 in dieting obese women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1582-7.
479. Solano MP, Perry AC, Wang X, Ross R, Goldberg RB. Insulin resistance but not visceral adipose tissue is associated with plasminogen activator inhibitor type 1 levels in overweight and obese premenopausal African-American women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:82-7.

480. Valle M, Gascón F, Martos R, Bermudo F, Ceballos P, Suanes A. Relationship between high plasma leptin concentrations and metabolic syndrome in obese pre-pubertal children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:13-8.
481. Sudi KM, Gallistl S, Weinhandl G, Muntean W, Borkenstein MH. Relationship between plasminogen activator inhibitor-1 antigen, leptin, and fat mass in obese children and adolescents. *Metabolism* 2000;49:890-5.
482. Uzun H, Zengin K, Taskin M, Aydin S, Simsek G, Dariyerli N. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes Surg* 2004;14:659-65.
483. Kockx M, Leenen R, Seidell J, Princen HM, Kooistra T. Relationship between visceral fat and PAI-1 in overweight men and women before and after weight loss. *Thromb Haemost* 1999;82:1490-6.
484. Bastard JP, Vidal H, Jardel C, Bruckert E, Robin D, Vallier P, et al. Subcutaneous adipose tissue expression of plasminogen activator inhibitor-1 gene during very low calorie diet in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:70-4.
485. Calles-Escandon J, Ballor D, Harvey-Berino J, Ades P, Tracy R, Sobel B. Amelioration of the inhibition of fibrinolysis in elderly, obese subjects by moderate energy intake restriction. *Am J Clin Nutr* 1996;64:7-11.
486. Mavri A, Alessi MC, Bastelica D, Geel-Georgelin O, Fina F, Sentocnik JT, et al. Subcutaneous abdominal, but not femoral fat expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is related to plasma PAI-1 levels and insulin resistance and decreases after weight loss. *Diabetologia* 2001;44:2025-31.

487. Andersen P, Seljeflot I, Abdelnoor M, Arnesen H, Dale PO, Lovik A, et al. Increased insulin sensitivity and fibrinolytic capacity after dietary intervention in obese women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1995;44:611-6.
488. Mertens I, Van Gaal LF. Visceral fat as a determinant of fibrinolysis and hemostasis. *Semin Vasc Med* 2005;5:48-55.
489. Velthuis-te Wierik EJ, Meijer P, Kluft C, van den Berg H. Beneficial effect of a moderately energy-restricted diet on fibrinolytic factors in non-obese men. *Metabolism* 1995;44:1548-52.
490. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:S37-42.
491. Velasco JA, Cosin J, Maroto JM, Muñoz J, Casasnovas JA, Plaza I, et al. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en prevención cardiovascular y rehabilitación cardiaca. *Rev Esp Cardiol* 2000;53:1095-120.
492. Koppes LL, Dekker JM, Hendriks HF, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care* 2005;28:719-25.
493. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413-46.
494. ICSH (International Committee for Standardization in Haematology. Expert Panel on Blood Rheology). Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1986;6:439.
495. Jung F, Roggenkamp HG, Schneider R, Kiesewetter H. [The capillary tube plasma viscosimeter. A new apparatus for measuring plasma viscosity]. *Biomed Tech (Berl)* 1983;28:249-52.

496. Schmid-Schönbein H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H, Daver V, Heilmann L. New hemorrheological techniques for the routine laboratory. *Clin Hemorrhheol* 1983;2:93-105.
497. Chabanel A, Samama M. Evaluation of a method to assess red blood cell aggregation. *Biorheology* 1989;26:785-97.
498. Ruef P, Pöschl JMB, Linderkamp O. The Rheodyn SSD for measuring erythrocyte deformability. *Biorheology* 1995;357-358.
499. Kleinfeld AM, Storms S, Watts M. Transport of long-chain native fatty acids across human erythrocyte ghost membranes. *Biochemistry* 1998;37:8011-8019.
500. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
501. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79:885-96.
502. Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, Schott MA, Discher D, Ernst JD, et al. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. *Blood* 1998;91:3044-51.
503. Kuypers FA, Lewis RA, Hua M, Schott MA, Discher D, Ernst JD, et al. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V. *Blood* 1996;87:1179-87.
504. Bertina RM. Laboratory diagnosis of resistance to activated protein C (APC-resistance). *Thromb Haemost* 1997;78:478-82.

505. 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.
506. 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.
507. Margaglione M, Grandone E, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, et al. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb Haemost* 1997;77:605-6.
508. Junker R, Heinrich J, Ulbrich H, Schulte H, Schonfeld R, Kohler E, et al. Relationship between plasma viscosity and the severity of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:870-5.
509. Imperatore G, Riccardi G, Iovine C, Rivellese AA, Vaccaro O. Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes Care* 1998;21:649-54.
510. Juhan-Vague I, Thompson SG, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome. A study of 1500 patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group. *Arterioscler Thromb* 1993;13:1865-73.
511. Pickart LR, Thaler MM. Fatty acids, fibrinogen and blood flow: a general mechanism for hyperfibrinogenemia and its pathologic consequences. *Med Hypotheses* 1980;6:545-57.
512. Yudkin JS. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in insulin resistance. Evidence for a common antecedent? *Diabetes Care* 1999;22 Suppl 3:C25-30.

513. Marill KA. Advanced statistics: linear regression, part II: multiple linear regression. *Acad Emerg Med* 2004;11:94-102.
514. Lo Presti R, Sinagra D, Montana M, Scarpitta AM, Catania A, Caimi G. Haemorheological profile in metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002;26:241-7.
515. Vayá A, Simó M, Santaolaria M, Todolí J, Aznar J. Red blood cell deformability in iron deficiency anaemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 2005;33:75-80.
516. Wiewiora M, Slowinska L, Wylezol M, Pardela M, Kobielski A. Rheological properties of erythrocytes in patients suffering from morbid obesity. Examination with LORCA device. *Clin Hemorheology* 2006;34:499-506.
517. Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL. A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J Clin Pathol* 1976;29:855-8.
518. Stuart J. Erythrocyte rheology. *J Clin Pathol* 1985;38:965-77.
519. Hanss M. Erythrocyte filtrability measurement by the initial flow rate method. *Biorheology* 1983;20:199-211.
520. Stuart J, Stone PCS, Bareford D. Evaluation of leukocyte removal methods for studies of erythrocyte deformability. *Clin Hemorheology* 1985;5:137.
521. Stuart J, Kenny MW. Blood rheology. *J Clin Pathol* 1980;33:417-29.
522. Martínez M, Vayá A, Gil L, Martí R, Dalmau J, Aznar J. Alteraciones hemorreológicas y obesidad infantil. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia* 1999;12:95-8.

523. Hernández A, Ferrer MD, García MC, Serrano S, Sánchez C, Ascaso JF, et al. Secreción de insulina y péptido C tras la ingesta e interacción de la insulina con su receptor eritrocitario en una familia con diabetes tipo MODY. *Med Clin (Barc)* 1989;93:281-5.
524. Bryszewska M, Leyko W. Effect of insulin on human erythrocyte membrane fluidity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1983;24:311-3.
525. Berlin E, Bhathena SJ, Judd JT, Nair PP, Jones DY, Taylor PR. Dietary fat and hormonal effects on erythrocyte membrane fluidity and lipid composition in adult women. *Metabolism* 1989;38:790-6.
526. Rahmani-Jourdheuil D, Mourayre Y, Vague P, Boyer J, Juhan-Vague I. In vivo insulin effect on ATPase activities in erythrocyte membrane from insulin-dependent diabetics. *Diabetes* 1987;36:991-5.
527. Sandhagen B. Red cell fluidity in hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 1999;21:179-81.
528. Cinara L, Bollini A, Gayol MC, Hernández GN. *In vitro* effect of insulin on rats erythrocytes rheological behaviour. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;35:367-373.
529. Ernst E, Matrai A. Altered red and white blood cell rheology in type II diabetes. *Diabetes* 1986;35:1412-5.
530. Mokken FC, Kedaria M, Henny CP, Hardeman MR, Gelb AW. The clinical importance of erythrocyte deformability, a hemorrheological parameter. *Ann Hematol* 1992;64:113-22.
531. Babu N, Singh M. Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004;31:273-80.
532. Vague P, Juhan I. Red cell deformability, platelet aggregation, and insulin action. *Diabetes* 1983;32:88-91.

533. Gelmini G, Butturini L, Cucinotta D, Delsignore R, Coiro V. Whole blood filterability in elderly obese women. *Acta Diabetol Lat* 1987;24:199-203.
534. Martínez M, Vayá A, Server R, Gilsanz A, Aznar J. Alterations in erythrocyte aggregability in diabetics: the influence of plasmatic fibrinogen and phospholipids of the red blood cell membrane. *Clin Hemorheol Microcirc* 1998;18:253-8.
535. Gottlieb MH. Rates of cholesterol exchange between human erythrocytes and plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1980;600:530-41.
536. Srinivasan SR, Amos C, Albares R, Bhandaru RR, Dalferes ER Jr, Webber LS, et al. Influence of serum lipoproteins and carbohydrate metabolism on erythrocyte membrane composition in children: Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 1986;35:466-71.
537. Ferretti G, Curatola G, Bertoli E, Catassi C, Giorgi PL. Erythrocyte membrane fluidity and changes in plasma lipid composition: a possible relationship in childhood obesity. *Biochem Med Metab Biol* 1991;46:1-9.
538. Nikolic M, Stanic D, Antonijevic N, Niketic V. Cholesterol bound to hemoglobin in normal human erythrocytes: a new form of cholesterol in circulation? *Clin Biochem* 2004;37:22-6.
539. Hadengue AL, Del-Pino M, Simon A, Levenson J. Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans. *Hypertension* 1998;32:324-30.
540. Setty BN, Kulkarni S, Stuart MJ. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood* 2002;99:1564-71.

541. Atichartakarn V, Angchaisuksiri P, Aryurachai K, Onpun S, Chuncharunee S, Thakkinstian A, et al. Relationship between hypercoagulable state and erythrocyte phosphatidylserine exposure in splenectomized haemoglobin E/beta-thalassaemic patients. *Br J Haematol* 2002;118:893-8.
542. Schlegel RA, Prendergast TW, Williamson P. Membrane phospholipid asymmetry as a factor in erythrocyte-endothelial cell interactions. *J Cell Physiol* 1985;123:215-8.
543. Wahid ST, Marshall SM, Thomas TH. Increased platelet and erythrocyte external cell membrane phosphatidylserine in type 1 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 2001;24:2001-3.
544. Wali RK, Jaffe S, Kumar D, Kalra VK. Alterations in organization of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus. *Diabetes* 1988;37:104-11.
545. Closse C, Dachary-Prigent J, Boisseau MR. Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium. *Br J Haematol* 1999;107:300-2.
546. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405:85-90.
547. De Jong K, Emerson RK, Butler J, Bastacky J, Mohandas N, Kuypers FA. Short survival of phosphatidylserine-exposing red blood cells in murine sickle cell anemia. *Blood* 2001;98:1577-84.
548. Bonomini M, Sirolli V, Settefrati N, Dottori S, Di Liberato L, Arduini A. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1982-90.

549. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, et al. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002;12:365-72.
550. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:971-88.
551. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
552. De Jong K, Geldwerth D, Kuypers FA. Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymmetry in human erythrocytes. *Biochemistry* 1997;36:6768-76.
553. De Simone G, Devereux RB, Chien S, Alderman MH, Atlas SA, Laragh JH. Relation of blood viscosity to demographic and physiologic variables and to cardiovascular risk factors in apparently normal adults. *Circulation* 1990;81:107-17.
554. Hoieggen A, Fossum E, Moan A, Enger E, Kjeldsen SE. Whole-blood viscosity and the insulin-resistance syndrome. *J Hypertens* 1998;16:203-10.
555. Valencia-Flores M, Orea A, Castaño VA, Resendiz M, Rosales M, Rebollar V, et al. Prevalence of sleep apnea and electrocardiographic disturbances in morbidly obese patients. *Obes Res* 2000;8:262-9.
556. Clark P, Brennand J, Conkie JA, McCall F, Greer IA, Walker ID. Activated protein C sensitivity, protein C, protein S and coagulation in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1998;79:1166-70.

557. Laffan MA, Manning R. The influence of factor VIII on measurement of activated protein C resistance. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7:761-5.
558. Bokarewa MI, Blomback M, Egberg N, Rosen S. A new variant of interaction between phospholipid antibodies and the protein C system. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994;5:37-41.
559. Rosing J, Tans G, Nicolaes GA, Thomassen MC, van Oerle R, van der Ploeg PM, et al. Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol* 1997;97:233-8.
560. Mathonnet F, de Mazancourt P, Denninger MH, Morot M, Benattar N, Giudicelli Y. Role of factor VIII on activated protein C resistance ratio in inflammatory diseases. *Br J Haematol* 1996;95:423-5.
561. Griffin JH, Fernández JA, Deguchi H. Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;86:386-94.
562. Griffin JH, Kojima K, Banka CL, Curtiss LK, Fernández JA. High-density lipoprotein enhancement of anticoagulant activities of plasma protein S and activated protein C. *J Clin Invest* 1999;103:219-27.
563. Deguchi H, Fernandez JA, Pabinger I, Heit JA, Griffin JH. Plasma glucosylceramide deficiency as potential risk factor for venous thrombosis and modulator of anticoagulant protein C pathway. *Blood* 2001;97:1907-14.
564. Deguchi H, Bouma BN, Middeldorp S, Lee YM, Griffin JH. Decreased plasma sensitivity to activated protein C by oral contraceptives is associated with decreases in plasma glucosylceramide. *J Thromb Haemost* 2005;3:935-8.
565. De Pergola G, Pannacciulli N. Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity. *J Endocrinol Invest* 2002;25:899-904.

566. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Contribution of polymorphisms in the endothelial protein C receptor gene to soluble endothelial protein C receptor and circulating activated protein C levels, and thrombotic risk. *Thromb Haemost* 2004;91:905-11.
567. Medina P, Navarro S, Estellés A, Vayá A, Bertina RM, España F. Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden. *Thromb Haemost* 2005;94:389-94.
568. España F. Datos no publicados.
569. Nordenhem A, Wiman B. Tissue plasminogen activator (tPA) antigen in plasma: correlation with different tPA/inhibitor complexes. *Scand J Clin Lab Invest* 1998;58:475-83.
570. Juhan-Vague I, Vague P, Alessi MC, Badier C, Valadier J, Aillaud MF, et al. Relationships between plasma insulin triglyceride, body mass index, and plasminogen activator inhibitor 1. *Diabete Metab* 1987;13:331-6.
571. Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, Groeling TM, Kral JG. Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2609-14.
572. Freeman MS, Mansfield MW. To: J.Hoffstedt et al. (2002) The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002;45:1602-3.

573. Bouchard L, Mauriege P, Vohl MC, Bouchard C, Perusse L. Plasminogen-activator inhibitor-1 polymorphisms are associated with obesity and fat distribution in the Quebec Family Study: evidence of interactions with menopause. *Menopause* 2005;12:136-43.
574. Berberoglu M, Evliyaoglu O, Adiyaman P, Ocal G, Ulukol B, Simsek F, Siklar Z. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphism (-675 4G/5G) associated with obesity and vascular risk in children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:741-8.
575. Alessi MC, Bastelica D, Mavri A, Morange P, Berthet B, Grino M, et al. Plasma PAI-1 levels are more strongly related to liver steatosis than to adipose tissue accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1262-8.
576. Potter van Loon BJ, Klufft C, Radder JK, Blankenstein MA, Meinders AE. The cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor type 1 is related to insulin resistance. *Metabolism* 1993;42:945-9.
577. Van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Klufft C, Grobbee DE. The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1. *Blood* 2003;101:1841-4.
578. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, et al. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:851-8.
579. Brown NJ, Murphey LJ, Srikuma N, Koschachuhanan N, Williams GH, Vaughan DE. Interactive effect of PAI-1 4G/5G genotype and salt intake on PAI-1 antigen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1071-7.

580. Vaisanen SB, Humphries SE, Luong LA, Penttila I, Bouchard C, Rauramaa R. Regular exercise, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) activity and the 4G/5G promoter polymorphism in the PAI-1 gene. *Thromb Haemost* 1999;82:1117-20.
581. Grancha S, Estellés A, Tormo G, Falcó C, Gilabert J, España F, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter 4G/5G genotype and increased PAI-1 circulating levels in postmenopausal women with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999;81:516-21.