

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y DE LA
FIBRINOLISIS RELACIONADOS CON LA CARDIOPATÍA
ISQUÉMICA PRECOZ

ESTHER ZORIO GRIMA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Vicente López Merino
- D. Jaime Merino Sánchez
- D. Vicente Vicente García
- D. Enrique Alborch Domínguez
- D. Francisco Javier Chorro Gascó

Va ser dirigida per:

D^a. Amparo Estellés Cortés

D. Luis Almenar Bonet

©Copyright: Servei de Publicacions
Esther Zorio Grima

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6797-1

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

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE MEDICINA
ÀREA DE CONEIXEMENT DE CARDIOLOGIA

**FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y DE LA
FIBRINOLISIS RELACIONADOS CON LA
CARDIOPATÍA ISQUÉMICA PRECOZ**

Memoria presentada por
Doña Esther Zorio Grima
para optar al grado de Doctor
en Medicina y Cirugía.
Valencia, 2006.

Dña. AMPARO ESTELLÉS CORTÉS, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

**"FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y DE LA FIBRINOLISIS
RELACIONADOS CON LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA PRECOZ"**

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Medicina y Cirugía, Doña ESTHER ZORIO GRIMA.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Marzo de dos mil seis.

Fdo: Dra. Amparo Estellés

D. LUIS ALMENAR BONET, Doctor en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto del Servicio de Cardiología del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

**"FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y DE LA FIBRINOLISIS
RELACIONADOS CON LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA PRECOZ"**

Ha sido realizada bajo mi dirección por la licenciada en Medicina y Cirugía, Doña ESTHER ZORIO GRIMA.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Marzo de dos mil seis.

Fdo: Dr. Luis Almenar

D. JOSE MIGUEL RIVERA OTERO, Doctor en Medicina y Cirugía, Director del Centro de Investigación del Hospital LA FE de Valencia.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada:

**"FACTORES DE LA COAGULACIÓN Y DE LA FIBRINOLISIS
RELACIONADOS CON LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA PRECOZ"**

Ha sido realizada en el Centro de Investigación del Hospital LA FE de Valencia por la licenciada en Medicina y Cirugía, Doña ESTHER ZORIO GRIMA.

Y para que así conste, a todos los efectos oportunos, expide y firma la presente certificación, en Valencia a 20 de Marzo de dos mil seis.

Fdo: Dr. José Miguel Rivera

AGRADECIMIENTOS

Imposible recoger aquí todos los nombres de las personas a las que debo cada grano de arena de esta tesis doctoral o cada pequeña inyección de ánimos a continuar hacia adelante. Siempre hacia adelante.

En primer lugar, he de agradecer a mi directora y abuela de mis hijos, la Dra. Amparo Estellés, la dedicación sin fin con que se ha volcado desde siempre en esta tesis, los ratos de desesperación superados a su lado con una dosis extra de ilusión en el proyecto no han hecho sino enseñarme el día a día del investigador entregado.

Mis agradecimientos también al Dr. Luis Almenar, como director de esta tesis, por su inestimable ayuda en el desarrollo de este proyecto, por su amistad y por transmitirme un sentimiento de superación y sentido práctico en mi trabajo.

Al jefe de servicio de Cardiología, el Dr. Antonio Salvador, al director de Centro de Investigación, el Dr. Miguel Rivera, y al director de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe, el Dr. José Vicente Castell, les agradezco sinceramente haberme facilitado la realización de este trabajo.

Deseo agradecer enormemente al Dr. Francisco España su apoyo incondicional a este proyecto. Sus apasionadas y acertadas explicaciones han contribuido, sin duda, al resultado final de estos años de trabajo.

Desde luego, ha sido inestimable la colaboración del Servicio de Cardiología en su conjunto y, muy en particular, la del Dr. Miguel Palencia, el Dr. Miguel Ángel Arnau, la Dra. Ana Osa, el Dr. Joaquín Rueda y el Dr. Luis Martínez-Dolz. Su apoyo en este tiempo (y el que está por venir) como profesionales y como amigos ha sido un estímulo constante.

No puedo dejar de agradecer al Dr. Justo Aznar, Jefe del Departamento de Biopatología Clínica, y al Dr. Edelmiro Réganon, Jefe de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación, su colaboración, su atención y su afecto. Ambos gozan de un reconocido prestigio en el campo de la hemostasia y sus aportaciones han significado un estímulo continuo para el desarrollo de este trabajo.

En realidad, la proximidad y el entusiasmo de la totalidad de los integrantes (actuales o pasados) de la Unidad de Bioquímica del Centro de Investigación ha sido una pieza clave en la realización diaria de esta tesis ya que, sin esa disposición, este amable camino habría sido un arduo camino de piedras. Gracias, por tanto, a la Dra. Virtudes Vila, la Dra. María Teresa Santos, la Dra. Juana Vallés, la Dra. Cristina Falcó, la Dra Remedios Castelló, a Don Luis Ramón, a la Dra. Pilar Medina, a la Doña Silvia Navarro, a Doña Pilar Escamilla, a Doña Úrsula Salinas, a Doña Rosa Valero y a Doña Araceli Serralbo.

Queda lejos el tiempo de estudiante en la Facultad de Medicina, pero entonces conocí a la primera persona, implacable investigadora y dedicada profesora de Fisiología, que gratuitamente creyó en mí como profesional. Me prometí no olvidar su desinteresada inversión en una estudiante del grupo C y, aunque desgraciadamente no nos acompaña más, aquí dejo escrito un agradecimiento sincero para la Dra María Dolores Catalá.

Las horas invertidas en esta tesis a costa de la compañía de mi familia, en especial de mis padres, hermanas y sobrinos, así como de mis amigos y compañeros no han caído en saco roto y serán pronto recompensadas. Gracias de verdad a todos por vuestro desinteresado apoyo diario.

Finalmente, he de confesar que esta tesis no habría tomado forma sin el incondicional impulso de marido, Juan. Para mí, el mejor de los amigos, el más estimulante de los incentivos profesionales y humanos, el más tranquilo de los hogares para disfrutar en paz y el más largo camino por recorrer, juntos y acompañados (al menos) por Inés y Vicente, el reto de la paternidad para los dos.

Este trabajo ha sido financiado por un contrato de investigación de la Fundación para la Investigación del Hospital La Fe y, en parte, por las Ayudas de la Fundación Mutua Madrileña, Agencia Valenciana de Ciencia y Tecnología de la Generalitat Valenciana ACOMP06/086 y ACOMP06/024, y del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria) PI050844 y PI050799.

ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS

A	Absorbancia
AA	Aminoácidos
ag	Antigénico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cADN	ADN complementario
ANOVA	Análisis de la varianza para un factor
APM	Alto peso molecular
APC	Proteína C activada circulante
Apo	Apolipoproteína
ARN	Ácido ribonucleico
ARMm	Ácido ribonucleico mensajero
BCIP	Sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato
BPM	Bajo peso molecular
CPasa	Actividad carboxipeptidasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPCR	Receptor endotelial de la proteína C
HDL	Colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad
fc	Funcional
IC	Intervalo de confianza
IL	Interleucina
LDL	Colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad
Lp(a)	Lipoproteína (a)
N	Tamaño muestral
OPD	Ortofenildiaminodihidrocloro
OR	Odds ratio
p	significación estadística
PAI	Inhibidor de los activadores del plasminógeno
PAR-1	Receptor activado por proteasa tipo 1
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (0,01M, pH 7,4, NaCl 0,14M)
PC	Proteína C

PCI	Inhibidor de la proteína C, también llamado PAI-3
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pdf	Productos de degradación de la fibrina
PET	Tampón PBS/EDTA/Tween 20
pNA	p-Nitroanilina
PS	Proteína S
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
solución STOP	Solución H ₂ SO ₄ 3M
TAFI	Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
TAFIa	TAFI activado
TLE	Tiempo de lisis de las euglobulinas
TM	Trombomodulina
TNF	Factor de necrosis tumoral
tPA	Activador tisular del plasminógeno
sct-PA	Activador tisular del plasminógeno de una cadena
TR	Trombina
uPA	Activador del plasminógeno tipo urokinasa
scu-PA	uPA de una cadena
VLDL	Colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad

Utopía

Ella está en el horizonte
Me acerco dos pasos,
Ella se aleja dos pasos más,
Camino diez pasos y
El horizonte se corre diez
Pasos más
Por mucho que yo camine,
Nunca la alcanzaré
¿Para qué sirve la Utopía?
Para eso sirve:
Para Caminar

Eduardo Galeano

La consecución de los objetivos más difíciles
es la que nos hace dar los pasos más largos
en el terreno social, profesional y personal.

Esther Zorio

*A mis padres y hermanas, a quienes debo lo más
íntimo de mi carácter y, sobre todo, de mis valores.*

*A mis abuelos, porque sé de buena tinta que habrían
disfrutado enormemente de poder estar hoy aquí.*

A Juan, la ilusionante Razón de cada nuevo día.

*A Inés y Vicente,
el mejor de los regalos y el más grande de los premios*

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	53
4.- RESULTADOS	95
5.- DISCUSIÓN	146
6.- CONCLUSIONES	177
7.- BIBLIOGRAFÍA	180

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA. IMPACTO SOCIOSANITARIO.....	2
1. 2. ETIOLOGÍA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA	5
1. 3. NUEVOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	10
1. 4. ASPECTOS GENERALES: HEMOSTASIA Y FIBRINOLISIS...	11
1. 4. 1. Generalidades. Hemostasia	11
1. 4. 1. 1. Endotelio vascular	11
1. 4. 1. 2. Hemostasia primaria	13
1. 4. 1. 3. Coagulación plasmática	14
1. 4. 2. Generalidades. Fibrinólisis	17
1. 4. 3. Factores seleccionados	21
1. 5. FACTORES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO.....	23
1. 5. 1. Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1	23
1. 5. 2. Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	28
1. 6. LIPOPROTEÍNA (a).....	35
1. 7. FACTORES DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN	39
1. 7. 1. Sistema de la proteína C	39
1. 7. 2. Factor V Leiden	46
1. 7. 3. Mutación G20210A del gen de la protrombina	46
1. 8. OTROS FACTORES	48
1. 8. 1. Proteína C reactiva	48
1. 8. 2. Fibrinógeno	48

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
3. 1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	54
3. 2. GRUPOS CLÍNICOS.....	56
3. 3. TOMA DE MUESTRAS.....	60
3. 4. FACTORES DEL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS.....	61
3. 4. 1. Determinación antigénica del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1	61
3. 4. 2. Determinación funcional del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1	64
3. 4. 3. Determinación antigénica del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	65
3. 4. 4. Determinación funcional del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	66
3. 4. 5. Determinación antigénica del activador tisular del plasminógeno	68
3. 4. 6. Determinación del tiempo de lisis de las euglobulinas	68
3. 5. LIPOPROTEINA (a).....	70
3. 5. 1. Determinación antigénica de la lipoproteína (a)	70
3. 5. 2. Determinación del fenotipo de la lipoproteína (a)	71
3. 6. FACTORES DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN	75
3. 6. 1. Cuantificación de la proteína C activada circulante	75
3. 6. 2. Determinación de la proteína C	78
3. 6. 3. Determinación funcional del inhibidor de la proteína C	79

3. 7. OTROS PARÁMETROS	80
3. 7. 1. Otros parámetros hemostáticos	80
3. 7. 2. Otros parámetros generales	81
3. 8. TÉCNICAS MOLECULARES.....	82
3. 8. 1. Extracción de ADN	82
3. 8. 2. Amplificación de fragmentos del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa	85
3. 8. 3. Determinación del polimorfismo 4G/5G del promotor del gen del PAI-1 mediante PCR	87
3. 8. 4. Determinación del polimorfismo C1040T del gen del TAFI mediante PCR	89
3. 8. 5. Determinación del factor V Leiden y de la mutación del G20210A del gen de la protrombina	91
3. 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	93
<u>4. RESULTADOS</u>	<u>95</u>
4. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL.....	97
4. 1. 1. Comparación entre pacientes y controles	97
4. 1. 2. Características específicas de los pacientes	99
4. 2. PARÁMETROS DE LA FIBRINOLISIS Y LA COAGULACIÓN...	103
4. 2. 1. Marcadores de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz.	103
4.2.1.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo1, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina y otros	103
4.2.1.2. Lipoproteína(a)	117
4.2.1.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina	121

4. 2. 2. Marcadores de extensión y severidad de la enfermedad coronaria y/o del desarrollo de eventos en la evolución.	126
4.2.2.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo1, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	126
4.2.2.2. Lipoproteína (a)	132
4.2.2.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina	139
4.2.2.4. Otros parámetros: fibrinógeno y proteína C reactiva	144
5. DISCUSIÓN	146
5. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL.....	148
5.1.1. Comparación entre pacientes y controles	148
5.1.2. Características específicas de los pacientes	148
5. 2. PARÁMETROS DE LA FIBRINOLISIS Y LA COAGULACIÓN....	152
5.2.1. Marcadores de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz.	152
5.2.1.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina y otros	152
5.2.1.2. Lipoproteína (a)	160
5.2.1.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina	162
5.2.2. Marcadores de extensión y severidad de la enfermedad coronaria y/o del desarrollo de eventos en la evolución.	167
5.2.2.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 e inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina	167
5.2.2.2. Lipoproteína (a)	168
5.2.2.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina	172

5.3. DISCUSIÓN FINAL.....	174
<u>6. CONCLUSIONES</u>	<u>177</u>
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>180</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Distribución proporcional de las principales causas de mortalidad en España, año 1999, ambos sexos.	2
1.2. Distribución proporcional de las principales causas de mortalidad en España, año 1999, mujeres y hombres.	2
1.3. Distribución proporcional de la mortalidad atribuida a enfermedades del aparato circulatorio, España, año 1999	3
1.4. Esquema-resumen de la función endotelial	12
1.5. Factores más importantes relacionados con la activación plaquetaria en la zona del daño endotelial	14
1.6. Esquema clásico de la cascada de la coagulación	15
1.7. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico	18
1.8. Factores seleccionados, implicados tanto en el crecimiento de la placa de ateroma como en su complicación trombótica.	22
1.9. Modelo estructural de la conformación de la molécula del PAI-1 en estado latente	23
1.10. Esquema del gen del PAI-1. Modulación de los niveles de PAI-1 por el polimorfismo 4G/5G.	25
1.11. Modelo estructural de la conformación de la molécula del TAFI en estado latente.	28
1.12. Activación del TAFI y su acción sobre la cascada de la fibrinólisis	29
1.13. Modulación de la activación del TAFI y de la proteína C	30
1.14. Dibujo esquemático de la molécula de Lp(a)	35
1.15. Esquema del proceso de activación de la proteína C	39
1.16. Esquema de las acciones fisiológicas de la APC	43

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. Esquema de la reacción inmunológica en la que se basa la cuantificación del PAI-1ag.	62
3.2. Esquema de la reacción enzimática que permite la cuantificación final del PAI-1ag.	62
3.3. Esquema del protocolo para la cuantificación del TAFIfc.	67
3. 4. Correlación entre el Rf de cada banda y el log de la masa molecular (kDa) de las apo(a).	73
3.5. Clasificación de isoformas de acuerdo con su movilidad electroforética.	74
3.6. Esquema del fundamento del método de cuantificación de la APC circulante.	76
3.7. Condiciones del programa para PCR de PAI-1	88
3.8. Genotipado del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, resultado de la electroforesis en gel de agarosa	89
3.9. Condiciones del programa para PCR de TAFI.	90
3.10. Genotipado del polimorfismo C1040T del gen del TAFI, resultado de la electroforesis en gel de agarosa	90
3.11. Esquema de la técnica para el genotipado del polimorfismo C1040T del gen del TAFI	91
3. 12. Curva patrón de los tres posibles genotipos del factor V para la detección del factor V Leiden	92

4. RESULTADOS

4. 1. Comparación entre pacientes y controles basada en la distribución de genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1.	104
4.2. Comparación basada en la presencia o ausencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1	104
4.3. Comparación entre pacientes y controles basada en la distribución de genotipos del polimorfismo C1040T del gen del TAFI.	110
4.4. Comparación basada en la presencia o ausencia del alelo T del polimorfismo C1040T del gen del TAFI.	110
4.5. Análisis del sistema fibrinolítico en pacientes y controles.	116
4.6. Comparación de prevalencias de isoformas de bajo peso molecular como isoforma mayoritaria de apo(a) entre pacientes y controles	117
4.7. Análisis comparativo de isoformas mayoritarias de apo(a) y niveles de Lp(a) entre pacientes y controles.	119
4.8. Niveles de APC en pacientes y controles	121
4.9. Representación de prevalencias del factor V Leiden en pacientes y controles	125
4.10. Representación de prevalencias de la mutación G20210A del gen de la protrombina entre pacientes y controles.	125
4.11. Genotipos del gen del PAI-1 en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada)	127
4.12. Comparación de niveles de PAI-1 en función de las coronariografías (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada)	128

4.13. Curva de supervivencia libre de eventos y PAI-1.	129
4.14. Genotipos del gen del TAFI en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada)	130
4.15. Comparación de niveles de TAFI en función de las coronariografías (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada)	131
4.16. Isoformas de apo(a) en función de la coronariografía	133
4.17. Niveles de Lp(a) en función de la coronariografía (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada)	134
4.18. Niveles de Lp(a) en función de la coronariografía (pacientes con estudio de niveles completo y decalaje con la coronariografía <6 meses)	135
4.19. Curva ROC para los niveles de Lp(a) (mg/dl) para cada uno de los patrones más desfavorables de la coronariografía (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada).	137
4.20. Curva de supervivencia libre de evento combinado y niveles de Lp(a)	139
4.21. Niveles de proteína C activada circulante en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada).	140
4.22. Niveles de proteína C activada circulante en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=111 pacientes con estudio de niveles completo y decalaje con la coronariografía <6 meses).	141
4.23. Presencia del factor V Leiden en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada)	142
4.24. Presencia de la mutación G20210A de la protrombina en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada)	143

4.25. Fibrinógeno y de proteína C reactiva en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada).	144
4.26. Curva de supervivencia libre de evento combinado y niveles de proteína C reactiva.	145

5. DISCUSIÓN

5.1. Efectos encadenados entre inflamación, coagulación, fibrinólisis y apoptosis. Papel central de unos niveles bajos de APC.	165
5. 2. Resultados positivos documentados en la presente tesis doctoral.	175

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

- | | |
|---|----|
| 1.1. Factores de riesgo en pacientes de 25-74 años ingresados por infarto de miocardio en Navarra, 1997-1998. Estudio IBERICA | 6 |
| 1.2. Principales factores de riesgo cardiovascular | 7 |
| 1.3. Algunas características de los principales reguladores del sistema fibrinolítico | 19 |
| 1.4. Resumen de los factores más importantes que determinan los niveles de PAI-1. | 26 |
| 1.5. Resumen de las acciones fisiológicas de la APC | 41 |

3. MATERIAL Y MÉTODOS

- | | |
|--|----|
| 3. 1. Definiciones de infarto de miocardio | 57 |
| 3. 2. Clasificación de isoformas de apo(a) de acuerdo con su movilidad electroforética | 74 |

4. RESULTADOS

- | | |
|---|-----|
| 4. 1. Características epidemiológicas y factores de riesgo cardiovascular en los grupos de pacientes y controles. | 98 |
| 4.2. Características clínicas de los pacientes. | 99 |
| 4.3. Detalles del ingreso por infarto agudo de miocardio referido al grupo de pacientes | 100 |
| 4.4. Eventos al final del seguimiento en el grupo de pacientes | 101 |

4.5. Análisis univariado de los eventos al final del seguimiento: asociación con los factores de riesgo y con determinadas variables clínicas en el grupo de pacientes	102
4.6. Comparación entre pacientes y controles basada en el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1.	105
4.7. Comparación de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc (analizadas como variables continuas) entre pacientes y controles	106
4.8. Resultados de la comparación de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc (analizadas como variables discretas) entre pacientes y controles..	108
4.9. Comparación de niveles de PAI-1 entre pacientes y controles basada en el genotipo y en la presencia/ausencia del alelo 4G del gen del PAI-1	109
4.10. Comparación entre pacientes y controles basada en el polimorfismo C1040T del gen del TAFI (variante Thr325Ile).	111
4.11. Comparación de los niveles de TAFI (analizadas como variables continuas) en pacientes y controles.	112
4.12. Comparación de los niveles de TAFIag y TAFIfc (analizadas como variables discretas) entre pacientes y controles	113
4.13. Comparación de niveles de TAFI entre pacientes y controles basada en el genotipo y en la presencia/ausencia del alelo T del polimorfismo C1040T del gen del TAFI.	115
4.14. Comparación de la prevalencia de la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular como isoforma mayoritaria en pacientes y controles	117
4.15. Comparación de niveles de Lp(a) (analizada como variable continua y dicotómica) entre pacientes y controles.	118
4.16. ORs conferidas por los niveles y las isoformas mayoritarias de apo(a), comparación entre pacientes y controles	120

4.17. Comparación de niveles de APC (como variable continua y como variable discreta) entre pacientes y controles	122
4.18. Defectos trombofílicos, pacientes y controles	123
4.19. Variables directa o indirectamente relacionadas con el sistema de la proteína C, comparación entre pacientes y controles	124
4.20. Lp(a) (como variable continua y como variable dicotómica) y patrones angiográficos desfavorables de enfermedad coronaria.	136
4.21. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el punto de Lp(a) de 30 mg/dl en relación a los patrones más desfavorables en la coronariografía.	138

5. DISCUSIÓN

5.1. Prevalencia de los factores de riesgo en pacientes jóvenes: población navarra del Registro IBERICA y esta tesis.	149
---	-----

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. CARDIOPATÍA ISQUÉMICA. IMPACTO SOCIOSANITARIO

La cardiopatía isquémica constituye una de las primeras causas de mortalidad en las sociedades desarrolladas del mundo actual. La morbilidad que genera y el impacto socioeconómico que ocasiona hacen que sea considerada un verdadero problema de salud.

Actualmente, el grupo de las enfermedades del aparato circulatorio es la primera causa de muerte en el conjunto de la población española. Al comenzar este trabajo de tesis doctoral, las estadísticas oficiales de 1999 confirmaron que la mortalidad debida a patologías del aparato circulatorio representaba el 36% de las defunciones, el 40% en mujeres y el 29% en hombres; en el desglose, el 31% de la mortalidad correspondió a la cardiopatía isquémica y el 29% a la enfermedad cerebrovascular (Figuras 1.1, 1.2 y 1.3) [1].

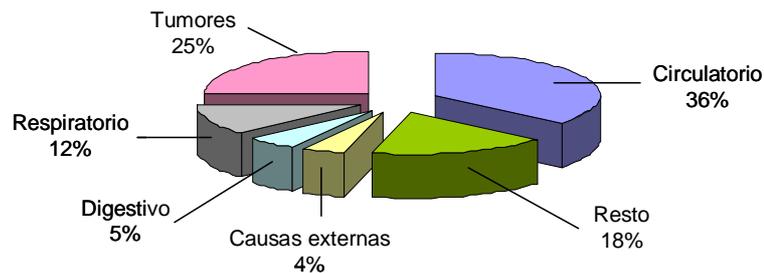


Figura 1.1. Distribución proporcional de las principales causas de mortalidad en España, año 1999, ambos sexos [1].

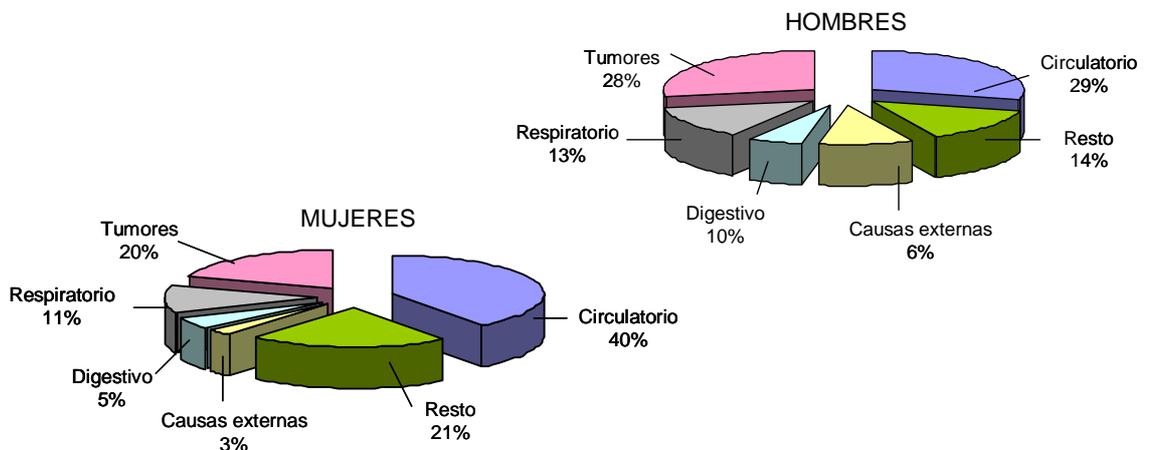


Figura 1.2. Distribución proporcional de las principales causas de mortalidad en España, año 1999, mujeres y hombres [1].

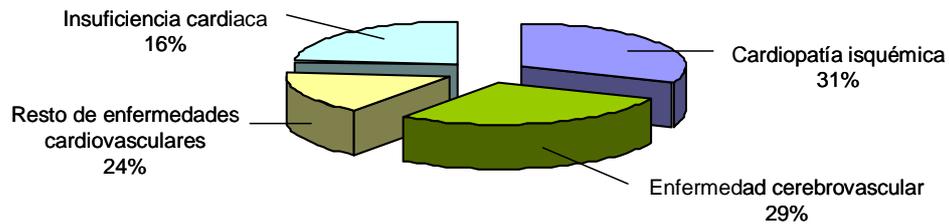


Figura 1.3. Distribución proporcional de la mortalidad atribuida a enfermedades del aparato circulatorio, España, año 1999 [1].

En 1998 las enfermedades cardiovasculares ocasionaron en España 232.977 años potenciales de vida perdidos (175.043 en varones y 57.934 en mujeres), que supusieron aproximadamente el 16% de los años potenciales de vida perdidos totales [2], como es lógico, con mucha mayor repercusión en el grupo de pacientes jóvenes.

Las tasas ajustadas de mortalidad por enfermedades del aparato circulatorio disminuyeron en España un 26% en el período 1985-1995, a un ritmo anual del 2,4% (2,3% en varones y 2,5% en mujeres). Aunque la mayor parte del descenso de la mortalidad cardiovascular total se debió a una disminución media anual del 3,2% en la mortalidad cerebrovascular, también se produjo una disminución de la mortalidad por cardiopatía isquémica del 0,6% anual (0,8% en varones y 0,2% en mujeres) [2]. El descenso de la letalidad por esta patología ha sido posible gracias los importantes avances en el tratamiento farmacológico conseguidos en la última década (inhibidores de la glicoproteína IIb/IIIa, clopidogrel, heparinas de bajo peso molecular, β -bloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, antagonistas del receptor de la angiotensina II, estatinas y espironolactona, fundamentalmente), el desarrollo de nuevas terapias de reperfusión (nuevos fármacos trombolíticos y angioplastia primaria y/o de rescate), el menor retraso en la administración de dichas terapias de reperfusión, el uso de desfibriladores autoimplantables, etc.

A pesar de las mejoras en la atención médica en España, la previsible evolución negativa en los próximos años de algunos factores de riesgo cardiovascular (como la hipercolesterolemia en la población infantil, el aumento de la prevalencia del tabaquismo en mujeres y algunos cambios dietéticos) podría provocar un incremento del riesgo de muerte cardiovascular [2].

Como se ha apuntado previamente, la investigación en el campo de la cardiopatía isquémica ha resultado en importantes avances en su manejo terapéutico. Los beneficios observados individualmente en la vida de cada paciente han supuesto una mejora en la esperanza y en la calidad de vida de este grupo poblacional, con su consiguiente impacto económico positivo en la sociedad al aumentar la productividad de la población.

1.2.- ETIOLOGÍA DE LA CARDIOPATÍA ISQUÉMICA

Al igual que en los pacientes con enfermedad cerebrovascular o vasculopatía arterial periférica, universalmente se acepta que la enfermedad arteriosclerótica (hoy en día sustituida por el término de *aterotrombosis*) subyace también en la mayoría de pacientes con cardiopatía isquémica. Sólo en un pequeño porcentaje de los casos la cardiopatía isquémica no tiene un origen aterotrombótico, como sucede en presencia de síndrome X coronario (con afectación de la microcirculación), vasoespasmo coronario, anomalías congénitas del origen o de la distribución de las arterias coronarias, disección coronaria, embolismo coronario y vasculitis coronaria asociada a enfermedades autoinmunes, entre otras [3, 4]. La dislipemia en sujetos portadores de un corazón trasplantado ha merecido un estudio especial, en particular, por los conocidos efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores [5-7] aunque, en general, se acepta que el mecanismo subyacente en la enfermedad vascular del injerto es la hiperplasia intimal, más que el fenómeno aterotrombótico propiamente dicho del corazón nativo [8].

Un factor de riesgo cardiovascular es una característica biológica o una conducta que aumenta la probabilidad de padecer o morir de enfermedad cardiovascular en aquellos individuos que la presentan [9]. Desde que el Estudio Framingham estableciera la importancia de los factores de riesgo cardiovascular mayores (tabaquismo, hipertensión arterial, dislipemia, diabetes mellitus y edad avanzada), múltiples observaciones han despertado el interés por entender mejor los mecanismos implicados en esta polifacética enfermedad. Se han investigado los mecanismos fisiopatológicos y anatomopatológicos de la aterotrombosis en sí misma, del fenómeno inflamatorio asociado y de las cascadas de la coagulación y la fibrinólisis que acompañan a la placa complicada y que se traducen clínicamente como síndrome coronario agudo. Diversos trabajos han demostrado que, en un grupo considerable de pacientes con infarto de miocardio, los factores de riesgo cardiovascular mayores no tienen suficiente relevancia como para justificar el desarrollo clínico de esta enfermedad. De hecho, entre un 50% y un 70% de los casos de cardiopatía isquémica crónica no se pueden justificar por la presencia de estos factores de riesgo [10]. El registro IBERICA (Tabla 1.1) mostró que, en la población joven (hasta 44 años) con infarto de miocardio, el 2% de los hombres y el 20% de las mujeres carecen de factores de riesgo cardiovascular, mientras que el 36% y 80% respectivamente son portadores

tan sólo de un factor de riesgo [11]. ¿Qué hace que estos pacientes con escasa o nula carga de factores de riesgo cardiovascular manifiesten eventos coronarios, mientras que un gran número de sujetos de la población general con semejantes características permanece asintomático desde el punto de vista coronario?.

HOMBRES

Edad (años)	25-34 (n=8)	35-44 (n=44)	45-54 (n=108)	55-64 (n=147)	65-74 (n=231)	Total (n=538)
Tabaquismo %	87,5	86,4	65,1	53,8	33,0	50,4
Hipercolesterolemia %	62,5	61,4	51,9	43,5	29,9	41,1
Hipertensión arterial %	12,5	29,5	35,2	29,5	42,4	35,9
Diabetes mellitus %	0,0	4,5	4,6	19,9	21,6	16,0
Número de factores de riesgo						
0 % (n)	12,5 (1)	0,0 (0)	13,2	14,6	22,9	16,6
1 % (n)	25,0 (2)	38,6 (17)	34,0	41,0	38,8	38,2
2 %	50,0	40,9	38,7	29,9	29,1	32,5
3 %	12,5	20,5	12,3	13,2	7,9	11,3
4 %	0,0	0,0	1,9	1,4	1,3	1,3
Angor previo %	12,5	32,6	34,9	41,8	48,3	42,0
IAM previo %	0,0	6,8	12,8	12,2	20,9	15,5

MUJERES

Edad (años)	25-34 (n=0)	35-44 (n=5)	45-54 (n=16)	55-64 (n=22)	65-74 (n=95)	Total (n=138)
Tabaquismo %	-	60,0	68,8	27,3	4,3	17,5
Hipercolesterolemia %	-	20,0	31,3	40,9	38,7	37,5
Hipertensión arterial %	-	0,0	56,3	59,1	66,0	61,3
Diabetes mellitus %	-	0,0	25,0	31,8	37,2	33,6
Número de factores de riesgo						
0 % (n)	-	20,0 (1)	6,3	13,6	14,0	13,2
1 % (n)	-	80,0 (4)	31,3	31,8	40,9	39,7
2 %	-	0,0	43,8	36,4	30,1	31,6
3 %	-	0,0	12,5	18,2	15,1	14,7
4 %	-	0,0	6,3	0,0	0,0	0,7
Angor previo %	-	60,0	31,3	50,0	43,6	43,8
IAM previo %	-	0,0	0,0	22,7	15,8	14,5

Tabla 1.1. Factores de riesgo en pacientes de 25-74 años ingresados por infarto de miocardio en Navarra, 1997-1998. Estudio IBERICA. El sombreado destaca las características de los sujetos más jóvenes (hasta 44 años). El óvalo destaca los datos de los pacientes con 0 y 1 factores de riesgo en cada subgrupo de edad. De su análisis se deduce que el 2% de los hombres y el 20% de las mujeres menores de 44 años carecen de factores de riesgo cardiovasculares clásicos y que el 36% de los hombres y el 80% de las mujeres tienen tan sólo un factor de riesgo. IAM: infarto agudo de miocardio (Modificado de Moreno C y col, 2002 [11]).

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular más prevalentes en la población española joven con infarto de miocardio, se acepta que el tabaquismo y la hipercolesterolemia tienen mucho más peso que la hipertensión arterial y la diabetes mellitus, con porcentajes en torno al 80% y al 40%, respectivamente, en estudios realizados en Alicante y Murcia [12, 13].

Estas reflexiones han llevado a diversos autores a distinguir otras categorías de factores de riesgo cardiovascular. Así, se han distinguido factores de riesgo causales (mayores independientes), predisponentes y condicionales (Tabla 1.2). Las dos primeras categorías se asocian con fuerza a la enfermedad y su papel causal ha sido comprobado con suficiente evidencia. Los factores de riesgo condicionales se asocian a un mayor riesgo de enfermedad pero, hasta la fecha, no hay evidencia definitiva acerca de su papel causal, ya sea porque su potencial aterogénico puede ser menor que el de los factores mayores, o porque su frecuencia en la población puede que no sea suficientemente elevada para medir su efecto independiente en estudios prospectivos de riesgo cardiovascular [14].

Factores de riesgo causales	Factores de riesgo predisponentes	Factores de riesgo condicionales
<ul style="list-style-type: none">• Tabaco• Presión arterial elevada• Colesterol y LDL-colesterol elevados• HDL-colesterol bajo• Diabetes mellitus• Edad avanzada	<ul style="list-style-type: none">• Obesidad*• Obesidad abdominal• Inactividad física*• Enfermedad coronaria prematura familiar• Características étnicas• Factores psicosociales	<ul style="list-style-type: none">• Triglicéridos séricos elevados• Partículas pequeñas de LDL• Homocisteína elevada• Lipoproteína (a) elevada• Factores de riesgo protrombóticos (p. ej. niveles aumentados de fibrinógeno) y/o hipofibrinolíticos (p. ej. niveles aumentados de PAI-1 y TAFI)• Marcadores de inflamación (p. ej. proteína C reactiva elevada)

Tabla 1.2. Principales factores de riesgo cardiovascular. *Estos factores también son denominados factores de riesgo causales o mayores por la Asociación Americana del Corazón. LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; APC: proteína C activada; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina. (Modificado de Grundy SM y col, 1999 [14]).

Las dos hipótesis clásicas sobre el origen de la aterotrombosis, la hipótesis de la incrustación de material trombótico y la de la imbibición de material lipídico, se han integrado en una hipótesis multifactorial de respuesta de la pared a la lesión o respuesta de reparación celular que, además de la trombosis o los lípidos, considera otros muchos factores causales (hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, agentes infeccioso-inflamatorios como la *Chlamydia pneumoniae* y el *Helicobacter pylori*, etc) [15]. De acuerdo con esta hipótesis, la coexistencia de uno o más factores de riesgo contribuye al desarrollo de lesión endotelial mínima y disfunción endotelial. Dicha anomalía endotelial, generalmente en zonas de estrés vascular, facilita la acumulación parietal de lipoproteínas de baja densidad sensibles a la oxidación mediada por células musculares lisas y por el propio endotelio [16]. La activación del factor nuclear $\kappa\beta$ es estimulada por las lipoproteínas de baja densidad oxidadas y potencia la expresión de moléculas intermediarias que aumentan la adhesión y la migración de los monocitos hacia el interior de la pared vascular. Una vez diferenciados a macrófagos en el espacio subendotelial, estas células captan lípidos de forma masiva y se transforman en células espumosas. Al romperse liberan sustancias muy tóxicas, como los radicales libres, que continúan el círculo vicioso de oxidación de LDL, daño celular y formación de núcleo lipídico. La lesión endotelial resultante favorece la exposición del colágeno subendotelial a la luz vascular, con el consiguiente aumento de la adhesión y la activación plaquetaria. La liberación de distintas citocinas, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y el factor de crecimiento tumoral β , juega un papel relevante en la progresión de la placa aterosclerótica. Por último, la proliferación de las células musculares lisas da cobertura al núcleo lipídico sintetizando proteínas que brindan resistencia a la placa ateromatosa tales como el colágeno, los proteoglicanos y la elastina [16].

El crecimiento de la placa a lo largo de los años tiende a disminuir progresivamente la luz efectiva y compromete cada vez más la reserva de flujo coronario del miocardio dependiente de dicha arteria [17]. Sin embargo, la progresión de las lesiones es errática e imprevisible [18] y los estudios angiográficos no pueden predecir el lugar en que aparecerán trombos coronarios oclusivos [19]. La progresión por fases de la arteriosclerosis coronaria es posible que suceda a expensas de los episodios clínicamente silentes de trombosis intraplaca o de pequeños trombos plaquetarios sobre las placas. En un momento dado, una placa vulnerable puede sufrir

una complicación con ruptura de la placa y activación secundaria de la hemostasia primaria y secundaria. La oclusión parcial o total del vaso condiciona la presentación clínica del síndrome coronario agudo (angina inestable, infarto sin onda Q, infarto con onda Q). Diversos estudios han demostrado que en un 80% de los casos el trombo se produce en una placa rica en lípidos, mientras que en un 20% el trombo puede producirse en una placa rica en colágeno [20]. El tipo de trombo intraluminal formado depende de varios factores, algunos locales (magnitud de la rotura, velocidad de perfusión de la sangre sobre la lesión) y otros sistémicos (potencial fibrinolítico y trombótico) [17]. Es precisamente en este campo, el de la coagulación y la fibrinólisis, donde se centra la presente tesis doctoral.

1.3.- NUEVOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La experiencia clínica diaria nos ha demostrado que los factores de riesgo cardiovascular mayores no son capaces de explicar totalmente las variaciones observadas en la prevalencia y gravedad de la cardiopatía isquémica. Este dato es especialmente relevante en pacientes jóvenes, donde un considerable porcentaje apenas tienen factores de riesgo cardiovascular (especialmente las mujeres) y, en cualquier caso, si los hay han tenido poco tiempo para ejercer un efecto deletéreo sobre la pared vascular (aplicable tanto a hombres y como a mujeres). La visión reduccionista de los factores de riesgo cardiovascular clásicos en el desarrollo de la enfermedad aterotrombótica es insuficiente hoy en día para identificar a los sujetos en riesgo y tomar las medidas oportunas en cada caso (prevención primaria), así como para tener bien controlados a los pacientes que ya han presentado síntomas (prevención secundaria). Actualmente se sigue investigando arduamente en múltiples frentes para intentar encontrar otros factores de riesgo cardiovascular que, aunque con menor peso que los clásicos, puedan modular el riesgo que aquellos suponen o potenciarse mutuamente.

La investigación experimental ha permitido conocer factores de ámbito sistémico que pueden llegar a tener un papel decisivo en romper el frágil equilibrio que desencadena las cascadas de la hemostasia primaria, la hemostasia secundaria y la fibrinólisis endógena sobre una placa vulnerable agredida. Desde hace tiempo se sabe que las modificaciones del sistema hemostático, debido tanto a hipercoagulabilidad como a hipofibrinólisis, pueden jugar un papel importante en la patogenia de la enfermedad coronaria [21].

Un aspecto inquietante de la cardiopatía isquémica es la alta frecuencia de afectación de la descendencia. Se sabe que los familiares de primer grado de un paciente afecto tienen un riesgo siete veces mayor que las personas sin antecedentes familiares [22, 23]. Incentivados por el reto de identificar las mutaciones y los genes específicos relacionados con este aumento de riesgo, se han estudiado aspectos genéticos de muchos factores de las cascadas de la coagulación y la fibrinólisis aunque, hasta la fecha, sin resultados lo suficientemente relevantes como para ser llevados del laboratorio experimental a la práctica clínica diaria.

1.4. ASPECTOS GENERALES: HEMOSTASIA Y FIBRINOLISIS

1.4.1. GENERALIDADES. HEMOSTASIA.

La hemostasia es el conjunto de mecanismos fisiológicos que detienen espontáneamente la salida de sangre desde el espacio vascular mediante el cambio de estado físico. El cambio de estado líquido a sólido de la sangre se logra por medio de la formación de un coágulo, a través de una serie de reacciones bioquímicas, fundamentalmente enzimáticas. La hemostasia cumple las funciones de sellar provisionalmente el sitio de rotura vascular y de iniciar los mecanismos de reparación, por lo que es un fenómeno transitorio en el tiempo, autolimitado en su formación y confinado en su ubicación a una región específica [24]. En 1956, el alemán Rudolf Virchow definió la tríada de Virchow, al establecer que los eventos trombóticos son el resultado de la interacción de tres elementos básicos: a) los fenómenos hemodinámicos derivados del flujo sanguíneo, b) la sangre y sus componentes, responsables de los fenómenos hemorreológicos y de la hipercoagulabilidad y c) los integrantes de la pared arterial que es donde se produce la lesión [25].

A continuación se mencionan las bases de los tres mecanismos básicos implicados en la hemostasia: el vascular, el plaquetario y el plasmático.

1.4.1.1. ENDOTELIO VASCULAR

Los vasos tienen tres capas: la íntima, formada por endotelio, la media, constituida por músculo liso y la externa o adventicia, formada por tejido de sostén. La capa muscular, más desarrollada en las arteriolas, tiene la función de regular el flujo en los diversos territorios. Al producirse daño vascular, esta capa se contrae, con lo que disminuye el calibre del vaso y limita el flujo hacia la zona lesionada. La contracción es estimulada por la histamina, la serotonina, quininas y tromboxanos, y es regulada por el óxido nítrico [26, 27].

Con mucho, el papel preponderante de los vasos radica en el endotelio, que tiene la capacidad de sintetizar factores protrombóticos y antitrombóticos, profibrinolíticos y antifibrinolíticos, así como factores de crecimiento y sustancias vasoactivas (Figura 1.4). En condiciones normales, el endotelio sano soporta el estrés

mecánico del flujo sanguíneo con un efecto neto antitrombótico. Así, la síntesis de óxido nítrico y de prostaciclina favorece la vasodilatación e inhibe la activación plaquetaria, a la vez que la expresión en la superficie endotelial de la trombosmodulina y del receptor endotelial de la proteína C (*Endothelial Protein C Receptor, EPCR*) aporta actividad anticoagulante [26, 28]. Asimismo, la disminución de la acción de las hormonas sexuales femeninas [29, 30] y el efecto deletéreo de algunas neurohormonas [31, 32] o el de los factores de riesgo cardiovascular interfiere con la función endotelial [33]. El endotelio disfuncionante favorece la migración de células y lípidos, la oxidación de las lipoproteínas, la proliferación de células musculares lisas, la expansión o la lisis de la matriz extracelular, la activación plaquetaria y la trombosis. Estos últimos mecanismos se ponen en marcha en el endotelio disfuncionante gracias a la capacidad de síntesis de sustancias procoagulantes (factores V y VIII) y antifibrinolíticas (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1, PAI-1*), así como por la acción sustancias proagregantes plaquetarias (tromboxano A₂ y factor de von Willebrand) [17, 34].

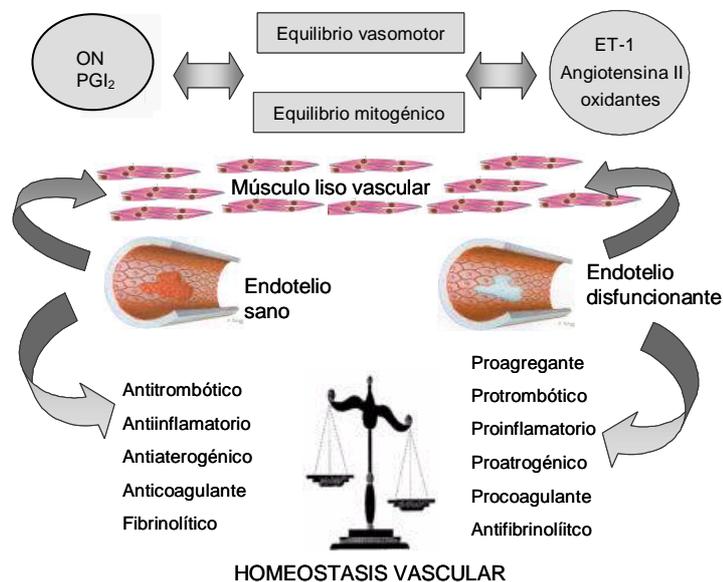


Figura 1.4. Esquema-resumen de la función endotelial. Véase explicación en el texto. ON: óxido nítrico; PGI₂: prostaciclina 2; ET-1: endotelina 1.

1.4.1.2. HEMOSTASIA PRIMARIA

Aunque está íntimamente relacionada con el mecanismo vascular de vasoconstricción y con la cascada de la coagulación, la hemostasia primaria hace referencia a la capacidad de las plaquetas para cohibir la hemorragia. A continuación se describen sucintamente los mecanismos implicados en la adhesión, la agregación y la activación plaquetaria [24].

Durante los primeros segundos tras el desarrollo de una lesión endotelial, las plaquetas se adhieren al colágeno subendotelial de esa zona, ahora expuesto al torrente circulatorio. Los mediadores principales de esta adhesión son el factor von Willebrand y el receptor plaquetario llamado glicoproteína Ib (Figura 1.5). La adhesión plaquetaria estimula la expresión de otro receptor de membrana, la glicoproteína IIb/IIIa, que es capaz de interactuar con el factor von Willebrand y desencadenar la agregación plaquetaria. Este proceso tiene lugar en los primeros 20-30 segundos tras la adhesión plaquetaria y desemboca en la formación de un coágulo [24, 35]. La unión del factor von Willebrand a la glicoproteína IIb/IIIa activa las vías del fosfatidil-inositol plaquetario y de las prostaglandinas y éstas, a su vez, desencadenan la liberación del contenido de los gránulos almacenados en el citoplasma plaquetario. Entre las sustancias liberadas desde los gránulos densos plaquetarios se encuentra el adenosín difosfato que, junto con la trombina generada por la cascada de la coagulación, pueden magnificar y consolidar la activación plaquetaria a través de la interacción con otros receptores específicos en las membranas de las plaquetas [36]. Es bien conocido el aumento de la agregación plaquetaria en diabéticos [37] y, entre otros, en la lista de sustancias proagregantes incluye a la lipoproteína (a) [Lp(a)], en particular a su subunidad llamada apolipoproteína (a) [apo(a)]. Así, la demostración *in vitro* de su efecto proagregante al interactuar con un receptor específico de la superficie plaquetaria explica parte de la acción protrombótica de la Lp(a) [38] (véase más adelante). En los siguientes minutos se genera fibrina y se forma una red entre plaquetas y fibrina en la que quedan atrapados eritrocitos y leucocitos. Posteriormente, la fibrina se estabiliza, el coágulo adquiere mayor resistencia y se vuelve insoluble. Finalmente, el coágulo sufre una retracción, con lo que queda adherido de manera firme a la pared vascular [35, 36]. Los coágulos formados en territorio arterial son fundamentalmente de plaquetas y se denominan trombos blancos; los que se forman en territorio venoso contienen mayor cantidad de fibrina y elementos formes, sobre todo eritrocitos, por lo que se denominan trombos rojos.

extrínseca, cuando el complejo factor VIIa:factor tisular activa a los factores IX y X en la superficie de las células que expresan el factor tisular, dando lugar a la formación de las primeras cantidades de trombina [40]. La vía intrínseca, también llamada de contacto, se activa cuando tres proteínas plasmáticas (el factor Hageman o factor XII, un cininógeno de alto peso molecular y la precalicreína) forman un complejo sobre el colágeno del subendotelio vascular. La finalidad de ambas vías es la activación del factor X, necesaria para la transformación de protrombina en trombina, para lo cual también se requiere la presencia de calcio, factor V y fosfolípidos [40]. Aunque la conversión de la protrombina puede tener lugar en diversas superficies ricas en fosfolípidos, tanto naturales como artificiales, se acelera varios miles de veces en la superficie de las plaquetas activadas. Tras la liberación de fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, la molécula modificada se denomina monómero de fibrina y cuando estos monómeros polimerizan dan lugar a la fibrina no estabilizada o soluble. Finalmente, la acción estabilizadora del factor XIIIa transforma la fibrina soluble en fibrina insoluble [24]. La Figura 1.6 muestra un esquema simplificado de la cascada de la coagulación.

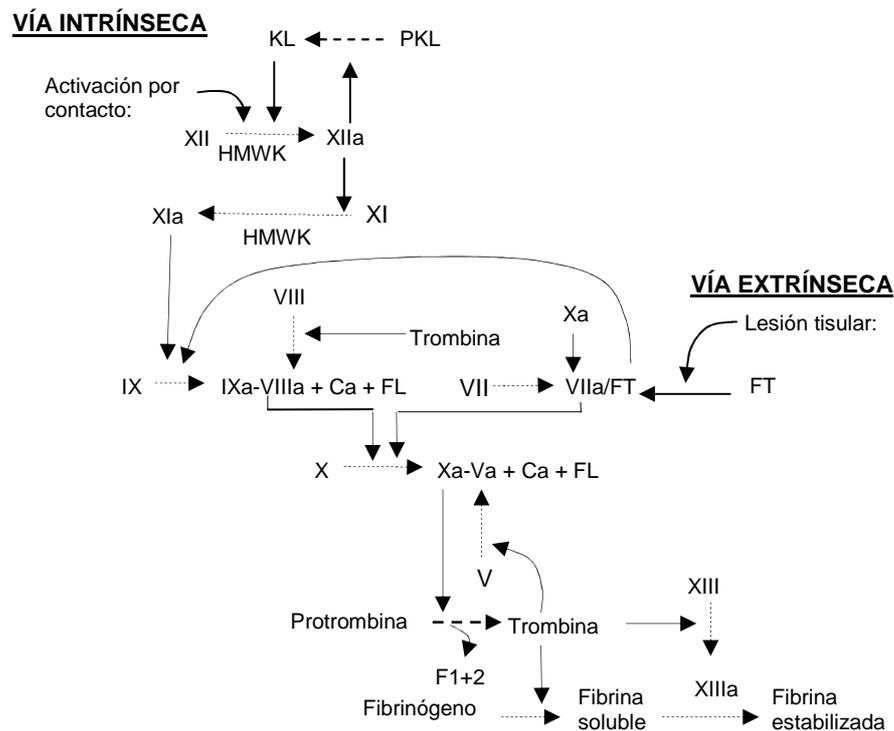


Figura 1.6. Esquema clásico de la cascada de la coagulación. Las flechas continuas indican activación a. Las flechas discontinuas indican transformación en. PKL: precalicreína; KL: calicreína; HMWK: cininógeno de alto peso molecular; FT: factor tisular; Ca: calcio; FL: fosfolípidos; F1+2: fragmento 1+2 de la protrombina.

En la parte final común de esta cascada se encuentra la activación de la protrombina a trombina. El fragmento 1+2 de la protrombina, liberado durante la activación de la protrombina, es un marcador útil para detectar un aumento o una disminución en la generación de trombina, en caso de encontrarse aumentado o disminuido, respectivamente. La trombina es una molécula con gran actividad enzimática sobre varios sustratos. Así, además de actuar sobre el fibrinógeno para generar fibrina, también activa los factores V, VIII y XIII, el sistema fibrinolítico y las plaquetas [40].

Este complicado entramado de factores se regula por los inhibidores naturales de la coagulación, como son la antitrombina, el inhibidor de la vía del factor tisular y el sistema de la proteína C. La antitrombina ejerce su acción al formar complejos estequiométricos 1:1 con la trombina a través de la interacción del residuo arginina del centro reactivo del inhibidor con la serina del centro activo del enzima. A través de mecanismos similares también puede inhibir a los factores XIIa, XIa, IXa, Xa y VIIa. El inhibidor de la vía del factor tisular, producido por el endotelio, se libera en la zona de lesión vascular, donde es capaz de inhibir al factor Xa y al factor VIIa [40]. Pero es precisamente el sistema de la proteína C, y la proteína C activada (*Activated Protein C*, APC) en particular, el nexo de unión más atractivo entre los sistemas de la coagulación, la fibrinólisis y la inflamación, tal y como se verá más adelante.

Algunos de los factores antes mencionados, como la antitrombina y el PAI-1, y otros que se comentarán a continuación, como la α_1 -antitripsina y el inhibidor de la proteína C activada (*Protein C Inhibitor*, PCI), entre otros, pertenecen al grupo de las serpinas (*serin protease inhibitor*). Los integrantes de esta superfamilia, caracterizada por inhibir a los enzimas tipo serina, tienen una alta homología estructural y un mecanismo de acción similar [41]. En las reacciones enzimáticas típicas el enzima ataca rápidamente al sustrato, lo transforma en producto y se libera para actuar sobre otra molécula de sustrato. Sin embargo, los inhibidores de la familia de las serpinas no inactivan enzimáticamente a sus sustratos (todos ellos con actividad enzimática), sino que actúan en realidad como falsos sustratos de los enzimas a los que inhiben [42]. Tras la unión al enzima, se forma un complejo de transición y, o bien conduce a la formación de un complejo covalente estable enzima:sustrato bloqueando el centro activo del enzima, o bien se disocia dando lugar al inhibidor inactivado y el enzima activo.

1.4.2. GENERALIDADES. FIBRINOLISIS

El término fibrinólisis fue introducido hace más de un siglo por Dastre para describir la disolución espontánea de coágulos sanguíneos [43]. A pesar del tiempo transcurrido desde entonces, podemos decir que esta definición de la fibrinólisis como “conjunto de mecanismos encargados de lisar el coágulo de fibrina una vez formado”, sigue siendo precisa. Pero la fibrinólisis también interviene en otros procesos fisiológicos y patológicos, como son la angiogénesis, la regeneración tisular, la reproducción, la endometriosis y la invasión tumoral [44-47].

El funcionamiento del sistema fibrinolítico tiene como base la conversión de un proenzima, el plasminógeno, en su enzima proteolíticamente activo, la plasmina, el cual es capaz de degradar la fibrina y, así, eliminar el coágulo previamente formado [48, 49] (Figura 1.7). La transformación del plasminógeno en plasmina se produce mediante la acción proteolítica de dos enzimas, denominados respectivamente activador tisular del plasminógeno (*tissue-type Plasminogen Activator*, tPA) y activador del plasminógeno tipo urokinasa (*urokinase-type Plasminogen Activator*, uPA).

Cuando la plasmina actúa sobre la fibrina genera productos de degradación de la fibrina con residuos de lisina en posición carboxiterminal. Estos residuos constituyen sitios de unión para el tPA y el plasminógeno y por ello son responsables de amplificar enormemente la cascada de la fibrinólisis. Como en cualquier proceso biológico regulado, a esta tendencia profibrinolítica se opone una actividad antifibrinolítica, de tal modo que sólo un adecuado equilibrio entre ambas fuerzas dará lugar a un correcto funcionamiento del sistema global [48].

La inhibición de la fibrinólisis se ejerce a varios niveles (Figura 1.7). Por una parte, están los inhibidores naturales de los activadores del plasminógeno. Estos inhibidores se denominan: PAI-1 o de tipo endotelial [50], e inhibidor de los activadores del plasminógeno tipo 2 o placentario (PAI-2). El primero se describirá más ampliamente en este mismo capítulo y del segundo interesa destacar que sólo se han detectado niveles plasmáticos significativos en mujeres gestantes y parece que podría ser un marcador de función placentaria [51-53]. Existe un tercer inhibidor de los activadores del plasminógeno denominado inicialmente PAI-3, aunque más tarde se

identificó como el principal inhibidor de la proteína C activada, el PCI [54, 55]. Dicho inhibidor es capaz de inhibir al uPA y al tPA de dos cadenas pero, aunque su concentración plasmática es superior a la de los otros PAIs, su actividad inhibitoria a nivel fibrinolítico es menor [56-58]. Como sus nombres indican, estos PAIs controlan la fibrinólisis inhibiendo la activación de plasminógeno a plasmina. Recientemente se ha descrito otro mecanismo que regula negativamente dicha activación, la vía del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (*Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor*, TAFI) [59]. Se sabe que los residuos de aminoácidos básicos (lisina y arginina) exhibidos en la superficie de la fibrina parcialmente degradada sirven de anclaje al plasminógeno y al tPA [59]. Cuando el plasminógeno y el tPA coinciden en la superficie del coágulo de fibrina tiene lugar la activación del plasminógeno en plasmina. Pues bien, precisamente a ese nivel, el TAFI una vez activado (TAFIa) es capaz de eliminar los residuos de lisina y arginina de la superficie de la fibrina, que impide la activación del plasminógeno en plasmina, y así, disminuye la cascada de la fibrinólisis [59].

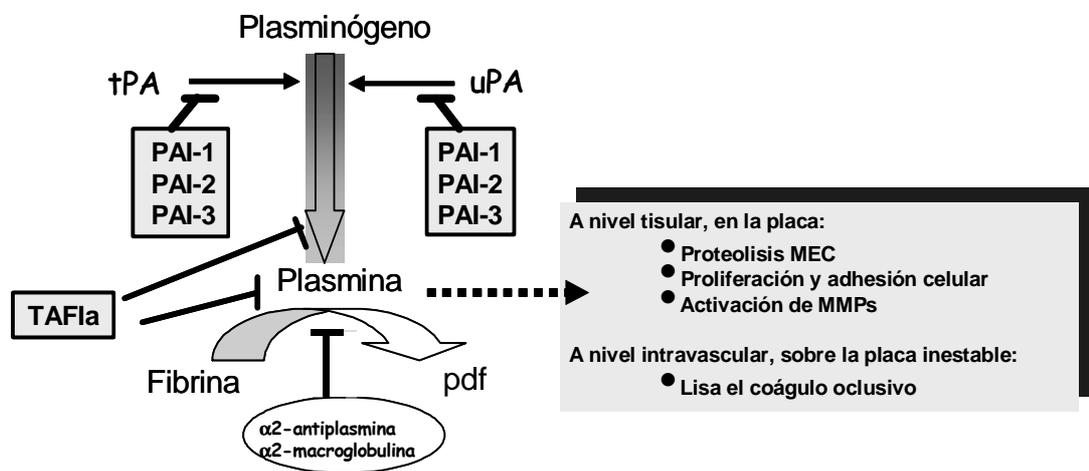


Figura 1.7. Esquema simplificado del funcionamiento del sistema fibrinolítico. tPA: activador tisular del plasminógeno; uPA activador del plasminógeno tipo urokinasa; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; pdf: productos de degradación de la fibrina; MEC: matriz extracelular.

La fibrinólisis también se regula una vez que el plasminógeno ha sido ya activado y transformado en plasmina (Figura 1.7). Así, la actividad proteolítica de la plasmina está regulada por la acción de la α_2 -antiplasmina, su principal inhibidor fisiológico y, en menor medida, por la α_2 -macroglobulina y el TAFIa.

A continuación, en la Tabla 1.3, se exponen las características de los principales factores implicados en el sistema de la fibrinólisis.

	AA	Masa molecular (kDa)	Conc (mg/l)	Vida media	Función principal
Plasminógeno	791	90	200	50 horas	proenzima
Plasmina	715	85	2		D: fibrinógeno, fibrina y TAFI A: TAFI I: TAFIa
tPA	527	68	0.01	2-3 minutos	A: plasminógeno
scu-PA	411	54	0.008	3-5 minutos	A: plasminógeno
PAI-1	379	52	0.01	5-7 minutos	I: tPA, uPA
PAI-2	393	70	<0.005		I: tPA, uPA
α_2 -antiplasmina	452	70	70	50 horas	I: plasmina
α_2 -macroglobulina	4 x 1451	725	2000	50 horas	I: plasmina (inespecífico)
TAFIa	309	35	4-15	9-15 minutos	Impide la activación del plasminógeno I: plasmina

Tabla 1.3. Algunas características de los principales reguladores del sistema fibrinolítico. D: degrada a; A: activa a; I: inhibe a; tPA: activador tisular del plasminógeno; scu-PA: activador del plasminógeno tipo urokinasa de una cadena; PAI: inhibidor del activador del plasminógeno; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; AA: aminoácidos; Conc: concentración plasmática normal. (Modificado de Dobrovolsky AB y col, 2001 [60]).

Estos son, básicamente, los factores implicados en la fibrinólisis de modo que una correcta hemostasia depende del balance de fuerzas entre todas estas tendencias opuestas. Por otra parte, el equilibrio entre ellas se encuentra íntimamente relacionado con la hemostasia primaria (dependiente de las plaquetas) y con la hemostasia secundaria (dependiente de la coagulación). Por último, interesa resaltar que no se trata de un equilibrio estático, sino tremendamente dinámico y adaptable a diferentes situaciones fisiológicas.

Además de los inhibidores de la fibrinólisis comentados arriba, existen otras moléculas que modulan la actividad fibrinolítica tanto a nivel tisular (proteasa nexina I) como a nivel intravascular sobre la superficie endotelial (anexina 2). La proteasa nexina I es liberada en la matriz extracelular por los fibroblastos, donde inhibe la acción de la plasmina y de los activadores del plasminógeno [61]. Por ello, se le reconoce un efecto hipofibrinolítico que contribuye a dar estabilidad a la placa de ateroma. Por el contrario, la anexina 2 es un receptor situado en la membrana endotelial que pertenece a la superfamilia de las proteínas calcio-dependientes con capacidad para unir fosfolípidos. Su actividad fundamental es la de incrementar hasta 60 veces la activación del plasminógeno dependiente de tPA, efecto que se suprime cuando se eliminan los residuos de lisina de la superficie de la fibrina parcialmente degradada [62]. Tanto la Lp(a) como el TAFI disminuyen la acción de la anexina 2 inhibiendo, por tanto, la fibrinólisis. La primera, porque compite *in vitro* con el plasminógeno para unirse a la anexina 2 [63] y, el segundo, porque es capaz de eliminar los residuos de lisina de la superficie de la fibrina, sitio de anclaje de la anexina 2.

1. 4. 3. FACTORES SELECCIONADOS

De los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis, se eligieron aquellos factores que constituyen fisiopatológicamente nexos de unión entre ambos sistemas o con otros mecanismos implicados en el desarrollo de la aterotrombosis y en la generación de síndromes coronarios agudos, como es, por ejemplo, el fenómeno inflamatorio (Figura 1.8). En ningún caso se pretendió abarcar la totalidad de los factores potencialmente implicados en esta enfermedad coronaria. Así pues, se seleccionó:

- el PAI-1, por ser el más importante inhibidor de la fibrinólisis *in vivo*, relacionado con la hipertrigliceridemia y con otros factores de riesgo cardiovascular clásicos, tales como la hipertensión arterial y el metabolismo glucémico (síndrome metabólico).
- el TAFI, como nexo entre coagulación, fibrinólisis e inflamación, en virtud de las estrechas interrelaciones que mantiene con la trombina, la trombomodulina y el sistema de la proteína C (en particular, el PCI).
- la Lp(a), por tratarse de una lipoproteína de baja densidad con acción proaterogénica, proagregante e hipofibrinolítica.
- el sistema de la proteína C, una de las vías anticoagulantes más importantes *in vivo*. La APC circulante relaciona las cascadas de la coagulación, la fibrinólisis y la inflamación.
- el factor V Leiden y la mutación G20210A del gen de la protrombina, por favorecer ambos la trombosis e, indirectamente, una reducir el potencial fibrinolítico (mecanismo recientemente descrito, vía TAFI).

Con el fin de completar el estudio bioquímico, incluimos otras variables, como son la proteína C reactiva ultrasensible, el fibrinógeno y una analítica básica con perfil lipídico, hemograma y coagulación.

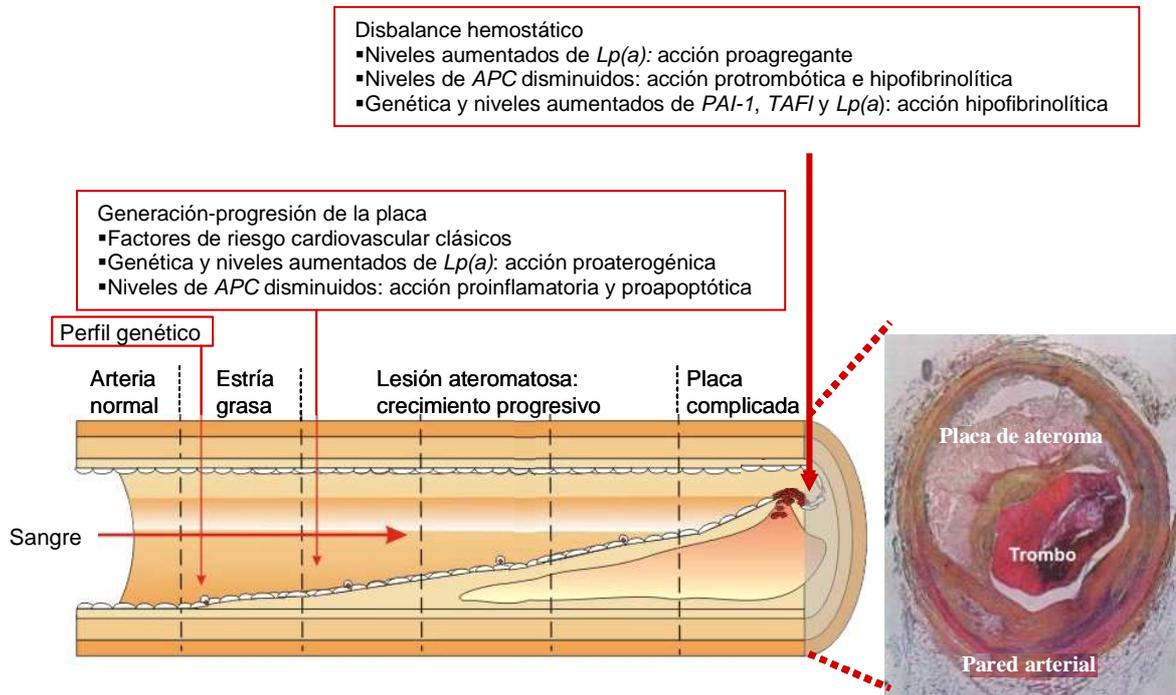


Figura 1.8. Factores seleccionados, implicados tanto en el crecimiento de la placa de ateroma como en su complicación trombótica. La presente tesis se centrará, especialmente, en los factores en cursiva. Algunas características genéticas (no modificables) de los mismos podrían mediar en su papel como factores o marcadores de riesgo; para la *Lp(a)* sus isoformas de *BPM*, para la *APC* diferentes polimorfismos de los genes de las proteínas integrantes del sistema, para el *PAI-1* el polimorfismo *4G/5G* de su gen y para el *TAFI* el polimorfismo *C1040T* (variante *Thr325Ile*) de su gen. *Lp(a)*: lipoproteína (a); *BPM*: bajo peso molecular; *APC*: proteína C activada; *PAI-1*: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; *TAFI*: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina. (Modificado de www.fundacionfavaloro.org/aterosclerosis.htm).

1.5. FACTORES DEL SISTEMA FIBRINOLÍTICO

A continuación se describen las características más relevantes de los distintos factores estudiados dentro del sistema de la fibrinólisis.

1.5.1. INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1

El PAI-1 se considera el principal regulador de la fibrinólisis *in vivo* [50, 64], papel que desempeña al inhibir la activación del plasminógeno a plasmina.

La estructura del PAI-1 humano ha sido ampliamente estudiada. Se trata de una glicoproteína de cadena única y 54 kDa de masa molecular que pertenece a las *serpinas*, superfamilia de inhibidores de serin-proteasas (Figura 1.9). Aunque se desconoce cuál es la principal fuente de producción de PAI-1, se ha comprobado que las células endoteliales, las células musculares lisas, las plaquetas, los hepatocitos, los fibroblastos y los adipocitos pueden producir PAI-1 [64, 65]. La sangre contiene dos grandes reservorios de PAI-1: las plaquetas y el plasma [66, 67]. Las plaquetas constituyen la principal reserva de PAI-1 ya que, del total del PAI-1 intravascular, el 90% se almacena en su interior (100-200 ng/ml de sangre), mientras tan sólo el 10% se localiza en el plasma circulante (alrededor de 10-20 ng/ml) [52].

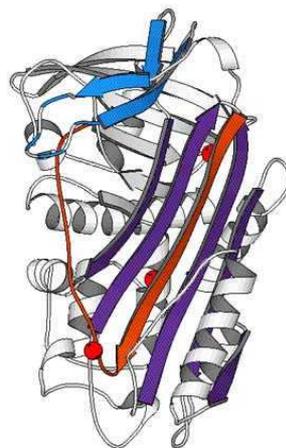


Figura 1.9. Modelo estructural de la conformación de la molécula del PAI-1 en estado latente. Las flechas indican regiones de β -hoja mientras que las espirales indican dominios de α -hélice (Modificado de Tucker HM y col, 1995 [68]).

Con frecuencia se han observado niveles anormalmente elevados de PAI-1 en condiciones de riesgo trombótico aumentado, en particular en pacientes con trombosis venosa profunda [69], durante la gestación [70-73] y en presencia de ciertas complicaciones obstétricas, como la preeclampsia [74-78].

En patología arterial, un estudio prospectivo amplio mostró una fuerte relación entre una hipofunción fibrinolítica y la incidencia posterior de cardiopatía isquémica en hombres jóvenes de raza blanca [79]. En cuanto a los estudios concretos centrados en el PAI-1 y la cardiopatía isquémica, cabe distinguir entre los que se han centrado en el estudio de la placa de ateroma y los que han analizado el papel del PAI-1 circulante. Respecto al primer apartado, se ha observado un efecto doble, ya que parece que el PAI-1 estimula el crecimiento de la placa y la estabiliza. Así, un incremento en la expresión de PAI-1 en los macrófagos y células musculares lisas locales aumenta la deposición de fibrina y la migración de células musculares lisas, fenómenos subyacentes en el crecimiento de la placa [80-82]. Por otro lado, el efecto neto estabilizador de la placa, argumentado por algunos autores, se basa en la reducción de la activación de las metaloproteasas de la matriz secundaria a la disminución de la actividad plasmínica por PAI-1 [80]. Sin embargo, si esa placa de ateroma llegara a complicarse y romperse por mediación de otros factores, el PAI-1 acumulado se liberaría y promovería la trombosis sobre su superficie, dando lugar a un síndrome coronario agudo. Con relación a los niveles plasmáticos de PAI-1, muchos estudios de casos y controles han demostrado la presencia de una capacidad fibrinolítica endógena reducida, manifestada con niveles elevados de PAI-1 en pacientes con cardiopatía isquémica crónica documentada [71, 83-88]. Dado que los niveles elevados de PAI-1 cuantificados en la fase aguda de un infarto de miocardio se mantienen altos en los siguientes meses e incluso años, en general no se acepta que dicho comportamiento sea similar al de los reactantes de fase aguda [89]. Se ha sugerido que la concentración de PAI-1 tiene un peso pronóstico importante a la luz de los resultados de diferentes trabajos. En algunos de ellos, el PAI-1 se consideró un factor predictor de un primer infarto en población sueca [90], un factor de riesgo para el desarrollo de reinfarto en sujetos jóvenes [91], predictor independiente de muerte e infarto no fatal en hombres con angina de pecho [92], predictor de mortalidad en pacientes no diabéticos con infarto de miocardio precoz [93], predictor de eventos trombóticos en general [94, 95] y marcador de riesgo para desarrollar reestenosis tras una revascularización coronaria percutánea [96] o quirúrgica [97].

La relación causa-efecto entre un nivel elevado de PAI-1 y el desarrollo de infarto de miocardio ha sido cuestionada por otros estudios. Argumentan que el PAI-1 podría ser exclusivamente un marcador de enfermedad aterotrombótica (aumento de expresión de PAI-1 por un endotelio previamente dañado) y, por otro lado, sostienen que la presencia de otros conocidos factores de riesgo cardiovascular, como hipertrigliceridemia aislada o en el contexto de obesidad y resistencia insulínica, podrían actuar como factores de confusión, al estar relacionados tanto con concentraciones elevadas de PAI-1 como con el desarrollo de cardiopatía isquémica [98, 99]. A pesar de estas consideraciones, hay evidencia experimental que sugiere que las asociaciones epidemiológicas previamente comentadas conllevan un papel de causalidad. Así, una línea de ratones transgénicos que sobreexpresaban PAI-1 (consecuencia de la manipulación de un único gen) presentó trombosis macrovascular coronaria espontánea clínicamente manifestada como infarto de miocardio [100].

El gen del PAI-1 se encuentra en el cromosoma 7q21. Ampliamente se acepta que determinados factores ambientales modulan la su transcripción (Tabla 1.4), por una parte, y que el polimorfismo 4G/5G, localizado en su región promotora, se correlaciona con los niveles plasmáticos de PAI-1 [101] (Figura 1.10). El alelo 4G tiene una secuencia de cuatro guaninas y permite la unión de una proteína activadora de su transcripción perteneciente a la familia de los factores nucleares $\kappa\beta$. Sin embargo, el alelo 5G contiene cinco guaninas que constituyen un lugar adicional de unión a una proteína represora. En muchos estudios se ha 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 poseen niveles intermedios.

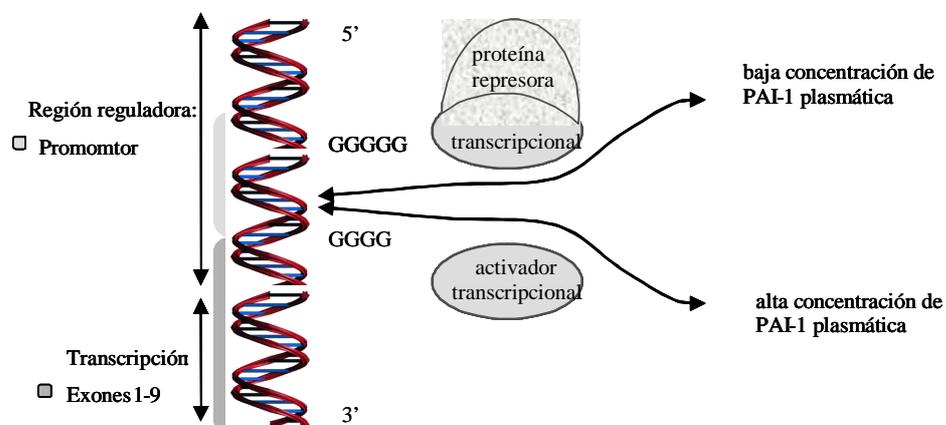


Figura 1.10. Esquema del gen del PAI-1. Modulación de los niveles de PAI-1 por el polimorfismo 4G/5G. Véase texto. (Modificado de Kohler HP y col, 2000 [86]).

Factores de la coagulación y de la fibrinólisis relacionados con la cardiopatía isquémica precoz.
Introducción

Factor	Niveles de PAI-1	Interacción con 4G/5G	Mecanismo de acción
Polimorfismo 4G/5G	Aumentados con alelo 4G	-----	El alelo 5G tiene una guanina de más, que atenúa la transcripción del gen
Obesidad central	Aumentados	Sin evidencia consistente	Aumento de producción y secreción de PAI-1 por los adipocitos y por el hígado (en respuesta a las citocinas secretadas previamente por los adipocitos)
Lípidos en plasma	Aumentados	Interacción triglicéridos-4G	VLDL-col aumenta la transcripción y la estabilidad del ARNm de PAI-1
Insulin-resistencia	Aumentados	Sin evidencia	La (pro)-insulina estimula la transcripción de PAI-1. Probablemente también por efecto directo de la glucosa
SRAA	Aumentados	Datos muy limitados	La angiotensina II estimula la producción de PAI-1
Hormonas sexuales	Asociación negativa con Eg. Sin evidencia con Pg.	Sólo datos limitados	Los Eg disminuyen la síntesis de PAI-1 o bien aumentan su eliminación
Alcohol	Aumentados	Sin datos	Desconocido
Actividad física	Disminuidos	Datos limitados	Por aumento de la eliminación o por mejoría en el IMC y trigliceridemia
Ritmo circadiano	Pico significativo de madrugada	Efecto más pronunciado en presencia de 4G	Mediado por CLIF, cuyo sitio de unión se solapa con el polimorfismo 4G/5G
Reactantes fase aguda	Aumentados	Efecto más pronunciado en presencia de 4G	Las citocinas proinflamatorias estimulan la transcripción de PAI-1

Tabla 1.4. Resumen de los factores más importantes que determinan los niveles de PAI-1. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1; ARNm: ácido ribonucleico mensajero; SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona; Eg: estrógenos; Pg: progestágenos; IMC: índice de masa corporal; CLIF: cycle-like factor. (Modificado de Hoekstra T y col, 2004 [102]).

El polimorfismo 4G/5G en la región promotora del gen del PAI-1 ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con la cardiopatía isquémica. Las críticas consideraciones mencionadas previamente en cuanto a la relación causa-efecto entre los niveles de PAI-1 y el desarrollo de cardiopatía isquémica no son aplicables a la implicación del alelo 4G en esta enfermedad. Por ello, en caso de encontrar una asociación significativa entre ellos (siempre ajustado para los factores de riesgo mayores), su carácter hereditario y no modificable permitiría establecer un vínculo de causalidad entre la presencia del alelo 4G y el desarrollo, la extensión o la recurrencia de eventos en la cardiopatía isquémica. Los resultados encontrados en la literatura a este respecto no son congruentes. Así, para algunos autores, los portadores del alelo 4G tienen un riesgo aumentado de presentar cardiopatía isquémica [101, 103-105], mientras que para otros no hay evidencia suficiente para establecer tal asociación [98, 106]. El mecanismo por el cual el genotipo 4G/4G eleva el riesgo cardiovascular ha sido estudiado desde hace tiempo y podría estar relacionado con mayores niveles de PAI-1 en presencia del alelo 4G [101, 107, 108] y/o con la modulación al alza en sus niveles ejercida por los integrantes del síndrome de resistencia insulínica [86] y la angiotensina II [109, 110] sobre la transcripción del gen del PAI-1 (Tabla 1.4). Es más, recientemente se ha comprobado que modificaciones farmacológicas encaminadas a tratar estos factores (metformina y ARA II, respectivamente) son capaces de disminuir los niveles de PAI-1, especialmente en presencia del alelo 4G [109, 111-113].

Aunque el estudio ARIC correlacionó los niveles de PAI-1 con el grosor de la arteria carótida [114], hasta la fecha no se ha encontrado evidencia consistente que relacione los niveles de PAI-1 con la extensión de la afectación coronaria [115] y tan sólo en un estudio de 2565 sujetos sometidos a coronariografía diagnóstica se encontró una asociación significativa entre el genotipo 4G/5G y el patrón angiográfico (presencia y severidad de las lesiones) [103].

1.5.2. INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA

En 1995 se purificó y caracterizó un nuevo inhibidor de la fibrinólisis [59]. Se trata de una proteína de la familia de las *carboxipeptidasas* que está involucrada en la regulación del balance entre coagulación y fibrinólisis. Aunque se ha denominado de muchas maneras (procarboxipeptidasa U, procarboxipeptidasa R y procarboxipeptidasa plasmática B), finalmente ha recibido el nombre de inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI).

Esta molécula (Figura 1.11) se sintetiza en el hígado, aunque se cree que las plaquetas también pueden secretarla desde sus α -gránulos al torrente sanguíneo bajo determinadas circunstancias de estimulación protegiendo, de esta manera, al coágulo incipiente de su degradación [116]. El TAFI circula en forma de procarboxipeptidasa de 401 aminoácidos y 55 kDa, a diferencia de la otra carboxipeptidasa plasmática, la carboxipeptidasa N, que también se sintetiza en el hígado pero se libera a la circulación en su forma biológicamente activa. Cuando el TAFI se transforma en TAFI activado (TAFIa, dominio catalítico Ala⁹³-Val⁴⁰¹: 309 aminoácidos y 35 kDa) durante la coagulación, se libera el llamado péptido de activación (Phe¹-Arg⁹²: 92 aminoácidos y 20 kDa) [117]. El TAFIa tiene una vida media de 9 a 15 minutos a 37°C [118, 119]. Aunque no se ha registrado la existencia de un inhibidor endógeno del TAFI, Klement P y col aislaron un inhibidor específico derivado de la patata, conocido como *Potato Tuber Carboxipeptidase Inhibitor* (PTCI) [120, 121].

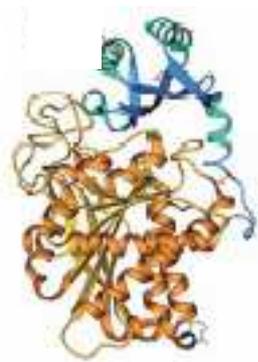


Figura 1.11. Modelo estructural de la conformación de la molécula del TAFI en estado latente. Los dominios del proenzima se muestran en azul y los del enzima en amarillo. Las distintas tonalidades representan la estructura α - o β -hélice. (Tomado de Barbosa Pereira PJ y col, 2002 [122]).

La plasmina ejerce un doble papel en la regulación de la actividad del TAFI. Aunque se ha descrito que si escinde al TAFI en la posición Arg⁹² lo convierte en TAFIa [116, 117], prevalece el efecto opuesto ya que, al actuar sobre las posiciones Arg³⁰², Lys³²⁷ y Arg³³⁰, se originan varios péptidos inactivos que además son incapaces de ser activados posteriormente [117]. El TAFIa puede ser inhibido por quelantes del zinc como el EDTA y el ácido ϵ -aminocaproico, entre otros [116].

Para entender el mecanismo de acción del TAFI, recordaremos brevemente que la cascada de la fibrinólisis se desencadena cuando el plasminógeno y el tPA se fijan en la superficie de la fibrina parcialmente degradada, concretamente sobre residuos de aminoácidos básicos (arginina o lisina). Pues bien, tal y como se ha comentado en apartados previos, el TAFIa elimina precisamente esos residuos de lisina o arginina de la superficie de la fibrina gracias a su actividad carboxipeptidasa B. De esta manera evita el anclaje del plasminógeno y del tPA a la fibrina y, en definitiva, la transformación del plasminógeno en plasmina. Además, el TAFIa en grandes concentraciones puede incluso inhibir directamente a la plasmina (Figura 1.12) [123].

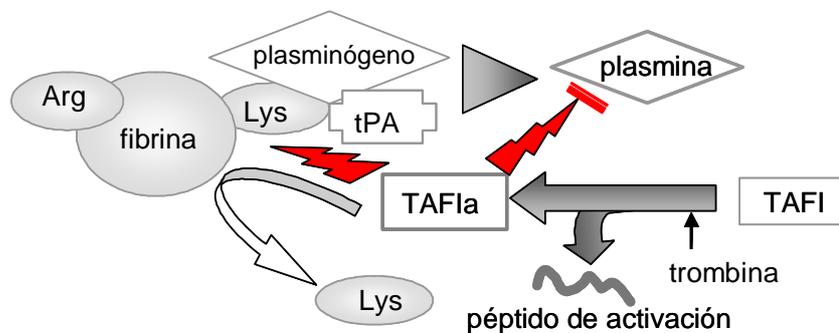


Figura 1.12. Activación del TAFI y su acción sobre la cascada de la fibrinólisis. Esquema simplificado, explicación en el texto. En rojo, se muestran los mecanismos por los que el TAFIa produce hipofibrinólisis. TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina; TAFIa: TAFI activado; Lys: lisina; Arg: arginina; tPA: activador tisular del plasminógeno.

La activación del TAFI por la trombina es un proceso ineficaz y depende de la cantidad de trombina generada durante la formación del coágulo. Por lo tanto, todos los factores capaces de modificar la generación de trombina modularán en mayor o menor grado la transformación de TAFI en TAFIa. El lento proceso de activación del TAFI puede potenciarse drásticamente (x1250 veces) en presencia de niveles bajos de trombomodulina (Figura 1.13) [116, 124].

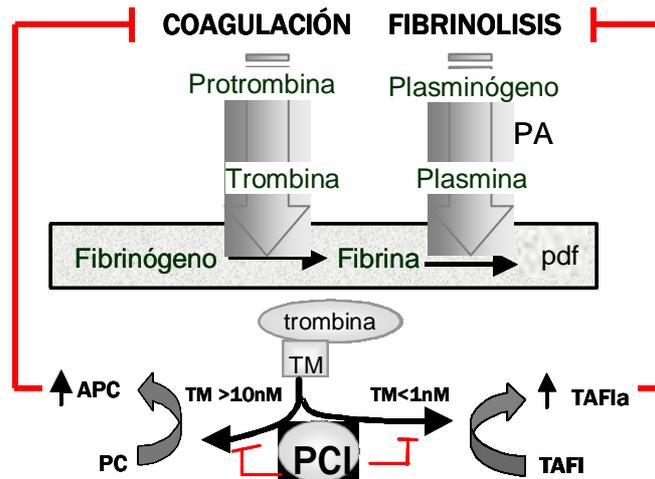


Figura 1.13. Modulación de la activación del TAFI y de la proteína C. Explicación en el texto. En rojo, inhibición. TM: trombomodulina; PC: Proteína C; APC: proteína C activada; PCI: inhibidor de la proteína C; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado; tPA: activador tisular del plasminógeno; pdf: productos de degradación de la fibrina (Modificado de Bajzar B, 2000 [124]).

La trombomodulina es una glicoproteína expresada en la membrana de la célula endotelial a la que la trombina circulante puede unirse en proporción 1:1 (trombina:trombomodulina). En esas condiciones bloquea la actividad procoagulante de la trombina, de forma que ya no es capaz de activar al fibrinógeno, a los cofactores V y VIII, al factor XIII y a las plaquetas. Por el contrario, la unión a la trombomodulina aumenta la afinidad de la trombina por la proteína C y acelera extraordinariamente su activación a APC, un potente anticoagulante. La activación del TAFI por trombina puede ser regulada al alza o a la baja en diferentes zonas del organismo, en función de las concentraciones locales de trombomodulina y de PCI. Se ha descrito el papel dual de la trombomodulina en la activación del TAFI y la modulación de ambas acciones por el PCI. A concentraciones bajas de trombomodulina (<1 nM) y en presencia de calcio se favorece la activación del TAFI

mediada por el complejo trombina:trombomodulina y ello conlleva una reducción de la actividad fibrinolítica. Sin embargo, a concentraciones altas de trombomodulina (>10 nM) el complejo trombina:trombomodulina tiene un efecto opuesto. En estas circunstancias predomina su efecto positivo en la activación de la proteína C a APC, la cual inhibe la formación de trombina y, consecuentemente, la cascada de la coagulación. Ambas acciones son inhibidas por el PCI, afectando a una vía o a otra también en función de la concentración de trombomodulina (Figura 1.13) [125].

El TAFI se ha estudiado, no sólo desde el punto de vista de sus niveles (niveles de TAFI antigénico, TAFIag y niveles de TAFI funcional, TAFIfc), sino también desde el punto de vista genético (polimorfismos). El gen del TAFI se ha localizado en el cromosoma 13q14 y consta de 11 exones [126]. Algunos polimorfismos localizados en la región promotora del gen del TAFI [127, 128] y un polimorfismo localizado en la región codificante del gen (C1040T) se han relacionado directamente con los niveles plasmáticos de TAFIag. En este último polimorfismo, el genotipo normal (no mutado) es el CC, pero en la forma mutada uno o dos alelos C son sustituidos por alelos T (genotipos CT o TT). Estos cambios dan como resultado la sustitución de una treonina (Thr) en la posición 325 de la variante no mutada por un residuo de isoleucina (Ile) en la proteína mutada, de forma que los genotipos CC, CT y TT codifican las variantes Thr/Thr, Thr/Ile e Ile/Ile. La variante homocigota Ile/Ile aumenta la vida media del TAFI (15 minutos a 37°C) en comparación con los otros dos fenotipos (8 minutos), efecto que se cree debido a que la forma Ile/Ile del TAFI es menos susceptible a la degradación habitual por plasmina que, en condiciones normales, contribuye a su inactivación [117]. La mayor vida media podría justificar el aumento de los niveles de TAFIfc observados en presencia de la variante Ile/Ile (hasta un 60% mayor) [129, 130]. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado un argumento definitivo para explicar los niveles reducidos de TAFIag en presencia de la variante Ile/Ile, si se debe a un defecto técnico (tal y como se explica más adelante) o a una verdadera reducción de los niveles de TAFIag (por una menor transcripción o traducción del ARNm ya transcrito).

Mientras que los niveles plasmáticos del PAI-1 están influenciados principalmente por factores medioambientales, los niveles de TAFIag están casi completamente determinados genéticamente [127, 128, 131], suelen oscilar entre 4 y 15 µg/ml, gozan de bastante estabilidad en cada sujeto [132] y parece que aumentan en la menopausia [59].

Algunos autores han apuntado que la vía del TAFI y los mecanismos inflamatorios están íntimamente relacionados. Por un lado, Myles T y col demostraron que el TAFIa exhibía actividad antiinflamatoria en ratones a través de la inactivación de moléculas proinflamatorias, tales como la bradicinina, el factor C5a del complemento y la osteopontina [133]. Este efecto beneficioso, trasladado al ámbito de la cardiopatía isquémica, se vería contrarrestado por otra observación de Wang W y col, quienes demostraron un aumento de la actividad antifibrinolítica mediada por el TAFI en el contexto de procesos inflamatorios, efecto deletéreo desde el punto de vista coronario [134]. Esta afirmación se basa en el hecho de que el residuo Thr388 de la molécula de trombomodulina es muy sensible a la oxidación en presencia de células inflamatorias *in vitro*. La oxidación de este residuo reduce un 90% la efectividad con la que la trombomodulina es capaz de mediar la activación de la proteína C a APC y, sin embargo, no afecta a la efectividad con la que activa al TAFI, disminuyendo la actividad fibrinolítica total [134]. A la luz de estos hallazgos, se ha especulado que éste podría ser uno de los mecanismos por los que un ambiente inflamatorio rompe el equilibrio entre el depósito y la degradación de la fibrina a favor de la trombosis [135]. Este nexo de unión entre la inflamación, la trombomodulina y el TAFI explicaría la correlación positiva entre los niveles de TAFI_{fc} y la proteína C reactiva que encontraron Silveira A y col, si bien hay que destacar que fue una correlación débil ($r=0,291$, $p=0,031$) en el grupo de controles y sin significación estadística en los pacientes [136]. Esta interrelación podría explicar otras observaciones realizadas por distintos grupos de trabajo que demostraron un aumento de los niveles de TAFI_{ag} y TAFI_{fc} en los sujetos en diálisis peritoneal [137], niveles elevados de TAFI_{fc} en pacientes con nefropatía diabética en hemodiálisis [138] y niveles elevados de TAFI_{ag} y TAFI_{fc} en diabéticos tipo 2 [139], ya que en todos estos casos subyace un estado proinflamatorio que, a través del daño endotelial a nivel sistémico y glomerular, puede desencadenar secundariamente las cascadas de la coagulación y la fibrinólisis [140]. La posibilidad de que el incremento de los niveles de TAFI sea consecuencia de secreción directa desde células endoteliales sólo se sustenta en la observación de Hori Y y col, quienes demostraron la expresión de TAFI *in vitro* (en *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs), ya que hasta la fecha no se ha demostrado la posibilidad de que las células endoteliales *in vivo* puedan sintetizarlo [139].

Se han descrito diversos métodos para cuantificar los niveles de TAFI, algunos utilizando ELISAs comerciales, otros basados en técnicas amidolíticas utilizando

sustratos cromogénicos. En ambos casos, pero especialmente en el caso del ELISA, se ha comprobado que los niveles de TAFI se relacionan directamente con el genotipo [119]. La presencia de niveles reducidos de TAFI en pacientes con la variante Ile/Ile podría obedecer a una verdadera disminución en sus niveles (menor transcripción o traducción o mayor tasa de eliminación, por ejemplo) o a un defecto técnico en el que los anticuerpos utilizados exhibieran una menor reactividad para reconocer el TAFI de los sujetos portadores de dicho fenotipo [141]. Las técnicas descritas para la cuantificación del TAFI^{fc} tampoco están libres de limitaciones. Los métodos puestos a punto se basan en cuantificar la cantidad de TAFI que puede ser activado *in vitro*. Hasta ahora no se ha descrito una técnica capaz de cuantificar el TAFI^a circulante *in vivo*, en parte debido a su corta vida media, y tampoco es posible medir el TAFI^a una vez inactivado. Actualmente, se están desarrollando técnicas que permitan cuantificar la concentración del péptido de activación circulante, con el objetivo de aproximarnos al verdadero valor de TAFI^{fc} generado en humanos¹.

Se ha estudiado el papel del TAFI en el contexto de determinadas patologías. Así, se han encontrado niveles elevados de TAFI^{ag} en pacientes con trombosis venosa profunda [142] y niveles reducidos de TAFI^{ag} y de TAFI^{fc} en pacientes con coagulación intravascular diseminada en los que existe un ambiente de hipercoagulabilidad e hiperfibrinólisis [143]. En enfermedades con manifestaciones hemorrágicas como la hemofilia A y B, los niveles de TAFI se encontraron disminuidos [144] y los parámetros de hiperfibrinólisis se normalizaron con la adición de factor VIII, TAFI o trombomodulina [145].

Con relación al papel del TAFI en cardiopatía isquémica crónica, merece la pena destacar las siguientes observaciones. En pacientes con cardiopatía isquémica documentada se ha comprobado la presencia de hipofibrinólisis y concentraciones aumentadas de TAFI^{fc} [136]. Los llamados factores de riesgo cardiovascular clásicos no parecen influir en los niveles de TAFI^{fc} [146] ni en los de TAFI^{ag} [131, 147]. En un estudio de casos y controles, la presencia de niveles elevados de TAFI^{ag} (por encima del percentil 90%) fue mayor en el grupo control, por lo que se sugirió que el TAFI^{ag} era protector desde el punto de vista coronario (OR 0,55 con $p < 0,02$) [147]. En

¹ Subcomité del Comité científico de estandarización 2003-2004 de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (<http://www.med.unc.edu/isth/SSC/04sscminutes/04fibrinolysis.html>).

oposición a estos resultados, un estudio posterior con diseño prospectivo (estudio PRIME) demostró con mayor solidez estadística que la presencia de niveles elevados de TAFIag incrementaba el riesgo de desarrollar angina de pecho en la evolución a 5 años ($\times 10$, en el caso de los sujetos en el tercil mayor) [148]. Morange PE y col elucidaron que, aunque un nivel plasmático elevado de TAFI provocaría hipofibrinólisis, un nivel de TAFIfc elevado localizado intraplaca podría disminuir la generación de plasmina y la consecuente activación de las metaloproteasas. Así, el efecto de una concentración elevada de TAFIfc a nivel sistémico sería deletérea desde el punto de vista coronario pero a nivel local intraplaca favorecería la estabilidad de la misma y sería beneficiosa desde el punto de vista coronario [148]. Sin embargo, hasta la fecha no se han publicado trabajos que hayan estudiado directamente las concentraciones de TAFI en las placas de ateroma. Las discrepancias acerca de los niveles de TAFIag podrían explicarse por problemas técnicos en la cuantificación del TAFIag relacionados con el genotipo, tal y como se ha comentado antes, o por una diferente distribución del polimorfismo C1040T. Según este último supuesto, si los sujetos con genotipo TT, o variante Ile/Ile, presentan niveles menores de TAFIag y mayores de TAFIfc, su mayor prevalencia en pacientes con cardiopatía isquémica justificaría la presencia de niveles discordantes de TAFI en este grupo. Sin embargo, Morange PE y col no encontraron diferencias en la distribución de este polimorfismo entre casos y controles [149]. En cuanto a la relación entre los niveles de TAFIag y la evolución clínica, Brouwers GJ y col encontraron una correlación positiva con el grado de refractariedad al tratamiento médico de la angina de pecho [150].

El análisis de otros polimorfismos del gen del TAFI ha arrojado resultados contradictorios. Así, Juhan-Vague I y col analizaron el polimorfismo Ala147Thr en un estudio de casos (infarto de miocardio) y controles, encontrando una mayor prevalencia del alelo Thr en el grupo de controles [147], mientras que Morange P y col demostraron que la variante Thr/Thr de este mismo polimorfismo incrementaba 2,7 veces (IC 95% 1,2-5,8) el riesgo de desarrollar angina de pecho a 5 años [148].

Finalmente, algunos autores han centrado recientemente su actividad investigadora en identificar inhibidores del TAFI para ser aplicados de forma coadyuvante al tratamiento trombolítico. De esta manera, podrían potenciar la acción del trombolíticos permitiendo así la administración de dosis menores con menor tasa de efectos secundarios [119, 151, 152].

1.6. LIPOPROTEÍNA (a)

En relación con los lípidos y el sistema fibrinolítico, se puede señalar a la Lp(a) como nexo de unión entre arteriosclerosis, inflamación y trombosis debido, por una parte, a su acción proaterogénica y proinflamatoria y, por otra, a su actividad hipofibrinolítica que secundariamente promueve la trombosis.

La Lp(a) fue identificada por Berg K a principios de los años 60 [153]. Se trata de una lipoproteína de baja densidad (LDL) en la que la apolipoproteína B100 se encuentra unida a una glicoproteína de un tamaño muy variable, apo(a), codificada en el brazo largo del cromosoma 6 [154]. Al igual que la molécula del plasminógeno, la apo(a) está formada por dominios catalíticos y secuencias de 80 a 90 aminoácidos, llamados *kringles*, de los que se han descrito distintos tipos (Figura 1.14). La síntesis de Lp(a) es fundamentalmente hepática y su concentración plasmática en población general es muy variable y no sigue una distribución normal, sino que se encuentra sesgada hacia los valores más bajos. Se han descrito hasta 34 isoformas de apo(a) en función de su movilidad en un gel de electroforesis que pueden agruparse en isoformas de bajo (B, S1 y S2) y alto (S3, S4, S5) peso molecular [155].

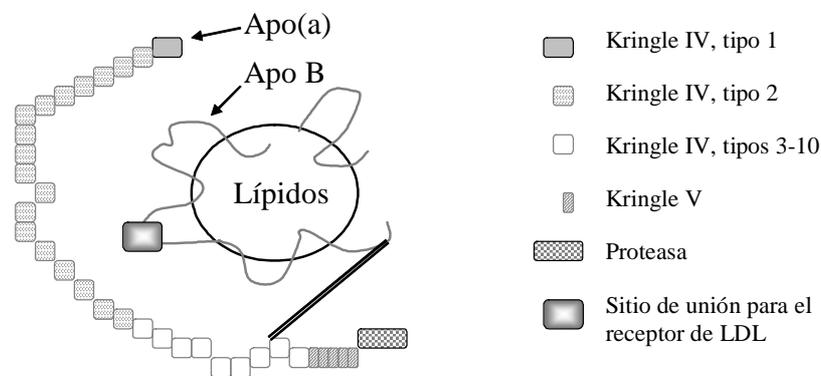


Figura 1.14. Dibujo esquemático de la molécula de Lp(a). Apo: apolipoproteína. (Modificado de Berglund L y col, 2004 [156]).

El número de copias del tipo 2 del kringles IV codificadas en el cromosoma 6 condiciona el tamaño final de la apo(a) y, así, se han descrito diferentes isoformas de apo(a) con una masa molecular que oscila entre 250 y 900 kDa [157]. A su vez, el número de copias del tipo 2 del kringles IV parece condicionar los niveles plasmáticos de Lp(a) de forma que, en presencia de un menor número de copias y un menor tamaño

de apo(a) muchos autores han observado mayores concentraciones de Lp(a) [155, 158, 159]. En virtud de las leyes de la genética, un sujeto podría heredar un cromosoma 6 que codificara una isoforma de bajo peso molecular y otro que codificara una isoforma de alto peso molecular, dos de alto peso molecular o dos de bajo peso molecular. Para simplificar el estudio de las isoformas de Lp(a), los trabajos publicados han agrupado a los sujetos estudiados basándose en la isoforma *predominante* en cada caso. Se entiende por isoforma predominante aquella con mayor representación en una electroforesis, pues el grosor de la banda es directamente proporcional a su concentración. Por otro lado, independientemente del tamaño de la apo(a), la concentración plasmática de la Lp(a) parece estar ligeramente influida por factores raciales pues, en general, su nivel es mayor en sujetos de raza negra [160]. Para analizar la actividad hipofibrinolítica y proaterogénica de la Lp(a) se han estudiado sus niveles tanto de forma continua como discreta tras dicotomizar esta variable tomando como punto de corte de 30 mg/dl, siendo deletéreas (con mayor hipofibrinólisis y proaterogénesis) las concentraciones superiores a estas cifras [161-163].

La acción protrombótica de la Lp(a) es el resultado tanto de su actividad proagregante, comentada anteriormente [38], e hipofibrinolítica, tal y como se desarrolla a continuación. En un estudio con ratones transgénicos, Palabrica TM y col demostraron una disminución de la actividad fibrinolítica *in vivo* mediada por los niveles de Lp(a) [164]. Extrapolando estos resultados, se ha sugerido que la Lp(a) puede inhibir la actividad fibrinolítica *in vivo* y por tanto contribuir al desarrollo de fenómenos trombóticos. Una primera vía por la que la Lp(a) produce hipofibrinólisis se comprobó *in vitro* mediante estudios en cultivos de células endoteliales, en los que se vio que la Lp(a) estimulaba la expresión de PAI-1 [165]. En el segundo mecanismo descrito juega un papel fundamental la importante similitud existente entre los cADNs de la apo(a) y el plasminógeno [166], que se traduce en una estructura proteica similar para ambos. Como consecuencia de este parecido estructural, la Lp(a) compite con el plasminógeno para unirse a la fibrina y, por lo tanto, puede inhibir la fibrinólisis fisiológica y promover la trombosis [167-169].

El potencial hipofibrinolítico de la Lp(a) no es homogéneo [170, 171]. Se cree que la variabilidad en la actividad fibrinolítica en plasmas con altos niveles de Lp(a) podría deberse, al menos en parte, a la presencia de diferentes isoformas de apo(a), cada una de ellas con un potencial antifibrinolítico distinto. En sujetos con niveles

similares de Lp(a), la capacidad inhibitoria se correlaciona con la concentración relativa de la isoforma de bajo peso molecular. Por lo tanto, el potencial antifibrinolítico de la Lp(a) parece depender tanto de la concentración plasmática de Lp(a) como de la concentración relativa de isoformas de bajo peso molecular [172-176].

Aunque se ha indicado que el aumento de los niveles de Lp(a) (analizada tanto de forma continua como dicotómica) constituye un factor de riesgo independiente para la aterotrombosis [167, 170, 177-179], el mecanismo fisiopatológico subyacente no se ha definido completamente y en la actualidad no se estudia rutinariamente ni en los pacientes con cardiopatía isquémica reconocida ni en la población general. Algunos autores atribuyen a la Lp(a) un papel relevante en el crecimiento de la placa y han apuntado que su concentración es mucho mayor en las placas de ateroma inestables que en las estables, pues favorece la oxidación de las moléculas de LDL, fomenta el crecimiento de las células musculares lisas y de las células espumosas *in vitro* y la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial [180-183]. En parte, la actividad proaterogénica de la Lp(a) parece estar relacionada con su efecto proinflamatorio, descrito por Buechler C y col y mediado por un incremento en la producción monocitaria de interleucina-6 [184].

Ya en el capítulo de la aterotrombosis coronaria, el metaanálisis de Danesh J y col reafirmó el papel de la Lp(a) como factor de riesgo cardiovascular [185], a pesar de los resultados contradictorios de diferentes estudios de cohortes previos. El incremento del riesgo aterogénico mediado por los niveles de Lp(a) no ha sido homogéneo. Así, en ocasiones ha sido continuo, otras sinérgicamente con el colesterol-LDL [161] [186] o sólo en asociación a las isoformas de apo(a) de bajo peso molecular [187]. De los resultados más recientes, interesa destacar el trabajo de Rifai N y col en el que, tanto la presencia de isoformas de bajo peso molecular como la presencia de niveles elevados de Lp(a), predecían el riesgo de desarrollar angina de pecho en 5 años en sujetos sanos, aunque la primera con mayor fuerza y grado de independencia [186]. En otros estudios, esta relación entre el riesgo cardiovascular y el tamaño de la apo(a) fue desigual en función del sexo, siendo menos concluyente entre las mujeres [178].

La relación entre las concentraciones séricas de Lp(a) y la severidad de la afectación coronaria en las angiografías fue estudiada en pacientes con situación clínica

inestable (infarto agudo de miocardio y angina inestable) [188-191]. Si bien se acepta que los niveles de Lp(a) están genéticamente determinados, algunos autores han apuntado que existe cierta variabilidad al alza en presencia de un proceso inflamatorio actuando, en cierto modo, como un reactante de fase aguda [188-190]. Por este motivo, se prefiere realizar su estudio en situación clínica estable (infarto de miocardio crónico y angina estable). En este contexto, los estudios que han analizado la posible relación entre niveles elevados de Lp(a) y una mayor extensión del fenómeno aterotrombótico coronario han sido discordantes. Así, algunos estudios encontraron una asociación significativa entre las concentraciones de Lp(a) y la severidad de la enfermedad coronaria (en un grupo sólo de hombres y la mayoría mayores de 50 años) [192, 193], otros sólo encontraron una débil tendencia positiva sin significación estadística [194], mientras que otros trabajos no encontraron relación alguna [195]. Por otra parte, se han publicado resultados discrepantes acerca del valor potencial de las isoformas de bajo peso molecular para identificar sujetos con aterotrombosis coronaria difusa, encontrándose en algunos trabajos una asociación positiva [196, 197], pero no en otros [198].

El motivo por el cual la cuantificación de la Lp(a) no se ha trasladado a la esfera clínica es, en parte, por la falta de tratamientos específicos, como serían la terapia génica para modificar la expresión de las isoformas y/o la medidas encaminadas a disminuir sus niveles plasmáticos. En cuanto al primero, no existen trabajos en la literatura en este campo y, en cuanto al segundo, aunque se han probado diferentes opciones terapéuticas, todas ellas han tenido efectos contradictorios o muy limitados. De hecho, la única medida realmente eficaz es la aféresis que, con todos los inconvenientes y gastos que conlleva, es capaz de disminuir la concentración de Lp(a) hasta un 50% [199]. Las dietas y la pérdida de peso pueden disminuir discretamente el nivel de Lp(a). En cuanto a los fármacos estudiados, se han observado modestas disminuciones de los niveles de Lp(a) con aspirina (tanto *in vitro*, reduciendo la transcripción del gen de la apo(a) en hepatocitos humanos [200], como *in vivo*, en sujetos sanos antiagregados con aspirina [201]) y con tratamiento hormonal sustitutivo (*in vivo*, en mujeres menopáusicas [202]). Otros estudios analizaron el efecto de la niacina [203], la L-carnitina [204] o el ácido ascórbico con L-lisina [205] para reducir los niveles de Lp(a), sin resultados demasiado optimistas. Las estatinas han tenido efectos contradictorios en los niveles de Lp(a), aumentándolos en unos estudios [206] o disminuyéndolos en otros [207].

1.7. FACTORES DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

A continuación se describen las características más relevantes de los distintos factores estudiados dentro del sistema de la coagulación.

1.7.1. SISTEMA DE LA PROTEÍNA C

La proteína C activada (APC) es el enzima biológicamente activo derivado de la proteína C y uno de los factores más importantes que inhiben la cascada de la coagulación sanguínea. Los niveles plasmáticos de APC reflejan la activación del sistema de la proteína C *in vivo*. En la activación de la proteína C participan otras proteínas como la trombina, la trombomodulina y el EPCR (véase más adelante). Alteraciones cuantitativas o cualitativas en cualquiera de los integrantes del sistema de activación de la proteína C pueden repercutir directamente en la velocidad de activación de la proteína C y, por tanto, en los niveles de APC circulante.

La APC exhibe su actividad anticoagulante a partir de la activación de su zimógeno, la proteína C, por el complejo trombina:trombomodulina en la superficie de la célula endotelial, plaquetas y monocitos [28, 208]. Cuando el EPCR se une a su ligando es capaz de aumentar cerca de 20 veces la tasa de activación de la proteína C mediada por el complejo trombina:trombomodulina (Figura 1.15) [209].

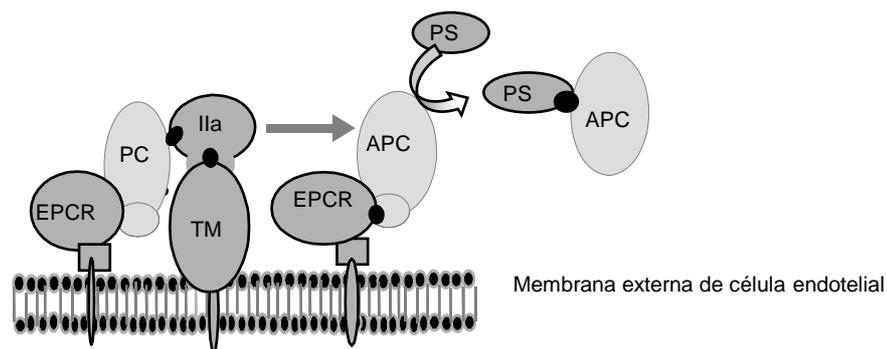


Figura 1.15. Esquema del proceso de activación de la proteína C. La unión de la IIa a la TM produce un cambio conformacional del enzima que permite la rápida activación de la PC a APC. La unión previa de la PC al EPCR acelera aún más esta activación generándose APC de forma más efectiva. La PS libre, cofactor de la APC, la disocia del EPCR y, así, la APC circulante puede exhibir su actividad anticoagulante. EPCR: receptor endotelial de la proteína C; PC: proteína C; IIa: trombina; TM: trombomodulina; APC: proteína C activada; PS: proteína S. (Tomado de España F y col, 2005 [28]).

En general, los enzimas proteolíticos generados en la circulación sanguínea tienen una vida media de segundos. Una excepción es la APC, cuya vida media es de alrededor de 10 minutos [210]. La lenta inactivación de la APC le permite circular durante un tiempo relativamente largo, durante el cual se desplaza hasta los complejos de la coagulación que median el paso final de X a Xa y de protrombina a trombina. Ambos se encuentran situados sobre las superficies fosfolipídicas procoagulantes de las células y al ser inactivados por la APC se evita la propagación de la coagulación. Asimismo, esta lenta inactivación permite a la APC unida al EPCR intervenir en procesos de señalización celular.

Aunque los principales inhibidores de la APC son el PCI y la α_1 -antitripsina [211], en un segundo orden de importancia deben citarse también la α_2 -macroglobulina [211], la α_1 -antiplasmina y el bloqueo de la proteína S por el fragmento C4b-BP.

La antitrombina y el PCI pueden inactivar a la trombina unida a la trombomodulina a una velocidad 20 veces mayor que a la trombina libre [212]. La trombina inhibida se disocia rápidamente de la trombomodulina y abandona la superficie endotelial. Por lo tanto, al cesar la generación de trombina, el complejo de activación de la proteína C deja rápidamente de generar APC. Tal y como se ha comentado previamente, el PCI también puede actuar parcialmente como profibrinolítico disminuyendo la activación del TAFI a TAFIa (Figura 1.13) [145], efecto que no acaba de comenzar su actividad antifibrinolítica derivada de su acción inhibitoria sobre los activadores fibrinolíticos uPA y tPA [56-58]. Todos estos mecanismos, fisiopatológicamente desfavorables desde el punto de vista coronario, podrían justificar los resultados de Carroll VA y col, quienes encontraron niveles elevados de PCI en plasma de pacientes con infarto de miocardio [213].

La α_1 -antitripsina es un inhibidor tipo serpina que inhibe al factor XIa, a la plasmina y a la APC [211].

La α_2 -macroglobulina es un inhibidor de reacción lenta y de amplio espectro, capaz de inactivar a la mayor parte de los factores de la coagulación y fibrinólisis activados, a metaloproteasas de la matriz extracelular, a enzimas bacterianos y proteasas de leucocitos. La α_2 -macroglobulina es una globulina de alto peso molecular formada por cuatro subunidades iguales que actúa mediante un mecanismo diferente al

de los inhibidores tipo serpina. Su mecanismo de acción es similar al de una jaula donde el enzima queda físicamente atrapado. El enzima permanece funcionalmente activo frente a pequeños sustratos capaces de atravesar los *barrotes de la jaula*, pero no así frente a las grandes moléculas proteicas que son sus sustratos fisiológicos.

Otro mecanismo regulador del sistema anticoagulante de la proteína C es el bloqueo de la proteína S. Existen dos formas moleculares de proteína S circulantes en plasma: en forma libre y unida reversiblemente a la proteína reguladora del sistema del complemento C4b-BP, englobada dentro de los reactantes de fase aguda [214]. Sin embargo, únicamente la forma libre de la proteína S (cerca del 40% de la concentración plasmática total) presenta actividad anticoagulante como cofactor de la APC [215]. Durante los procesos inflamatorios, el drástico incremento en la concentración de C4b-BP desplaza el equilibrio habitual y hace que, por un lado aumente el complejo PS:C4b-BP y, por otro, que disminuya significativamente la concentración de la proteína S libre. En consecuencia, se ve reducida la actividad anticoagulante de la proteína S como cofactor de la APC y se favorece, en último término, la aparición de fenómenos trombóticos [216-220].

La actividad anticoagulante, profibrinolítica, antiinflamatoria y antiapoptótica de la APC se resumen en la Tabla 1.5 (desarrollo completo en la referencia 23).

Actividad de APC	Aclaración
Anticoagulante	La APC circulante, unida a su cofactor, la proteína S, inhibe a los factores Va y VIIIa, reduciendo así la generación de Xa y de trombina y, finalmente, el paso de fibrinógeno a fibrina.
Profibrinolítica	Reduce los niveles de inhibidores de la fibrinólisis como son el PAI-1 y TAFIa. En animales aumenta la liberación del activador del plasminógeno.
Antiinflamatoria	Disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y la migración de leucocitos. En modelos animales, la APC disminuye los efectos inflamatorios de toxina de E. Coli. En fenómenos inflamatorios, el aumento de C4B disminuye la disponibilidad de PS libre, así se genera menos APC y se favorece la trombosis.
Antiapoptótica	Acción mediada por EPCR y PAR-1. Disminuye la expresión de los genes proapoptóticos Bcl2 y p53.

Tabla 1.5. Resumen de las acciones fisiológicas de la APC. Tal y como se observa en la tabla, todas estas acciones serían beneficiosas para evitar o retrasar tanto el fenómeno aterotrombótico crónico como sus complicaciones agudas. APC: proteína C activada; EPCR: receptor endotelial de la proteína C; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; PAR-1: receptor activado por proteasa tipo 1; TAFIa: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina activado.

Se sabe que la APC es uno de los principales inhibidores de la coagulación. Para exhibir su actividad anticoagulante la APC debe dissociarse del EPCR gracias a la mediación de su cofactor, la proteína S [215], pues sólo de esta manera puede inactivar a los factores VIIIa y Va. Ambos factores son esenciales para la activación de los factores X y II, respectivamente, por lo que su inactivación reduce o imposibilita la activación de la protrombina. Este mecanismo explica los resultados obtenidos por distintos trabajos, en los que deficiencias cuantitativas o cualitativas de proteína C y proteína S, o respuestas insuficientes a la APC, se han visto relacionadas con un mayor riesgo de trombosis venosa [221, 222]. De hecho, deficiencias aisladas de proteína C, proteína S y la mutación factor V Leiden en conjunto dan cuenta de más del 50% de los casos de trombofilia familiar [223]. También se ha demostrado la asociación entre niveles disminuidos de APC y un mayor riesgo de trombosis venosa [224], e incluso se ha sugerido que esta condición podría contribuir al estado de hipercoagulabilidad observado en ciertas patologías, como son la enfermedad de Behçet [225] y la insuficiencia renal crónica [226].

Otras facetas de la APC la relacionan directamente con la fibrinólisis. Así, puesto que se ha comprobado que la plasmina puede activar a la proteína C *in vitro* [227], la cascada de la fibrinólisis promueve simultáneamente un efecto anticoagulante mediado por la APC. Recíprocamente, la APC posee actividad profibrinolítica a través de varias vías. Se sabe que la APC reduce los niveles del PAI-1 [228-230], aumenta la liberación del tPA en perros [231] y, además, es capaz de modular a la baja la vía del TAFI. Esta afirmación se sustenta en la observación de que una disminución de la formación de trombina reduciría secundariamente la activación del TAFI mediada por esa misma trombina.

La APC ha demostrado tener actividad antiinflamatoria. Por un lado, al inhibir la producción de trombina contrarresta las propiedades proinflamatorias de ésta [232]. Por otra parte, la APC goza también de actividad antiinflamatoria por sí misma. Esta afirmación se basa en modelos animales de sepsis con toxinas de *Escherichia coli*, en los que se comprobó cómo la administración de APC evitaba el efecto letal de las toxinas y mejoraba la evolución clínica [233]. Parece que este efecto antiinflamatorio es dependiente del EPCR [234] y que radica en la capacidad de la APC para inhibir la producción de citocinas (factor de necrosis tumoral α e interleucina 1β) por las células inflamatorias [235, 236], así como para disminuir la activación y migración de

leucocitos a la zona dañada [237, 238]. Otros trabajos han sugerido que la actividad antiinflamatoria de la APC puede también estar mediada por una reducción en la expresión de las subunidades p50 y p52 del factor nuclear $\kappa\beta$ [239, 240], tan estudiado últimamente en relación con el fenómeno inflamatorio (Figura 1.16).

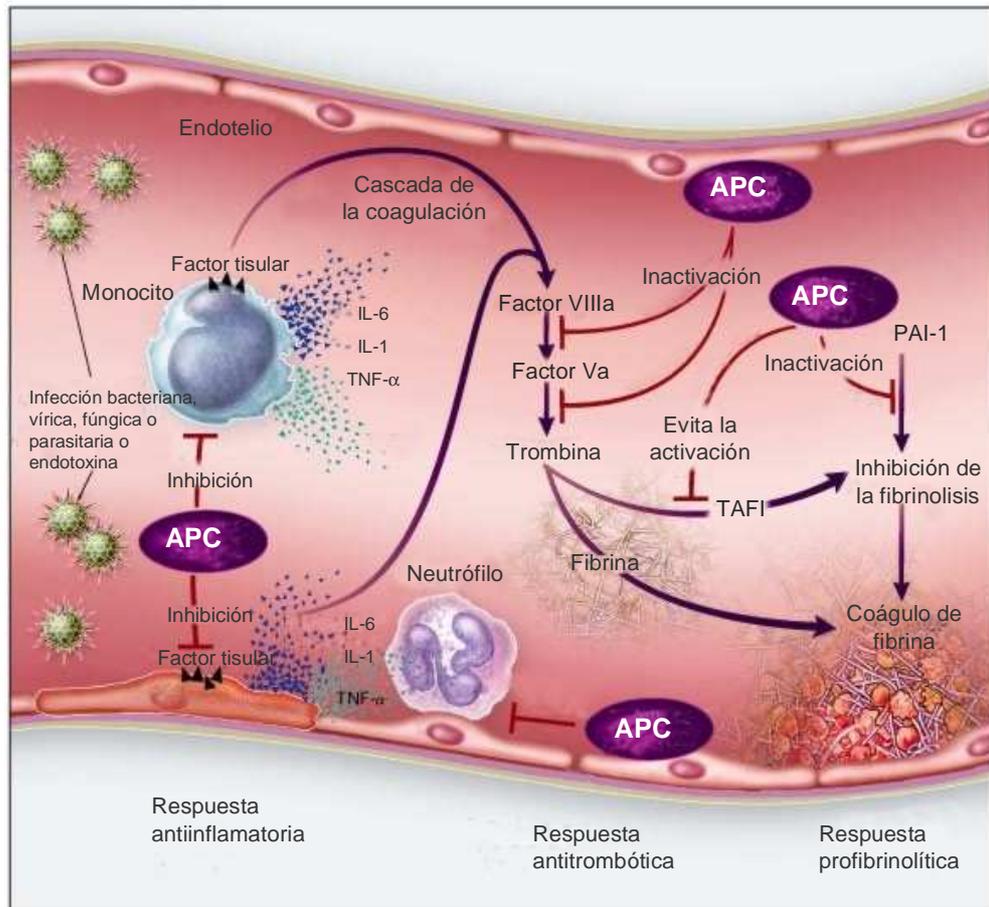


Figura 1.16. Esquema de las acciones fisiológicas de la APC. Se resumen la actividad antiinflamatoria, antitrombótica y profibrinolítica. APC: proteína C activada; VIIIa: factor VIII activado; Va: factor V activado; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; IL: interleucina; TNF: factor de necrosis tumoral; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina. (Modificado de Bernard GR y col, 2002 [241]).

Una vez instaurado el proceso inflamatorio se desencadena un círculo vicioso entre inflamación y coagulación, pues la inflamación estimula la coagulación (al aumentar la producción endotelial de factor tisular, factor de von Willebrand y PAI-1, al precipitar la liberación de reactantes de fase aguda como el fibrinógeno y el factor

VIII y al liberarse distintas citocinas que, por ejemplo, disminuyen la expresión de EPCR y de trombomodulina responsables de una menor generación de APC) y simultáneamente la coagulación estimula la inflamación (a través de la acción proinflamatoria de la trombina, de los factores Xa y VIIa y de los productos de degradación de la fibrina) [242].

Tal y como se ha comentado, la APC exhibe una actividad antiapoptótica al inhibir la apoptosis mediada por staurosporina [243]. Para que se manifieste este efecto es necesaria la participación de los receptores de la APC, como son el receptor tipo 1 activado por proteasas (PAR-1) y el EPCR quienes, al fijar a la APC, permiten la modulación de la expresión de genes relacionados con la apoptosis, como son el Bcl-2 y la proteína p53 [243, 244]. En modelos animales, la administración de APC disminuyó el daño cerebral del ictus isquémico gracias al bloqueo de la apoptosis mediado por staurosporina y N-metil-aspartato [245-247]. Estos resultados han abierto atractivas expectativas para su empleo futuro en el tratamiento de múltiples patologías.

Aunque la implicación del sistema de la proteína C en la trombosis venosa ha sido confirmada en diferentes trabajos, tal y como se ha expuesto anteriormente, todavía no se han determinado los mecanismos fisiopatológicos que explican el papel de la APC en la trombosis arterial. Con todo, distintos grupos de trabajo han documentado evidencias que apoyan el papel protector del sistema de la APC para el desarrollo de trombosis arteriales. Por ejemplo, se ha objetivado cómo el bloqueo de la activación de la proteína C puede empeorar el daño miocárdico en diseños experimentales con corazones porcinos [248]. Sin embargo, en otros diseños experimentales con animales, Hahn Ra y col no demostraron una reducción significativa en el área del infarto de miocardio que provocaban en perros a los que simultáneamente se les perfundía APC [249]. A pesar de esta última observación, hay evidencias que refuerzan el vínculo entre niveles bajos de APC y la aterotrombosis arterial coronaria. Así, la presencia de un autoanticuerpo dirigido contra el sitio de unión de la proteína C para la trombina humana, bloqueó su activación mediada por el complejo trombina:trombomodulina y clínicamente se asoció con el desarrollo de trombosis arterial espontánea recurrente [250]. Por otra parte, se ha descrito la presencia de un inhibidor de la APC que provoca la expresión del fenotipo APC-resistente y que también se manifiesta con trombosis extensas, tanto venosas como arteriales [251].

En un estudio poblacional se encontró una asociación gradual y directa entre la resistencia a la acción de la APC y el desarrollo de arteriosclerosis [252] y, en otro estudio prospectivo, unos niveles reducidos de proteína C funcional fueron predictores de eventos coronarios en la evolución en supervivientes de un primer infarto de miocardio [253]. Tal y como han comentado algunos autores, las deficiencias hereditarias de proteína C también podrían contribuir a la aparición de infarto de miocardio a edad precoz [254-256].

Sakamoto T y col demostraron en un modelo canino que la administración de APC evitaba la reoclusión coronaria tras el tratamiento convencional con trombolisis y sugirieron la posibilidad futura de poder utilizar APC como tratamiento coadyuvante con la trombolisis en el tratamiento de los pacientes con infarto agudo de miocardio [257]. Paradójicamente, más tarde, algunos de estos investigadores observaron la presencia de niveles mayores de APC en aquellos pacientes en quienes falló la trombolisis. En ellos, la formación de trombina se mantuvo activa, apenas inalterada por la trombolisis. Posiblemente, a pesar del aumento en su generación, la APC propia de cada paciente no pudo contrarrestar la rápida formación de fibrina [258]. Muy interesantes fueron las conclusiones de Strandberg K y col, quienes apuntaron que la cuantificación del complejo que forman la APC y su inhibidor, el PCI, permitía identificar a los pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación inicial de marcadores de lesión que posteriormente sí presentaron curva típica de necrosis miocárdica [259]. Sin duda, la aplicabilidad clínica en este sentido de la cuantificación de APC sería de inestimable ayuda en los servicios de urgencias de cualquier hospital.

Finalmente, interesa destacar que algunos estudios han sugerido que diferentes mutaciones en los genes de la trombomodulina y el EPCR pueden favorecer el desarrollo de trombosis arteriales [260, 261]. En realidad, la mayoría de estas mutaciones ocasionarían modulaciones de la actividad de estas proteínas que, secundariamente, reducirían la generación o la función final de la APC. Sin embargo, la APC no se cuantificó en ninguno de ellos.

1.7.2. FACTOR V LEIDEN

En 1993 se publicó el primer caso de factor V resistente a la degradación por la APC [221]. Poco después se tipificó la mutación subyacente en la mayoría de los casos (G1691A), que corresponde a la sustitución Arg506Gln y que origina un factor V mutado, conocido como factor V Leiden [222]. Su prevalencia en nuestro entorno es del 1,5% [262], aunque presenta una enorme variabilidad con relación al área geográfica estudiada. Así, en Europa oscila del 2% al 7% [263]. Dado que la acción fisiológica de este factor es procoagulante, la presencia de un factor Va que no puede ser inactivado por su inhibidor natural (la APC) conlleva una exacerbación de la cascada de la coagulación con tendencia al desarrollo de trombosis. Además de promocionar la trombosis, el factor V Leiden puede inhibir la fibrinólisis en modelos animales, y se cree que dicha acción podría estar mediada por un aumento en la generación de TAFIa secundario al incremento en la producción de trombina en presencia de dicha mutación genética [264]. Numerosos estudios han comprobado que, junto con la mutación G20210A del gen de la protrombina, es el factor genético de riesgo más importante para desarrollar trombosis venosa [265, 266]. Sin embargo, los esfuerzos dirigidos a esclarecer su vinculación con el infarto de miocardio y el ictus isquémico han arrojado resultados contradictorios, por lo que, de momento, su papel en el ámbito de la trombosis arterial sigue siendo una incógnita [267-270]. Finalmente, dos situaciones parecen potenciar el riesgo de infarto de miocardio en sujetos portadores del factor V Leiden: su asociación al tabaquismo [271] y su combinación con la mutación G20210A del gen de la protrombina [13].

1.7.3. MUTACIÓN G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA

Tres años después del descubrimiento del factor V Leiden, Poort SR y col describieron otra mutación protrombótica, esta vez en el gen de la protrombina, que fue tipificada como G20210A [272]. Al igual que sucede en la prevalencia del factor V Leiden, la prevalencia de la mutación G20210A de la protrombina es altamente dependiente del área geográfica estudiada. En nuestro entorno, se ha cifrado alrededor del 3% [262]. En este caso, la sustitución de una sola base (guanina por adenina) en la

posición 20210 de la región 3' no traducida del gen de la protrombina se asocia con mayores niveles plasmáticos de protrombina, que justifican el aumento del riesgo de trombosis venosa observado en los portadores de esta mutación. Esa hipertrombinemia podría explicar, según Colucci M y col [273], un aumento en la activación del TAFI en pacientes portadores de esta mutación y, en consecuencia, ocasionaría un efecto hipofibrinolítico similar al comentado para el factor V Leiden y que justificaría, al menos en parte, la tendencia protrombótica observada en estos pacientes. Sin embargo, tal y como se ha apuntado previamente, hasta la fecha no se ha comprobado su implicación en fenómenos trombóticos arteriales [274, 275] en general, ni coronarios [276, 277] en particular, ni siquiera en sujetos jóvenes [278], aunque de nuevo, su asociación al tabaquismo [271] y al factor V Leiden [13] podrían potenciar significativamente su asociación al riesgo de padecer un infarto de miocardio.

1.8. OTROS FACTORES

1.8. 1. PROTEÍNA C REACTIVA

El fenómeno inflamatorio está implicado en todas las fases de la aterotrombosis y constituye un nexo de unión entre el proceso de formación de la placa y su inestabilización (ruptura y formación de trombo en superficie). La proteína C reactiva está formada por 5 subunidades de 23 kDa. Se engloba dentro de los reactantes de fase aguda que expresan la respuesta sistémica ante cualquier noxa infecciosa o inflamatoria y, en particular, en el contexto de la aterotrombosis es producida por las células musculares lisas de las arterias enfermas [279]. La proteína C reactiva puede ser causa del fenómeno aterotrombótico (bien por lesionar directamente el endotelio y ocasionar disfunción endotelial [279] o por aumentar la liberación del factor tisular por parte de los monocitos [280]), o ser simplemente una consecuencia de este fenómeno, un marcador de inflamación en el contexto de disfunción endotelial producida por otros mecanismos. Actualmente, se considera el biomarcador más sensible de inflamación y, en los últimos años, se ha consolidado no sólo como un potencial marcador de riesgo cardiovascular [281] sino también como un marcador pronóstico de mortalidad hospitalaria tras un infarto [282-287]. En las últimas recomendaciones de la American Heart Association se delimitaron las franjas de riesgo cardiovascular con relación a los niveles de proteína C reactiva [288]. Así, un valor de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-PCR) <1 mg/l correspondería a un riesgo bajo, entre 1 y 3 mg/l a un riesgo moderado y >3 mg/l a un riesgo alto. Niveles muy altos, por encima de 10 mg/l, se atribuyen a procesos inflamatorios agudos más que a procesos crónicos, como es la aterotrombosis.

1.8.2. FIBRINÓGENO

El fibrinógeno es una pieza clave en la cascada de la coagulación, dado que es el sustrato de la trombina y el precursor de la fibrina (Figura 1.6). Su concentración es el principal determinante de la viscosidad plasmática y puede inducir agregación eritrocitaria y plaquetaria, siendo todos ellos aspectos deletéreos desde el punto de vista coronario por favorecer el desarrollo de eventos coronarios agudos [289]. Por este

motivo, se ha suscitado interés por estudiar distintos polimorfismos del fibrinógeno que podrían modular su concentración y/o modificar su potencial proagregante eritrocitario [290, 291]. Pero su papel no se limita al momento en que se genera un trombo sobre una placa complicada, sino que distintos trabajos han comprobado que el fibrinógeno, al estimular la migración celular y la proliferación de células musculares lisas, está implicado en las fases más iniciales de la aterotrombosis [292, 293]. Por otra parte, es bien conocido que el fibrinógeno constituye uno de los reactantes de fase aguda desencadenados por el fenómeno inflamatorio, estrechamente implicado en la patogenia de la aterotrombosis [294, 295].

A pesar de que se ha comprobado que su concentración aumenta en relación con la edad, el tabaquismo, la presencia de hipertensión arterial y la aparición de la menopausia, actualmente existe evidencia científica suficiente para avalar su papel como factor de riesgo independiente para eventos cardiovasculares en cualquiera de los territorios arteriales considerados (coronario, cerebral o vascular periférico) [296, 297]. El incremento del riesgo es continuo y gradual en todos los estudios publicados [298-301], aunque parece ser un predictor más débil de eventos cardiovasculares que la proteína C reactiva [302].

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dadas las relaciones existentes entre los sistemas de la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación y determinados factores de riesgo cardiovascular, la hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral es que ciertas alteraciones cuantitativas o cualitativas de algunos componentes de los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis pueden ser marcadores de riesgo cardiovascular, en particular de cardiopatía isquémica, en pacientes jóvenes.

Esta hipótesis de trabajo parte de observaciones previas en las que el número de factores de riesgo en pacientes más jóvenes con cardiopatía isquémica era menor que a edades más avanzadas. Si el concepto de riesgo cardiovascular se concibe como un continuum es probable que, en estos pacientes con menor número de factores de riesgo y/o menor tiempo de exposición a los mismos, otras variables desequilibren la balanza entre factores protectores y factores de riesgo de cardiopatía isquémica y adelanten la edad de expresión clínica de cardiopatía isquémica.

Puesto que, en cierta medida, algunas de las variables seleccionadas pueden estar determinadas genéticamente y su expresión modulada parcialmente por factores ambientales (algunos de ellos factores de riesgo cardiovascular), resulta conveniente estudiar estas variables de forma global, incluyendo los aspectos genéticos y los niveles, siempre en conjunto con los factores de riesgo cardiovascular establecidos.

Por otro lado, dado que en el crecimiento de la placa de ateroma juega un papel destacado la incorporación parcial de un trombo localizado en la superficie de una placa complicada, la hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral también plantea que la extensión y/o severidad de la aterosclerosis coronaria puede estar relacionada con algunas de las variables analizadas.

Finalmente, si se acepta que el síndrome coronario agudo y el accidente isquémico cerebral (trombótico o tromboembólico) comparten el mismo sustrato anatómico (la placa complicada con trombo en superficie), se plantea que las variables estudiadas pueden estar relacionadas con los eventos trombóticos (fatales o no fatales) registrados en la evolución de estos pacientes.

OBJETIVOS

1. Describir las características basales de la población joven con infarto de miocardio en nuestro medio, incluyendo la presencia de factores de riesgo cardiovascular.
2. Estudiar determinadas características genéticas del PAI-1 (polimorfismo 4G/5G), del TAFI (polimorfismo C1040T) y de la Lp(a) [isoforma mayoritaria de la apo(a)], así como el polimorfismo G20210A del gen de la protrombina y el factor V Leiden en pacientes y en sujetos controles. Evaluar su asociación con el infarto de miocardio a edad joven.
3. Analizar los niveles plasmáticos de algunos parámetros relacionados con el equilibrio hemostático en pacientes y en sujetos controles. Los parámetros seleccionados incluyen inhibidores de la fibrinólisis, como el PAI-1 o el TAFI, la Lp(a) y la APC. Evaluar su asociación con el infarto de miocardio a edad joven.
4. Evaluar la asociación de los parámetros estudiados con la extensión y la severidad de la aterosclerosis coronaria en el grupo de pacientes.
5. Valorar la relación entre los parámetros seleccionados y el desarrollo de eventos tromboticos (exitus trombotico, reingreso por síndrome coronario agudo o accidente vascular cerebral y evento combinado exitus-reingreso) en la evolución de los pacientes estudiados.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Tal y como se ha comentado en la Introducción, la aterotrombosis es una enfermedad multifactorial, resultado de dos procesos fisiopatológicos, la aterosclerosis y la trombosis. El primero es la consecuencia paulatina del efecto deletéreo de los factores de riesgo cardiovascular (en especial los más ampliamente reconocidos, como son la hipertensión arterial, el tabaquismo, la diabetes mellitus, la dislipemia y la obesidad) sobre la pared arterial y tiene como sustrato anatómico la placa de ateroma. El segundo proceso fisiopatológico, la trombosis, es la consecuencia puntual de un desbalance hemostático en la superficie de una placa complicada. Con el objetivo de analizar los factores hemostáticos que podrían jugar algún papel relevante en este segundo proceso, el presente trabajo de tesis doctoral se centró en el estudio de sujetos jóvenes con menos de 51 años, en los que el fenómeno aterosclerótico se encuentra menos avanzado que en sujetos mayores, pues los factores de riesgo cardiovascular han tenido más tiempo en estos últimos para ejercer su acción patológica sobre la pared vascular.

Los diseños de los estudios publicados en el ámbito clínico de la cardiopatía isquémica no son homogéneos y, en cualquier caso, se centran en un único aspecto de laboratorio. De hecho, se han publicado trabajos de casos (pacientes con cardiopatía isquémica) y controles (sujetos sanos) [136, 147] [86], estudios de cohortes en población general [148] [79, 90] y metaanálisis [105, 185]. En ocasiones, especialmente en estudios de casos y controles, resulta difícil, o incluso imposible, discernir si determinados agentes son *causa* del desarrollo y progresión de la aterotrombosis, si únicamente expresan disfunción endotelial como *consecuencia* de un daño vascular previo, o si se les pueden atribuir ambas propiedades. Otras limitaciones de los diseños transversales de casos y controles radican fundamentalmente en la falta de legitimidad para catalogar de *factor de riesgo* a un parámetro determinado, debiendo limitarse a identificarlo como *marcador de riesgo*. Esta limitación queda superada en los estudios de cohortes que, sin embargo, precisan un mayor despliegue de recursos y tamaños muestrales considerablemente más grandes.

La búsqueda de factores de riesgo genéticos en patología trombótica arterial, se ha efectuado mayoritariamente bajo la concepción de estudios de casos y controles. En general, antes del desarrollo de esta tesis doctoral, ninguno de estos trabajos había demostrado asociaciones suficientemente rotundas entre algún polimorfismo (individualmente analizado) y la cardiopatía isquémica como para llevar el estudio sistemático de dicho polimorfismo a la práctica clínica diaria. No obstante, otros diseños y distintas interacciones gen-medio ambiente, gen-gen y gen-fármaco podrían modular (potenciar) los resultados publicados. Varios ejemplos del primer tipo de interacción, gen-medio-ambiente, han sido expuestos en la Introducción y se basan en que el efecto de una determinada característica genética depende del grado de exposición a un factor medioambiental (como por ejemplo, el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 y el síndrome metabólico, el factor V Leiden o la mutación G20210A del gen de la protrombina y el tabaquismo, entre otros) [303]. Por su parte, la interacción gen-gen explica que el efecto neto de dos mutaciones simultáneas en un mismo portador sea mayor que la suma del efecto de cada una de ellas individualmente consideradas (como por ejemplo, el estado de portador del factor V Leiden y la mutación G20210A de la protrombina) [303]. Finalmente, la interacción gen-fármaco avala la modulación del efecto de un fármaco dado en presencia de una determinada mutación (como por ejemplo, la presencia del alelo Leu34 en el gen del factor XIII reduce la eficacia de la trombolisis en el contexto de un infarto de miocardio [304], aunque no se han descrito interacciones de este tipo en las variables seleccionadas en este trabajo).

Con todas estas consideraciones, la presente tesis doctoral se basa en un diseño de casos y controles con seguimiento prospectivo posterior de los pacientes. Un diseño inicial de cohortes habría sido inasumible desde el punto de vista humano, técnico y económico en virtud del número de parámetros a analizar y las particularidades de la extracción y el procesado de las muestras. Este tipo de diseño es compartido por un gran número de trabajos en este ámbito, y permite identificar nuevos marcadores de riesgo interesantes para plantear estudios de cohortes más ambiciosos en el futuro.

3. 2. GRUPOS CLÍNICOS

Los sujetos incluidos en este estudio se reclutaron entre septiembre de 2000 y septiembre de 2005 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado y todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

El grupo de pacientes, compuesto por 237 sujetos, fue reclutado en la Unidad de Cuidados Intensivos y en la sala de hospitalización de Cardiología. Todos ellos se diagnosticaron de infarto agudo de miocardio, procedían del área geográfica del mediterráneo español y tenían menos de 51 años. Fueron criterios de exclusión la procedencia de áreas geográficas diferentes, los antecedentes de neoplasias, hepatopatía grave, enfermedades hematológicas y consumo actual de drogas.

Inicialmente, el diagnóstico de infarto agudo de miocardio se basó en los criterios clásicos de la Organización Mundial de la Salud. Posteriormente, el nuevo reconocimiento de la sensibilidad y especificidad de las troponinas obligó a redefinir esta entidad a nivel mundial [305] y los nuevos criterios fueron aplicados en este estudio (Tabla 3.1).

Con el fin de evitar la pérdida (por mortalidad precoz) de aquellos pacientes con peor perfil clínico, todos los pacientes incluidos fueron sometidos a dos extracciones sanguíneas. La primera se realizó durante las primeras 72 horas del ingreso por infarto agudo de miocardio y la muestra se destinó exclusivamente a los estudios genéticos, ya que no se alteran durante la fase más aguda del evento isquémico ni con el tratamiento administrado. La segunda extracción se realizó al menos 3 meses tras el último episodio de inestabilización clínica y en ella se completó el estudio con una bioquímica general y la cuantificación de los niveles de los parámetros elegidos.

Organización Mundial de la Salud	Documento de consenso de la European Society of Cardiology/ American College of Cardiology
Definición de infarto de miocardio. Deben estar presentes al menos dos de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none">• síntomas típicos (dolor torácico).• elevación enzimática.• patrones típicos en el ECG con el desarrollo de ondas Q de necrosis.	Definición de infarto de miocardio agudo, en evolución o reciente. Debe estar presente uno de los siguientes criterios: <ul style="list-style-type: none">• Curva típica de troponinas o CK-MB con al menos uno de los siguientes: síntomas isquémicos, desarrollo de ondas Q patológicas en el ECG, cambios en el ECG indicativos de isquemia (elevación o depresión del segmento ST) o intervencionismo coronario.• Hallazgos patológicos compatibles con infarto agudo de miocardio.

Tabla 3.1. Definiciones de infarto de miocardio. Definición clásica de la Organización Mundial de la Salud y redefinición del Documento de Consenso de la European Society of Cardiology/ American College of Cardiology [305]. ECG: electrocardiograma; CK-MB: creatinfosfocinasa-isoenzima MB.

Al final del seguimiento se analizó el desarrollo de eventos clínicos mayores. Se consideraron eventos clínicos trombóticos mayores (por síndrome coronario agudo o por accidente vascular cerebral): el exitus, el reingreso y el evento combinado exitus y/o reingreso.

El grupo control, formado por 200 sujetos, fue reclutado de la sala de extracciones del hospital, paralelamente a la inclusión de pacientes. En la mayoría de los casos, los controles acudieron ambulatoriamente al hospital para completar los estudios incluidos en la valoración anestésica preoperatoria para cirugía menor de oftalmología, otorrinolaringología y traumatología. Este grupo poseía una distribución similar a la de los pacientes en cuanto a edad y sexo y sus integrantes procedían del área geográfica del mediterráneo español. Fueron criterios de exclusión la historia previa de cardiopatía isquémica, la procedencia de áreas geográficas diferentes, los antecedentes de neoplasias, hepatopatía grave, enfermedades hematológicas y consumo de drogas.

A diferencia de lo referido para los pacientes, los controles fueron sometidos a una única extracción sanguínea para participar en este estudio, de la que se obtuvo la muestra necesaria para realizar todas las determinaciones de interés (tanto las genéticas como las que cuantificaron los niveles plasmáticos de los parámetros analizados).

En la anamnesis realizada a todos los sujetos (pacientes y controles) se indagó acerca de la presencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos. Así:

- Se consideró que un sujeto era hipertenso cuando así lo refería, cuando llevaba medicación antihipertensiva y/o cuando se habían documentado cifras tensionales >140/90 mmHg, al menos en dos determinaciones basales.
- Se consideró que un sujeto era dislipémico cuando así lo refería, cuando llevaba medicación hipolipemiente^{II} y/o cuando en la bioquímica realizada se observaban valores de colesterol total >250 mg/dl y/o de triglicéridos >175 mg/dl.
- Se consideró que un sujeto era diabético cuando así lo refería, cuando llevaba medicación antidiabética y/o cuando en la bioquímica realizada se observaban valores de glucemia basal >110 mg/dl.
- Se consideró que un sujeto era fumador si alguna vez había fumado (fumador actual o exfumador de <10 años) y no fumador en caso contrario.
- Se registró peso y talla de cada individuo para calcular el índice de masa corporal (IMC) y se consideró la presencia de obesidad para IMC >30 kg/m².

En el grupo de pacientes se recogieron las siguientes variables clínicas relevantes desde el punto de vista cardiológico:

- La manifestación electrocardiográfica inicial del infarto de miocardio en cuanto a la elevación del segmento ST: sí versus no.
- En caso de manifestación inicial con elevación del segmento ST, la administración de tratamiento trombolítico: sí versus no.
- La función sistólica del ventrículo izquierdo: normal (≥55%), depresión ligera (40-54%) o depresión moderada-severa (<40%).

^{II} En el caso de los pacientes, debían tomar mediación hipolipemiente antes del diagnóstico de infarto agudo de miocardio para ser considerados dislipémicos y el mero hecho de llevar esta medicación como prevención secundaria de cardiopatía isquémica, con niveles de colesterol y triglicéridos normales y sin antecedentes conocidos no se consideró dislipemia.

- El resultado del test de esfuerzo: positivo, negativo o no concluyente (por no alcanzarse frecuencia submáxima o por detectarse alteraciones clínicas o eléctricas no definitivas de positividad).
- El resultado de la coronariografía. Las coronariografías se realizaron por el procedimiento de Judkins con el protocolo habitual. Se administró nitroglicerina intracoronaria antes de cuantificar digitalmente la severidad de las lesiones detectadas. Los hemodinamistas desconocían el resultado de los estudios genéticos y plasmáticos. Las coronariografías se analizaron desde tres puntos de vista:
 - A. Presencia de lesiones angiográficas significativas (presencia versus ausencia de lesiones). La presencia de lesiones coronarias angiográficamente significativas se definió como la identificación de, al menos, una lesión que produjera una reducción >70% del calibre luminal interno en algún vaso. En contraposición a esta categoría, la ausencia de lesiones coronarias significativas definió aquellas situaciones en las que no se identificó lesión alguna que cumpliera este requisito.
 - B. Número de vasos (o territorios) coronarios afectados (0-3 vasos). Un territorio coronario (territorio de la arteria descendente anterior-DA, de la arteria circunfleja-Cx y/o de la arteria coronaria derecha-CD) se consideró afectado si poseía al menos una lesión angiográficamente significativa. La lesión del tronco común izquierdo se contabilizó como 1 vaso, excepto cuando coexistían lesiones significativas en los territorios de DA y Cx, para que la puntuación máxima no excediera los 3 vasos en presencia también de lesiones en la CD [306].
 - C. Gradación de severidad-extensión angiográfica de las estenosis (grupos 1-3). Se analizó la lesión más importante en cada uno de los 8 segmentos coronarios considerados (tronco común izquierdo, DA, septales, diagonales, Cx, marginales, CD e interventricular posterior). Según su grado de estenosis, cada lesión seleccionada recibió una puntuación (0-49% 1 punto, 50-74% 2 puntos, 75-99% 3 puntos y 100% 4 puntos) [306]. La suma de estas puntuaciones parciales sirvió como gradación de la severidad-extensión de las lesiones ateroscleróticas. Para evitar la dispersión de los casos, los pacientes fueron agrupados en tres categorías atendiendo a esta puntuación: ausencia de lesiones ateroscleróticas (0 puntos, grupo 1), aterosclerosis leve (0-10 puntos, grupo 2) y aterosclerosis difusa (>10 puntos, grupo 3).

3.3. TOMA DE MUESTRAS

La primera muestra de sangre realizada en el grupo de pacientes se obtuvo durante las primeras 72 horas del ingreso y se anticoaguló con EDTA sin necesidad de ayuno previo, ya que se utilizó exclusivamente para los diferentes estudios genéticos indicados más adelante.

Todas las demás muestras de sangre (la segunda extracción en pacientes y la única extracción en controles) fueron obtenidas con 11 horas de ayuno, entre las 9 y 10 de la mañana y después de 10 minutos de reposo. La extracción de sangre se realizó por punción en la vena cubital y parte de ella se anticoaguló con citrato sódico 0,129 M (9:1, vol:vol, sangre:anticoagulante) procurando siempre que las muestras se mantuvieran a 4°C. Dos de estos tubos fueron utilizados para la determinación de la APC circulante siguiendo el protocolo que se precisa más adelante. El resto de la sangre citratada se centrifugó a 1500 x g durante 30 minutos a 4°C y los plasmas así obtenidos se conservaron en alícuotas a -80°C hasta su uso. Para el estudio de las técnicas genéticas, un tubo de sangre se anticoaguló con EDTA. Finalmente, de la sangre no anticoagulada se obtuvo el suero utilizado posteriormente para la determinación de la glucemia y el perfil lipídico.

3. 4. FACTORES DEL SISTEMA DE LA FIBRINOLISIS

En el capítulo de la fibrinólisis, elegimos el estudio detallado del PAI-1 y del TAFI, tanto desde el punto de vista genético (véase apartado 3.8, Técnicas Moleculares) como desde el punto de vista de sus niveles plasmáticos, que se desarrolla a continuación. El primero de ellos, el PAI-1, es el más importante inhibidor de la fibrinólisis *in vivo* y se le ha relacionado estrechamente con los componentes del síndrome metabólico. El TAFI, por su parte, es nexo de unión entre los sistemas de la coagulación y la fibrinólisis y se encuentra íntimamente relacionado con algunos integrantes del sistema de la proteína C. Asimismo, se incluyen las técnicas empleadas para la cuantificación del tiempo de lisis de las euglobulinas (TLE), como estimación global de la función fibrinolítica, y la determinación antigénica del tPA (tPAag).

3. 4. 1. DETERMINACIÓN ANTIGÉNICA DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1

Para a determinación antigénica del PAI-1 (PAI-ag) se empleó el kit comercial de ELISA TintElize PAI-1 (*Biopool, Wicklow, Irlanda*) y sus valores se expresan en ng/ml.

Aunque el PAI-1 puede encontrarse en varias formas (activo, inactivo o latente y acompañado con el tPA y el uPA), el ensayo utilizado cuantifica todas las formas con igual eficiencia. La variación intraensayo e interensayo fue del 3% y 7%, respectivamente.

Para la determinación antigénica del PAI-1 se utilizó el tipo de ELISA de doble anticuerpo o “*sandwich*”. El esquema de las técnicas de ELISA es el siguiente:

- 1) *Reacción inmunológica*: Los pocillos de la microplaca se incuban con un exceso del anticuerpo de captura, anticuerpo monoclonal específico contra la proteína a valorar. La muestra, convenientemente diluida, se incuba en la microplaca para lograr la unión de todo el antígeno de la muestra al anticuerpo de captura.

A continuación, se lava la placa y se incuba con un exceso del segundo anticuerpo, el anticuerpo de detección, que es policlonal y se encuentra conjugado con un enzima. Dicho anticuerpo se une al antígeno inmobilizado y se forman complejos “sandwich” (anticuerpo-antígeno-anticuerpo/enzima) unidos a cada pocillo (Figura 3.1). La cantidad de enzima unido al pocillo es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

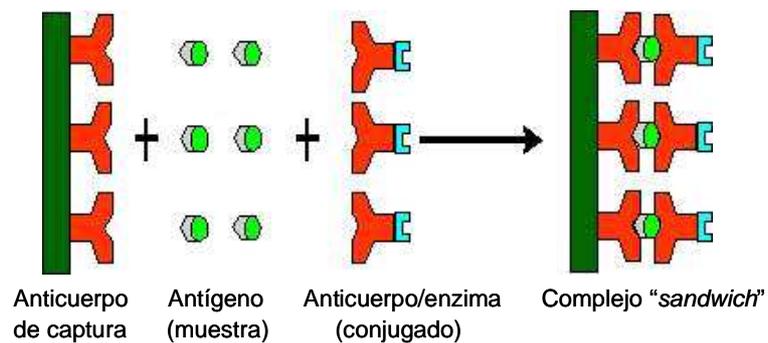


Figura 3.1. Esquema de la reacción inmunológica en la que se basa la cuantificación del PAI-1ag.

2) *Reacción enzimática y cuantificación:* Posteriormente 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 él da un producto coloreado (amarillo) (Figura 3.2). La absorbancia medida por espectrofotometría a una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración del antígeno presente en la muestra. Paralelamente, en cada placa se incluyen estándares a concentraciones conocidas de antígeno para construir una curva de calibración.

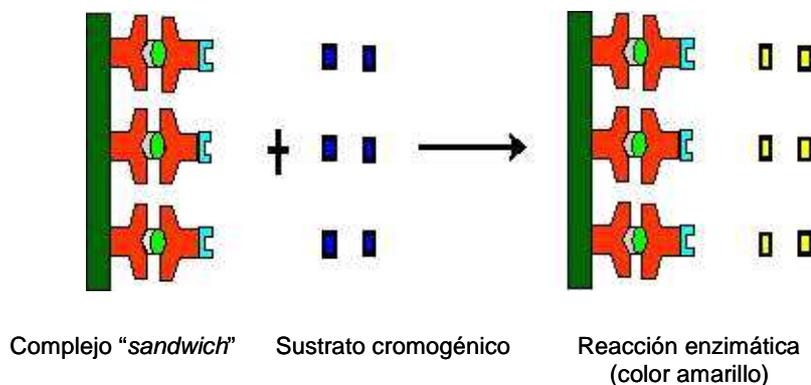


Figura 3.2. Esquema de la reacción enzimática que permite la cuantificación final del PAI-1ag.

Básicamente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se disuelve el vial de tampón PET (PBS/EDTA/Tween 20) en 1 litro de agua destilada. El tampón PET es tampón fosfato salino (PBS) (fosfato sódico 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,14 M) que contiene ácido etilendiaminotetracético (EDTA) y Tween 20.
- 2) Se preparan diluciones de PAI-1 plasmático a concentraciones de 40, 30, 20, 10, 5, 2,5 y 0 ng/ml.
- 3) Se reconstituye la placa proporcionada por la casa comercial (que tiene unido el anticuerpo de captura) con 100 µl/pocillo de tampón PET y se agita suavemente 1 minuto.
- 4) Se añaden 20 µl/pocillo de cada muestra o estándar.
- 5) Con 6 ml de tampón PET se reconstituye el liofilizado de anti-PAI-1 policlonal conjugado con peroxidasa y se añaden 50 µl a cada pocillo.
- 6) Se incuba 2 horas a temperatura ambiente con agitación (500-600 rpm) y se lava la placa cuatro veces con tampón PET.
- 7) Se reconstituye el sustrato ortofenildiaminodihidrocloro (OPD) con 22 ml de agua bidestilada y se añade el vial de H₂O₂. Se añaden 200 µl de sustrato a cada pocillo. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- 8) Se añaden 50 µl de solución STOP (H₂SO₄ 3M) y a la absorbancia a 492 nm se le resta la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas (*Thermo Labsystems MRX Revelation, Chantilly VA, EEUU*). La concentración se calcula a partir de la curva patrón obtenida con los valores de absorbancia producidos por los estándares.

3. 4. 2. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1

El ensayo para la determinación funcional del PAI-1 (PAI-1fc) consiste en valorar la capacidad inhibitoria que el plasma tiene sobre el tPA de una cadena (sct-PA) añadido a la muestra. Los valores de PAI-1fc se expresan en U/ml.

En una primera etapa, parte del sct-PA incorporado a la muestra es inhibido por el PAI-1 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 del sct-PA. Para ello, se añade a la muestra una mezcla de plasminógeno, fibrina y sustrato cromogénico, de forma que el sct-PA funcional residual transforma el plasminógeno en plasmina. La actuación enzimática de ésta sobre el sustrato cromogénico libera pNA de color amarillo y la cantidad de color producida es directamente proporcional a la cantidad de tPA de la muestra. La determinación del PAI-1fc se calcula a partir de la diferencia existente entre el sct-PA añadido inicialmente y el sct-PA valorado al final del ensayo.

La cantidad de PAI-1fc que inhibe 1 U de sct-PA en 10 minutos a temperatura ambiente se define como 1 U. Los valores de las muestras se dan en relación a una curva patrón realizada con distintas concentraciones de patrón internacional de tPA. La variación intraensayo e interensayo fue del 6% y 9%, respectivamente.

Básicamente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se incuba un volumen de sct-PA (*American Diagnostica, Greenwich CT, EEUU*) con un volumen igual de plasma o diluciones de plasma en tampón (fosfato sódico 0,02 M pH 7,3, NaCl 0,1 M) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 2) La reacción se detiene mediante acidificación con un volumen igual de acetato sódico (1 M pH 3,9) durante 15 minutos y posteriormente se diluye a 1/50 con tampón Tris-HCl (0,05 M pH 8,8, NaCl 0,1 M, Triton X-100 0,1 µg/l).

- 3) El volumen obtenido se mezcla con un volumen igual de una combinación del mismo tampón 1 M plasminógeno (*Chromogenix, Estocolmo, Suecia*) y 0,6 mM S-2251 (*Chromogenix*). A continuación se le añade fibrina soluble a una concentración final de 0,07 g/l y se incuba durante 3 horas a 37°C.
- 4) Se lee la absorbancia en un lector de microplacas (*Thermo Labsystems MRX Revelatio*) a 405 nm y se resta la absorbancia a 492 nm.
- 5) Después de añadir plasminógeno, fibrina soluble y sustrato cromogénico se determina la actividad del tPA residual midiendo la absorbancia del color, producto de la actividad enzimática de la plasmina generada sobre el sustrato cromogénico.
- 6) La actividad funcional de PAI-1 se determina a partir de la diferencia entre el tPA añadido y el tPA residual.

3. 4. 3. DETERMINACIÓN ANTIGÉNICA DEL INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA

Para la cuantificación antigénica del TAFI (TAFIag) se utilizó el kit comercial de ELISA COALIZA TAFI (*Chromogenix*). Los resultados se expresan como porcentaje frente a plasmas de 30 sujetos de voluntarios sanos.

En cada ensayo se utilizan dos plasmas control con niveles altos y bajos de TAFI. El ensayo contiene anticuerpos específicos para el TAFI humano: uno de captura monoclonal y otro de detección policlonal conjugado con peroxidasa.

Básicamente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se preparan diluciones del plasma patrón para la curva de calibración.
- 2) Las muestras se diluyen a 1:50 o 1:100.
- 3) Se reconstituye la placa (que tiene unido el anticuerpo de captura) añadiendo a cada pocillo 200 µl del plasma de la curva de calibración o de los plasmas a valorar, así como de los plasmas control.

- 4) Se incuba durante 2 horas a 37°C y se lava la placa cuatro veces con tampón de lavado.
- 5) En cada pocillo se añaden 200 µl de anti-TAFI policlonal conjugado con peroxidasa.
- 6) Se incuba 1 hora a 37°C y de nuevo se lava la placa cuatro veces con tampón de lavado.
- 7) Se añaden 200 µl de sustrato TDM (Tetrametilbenzidine que contiene peróxido de hidrógeno) y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
- 8) Se añaden 50 µl de solución STOP (H₂SO₄ 4,5M) y se mide la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (*Thermo Labsystems MRX Revelation*). La concentración se calcula a partir de la curva patrón obtenida con los valores de absorbancia producidos por los estándares.

3. 4. 4. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DEL TAFI

Los niveles de funcionalidad del TAFI (TAFIfc) se determinaron mediante un test cromogénico llamado Actichrome TAFI activity (*American Diagnostica*) y se expresan en µg/ml.

En esencia, el ensayo está formado por tres fases. En la primera, se incuba el plasma con el reactivo para activar al TAFI (complejo trombina-trombomodulina). Así, tras añadir un sustrato para carboxipeptidasas, se pone en marcha la actividad carboxipeptidasa total del plasma, la debida a la carboxipeptidasa N del plasma (biológicamente activa desde su liberación por parte del hígado) y la actividad del TAFI (una vez activado gracias a la adición previa de su complejo de activación). A continuación, se estima dicha actividad a partir de la absorbancia de la muestra a 490 nm. En la segunda fase se analizan las muestras sin incorporar el complejo de activación del TAFI, de forma que la adición del sustrato para carboxipeptidasas desencadena exclusivamente la actividad carboxipeptidasa N del plasma. De nuevo

se estima dicha actividad a partir de la absorbancia de la muestra a 490 nm. Finalmente, en una tercera fase se resta la segunda absorbancia a la primera con el fin de calcular la absorbancia debida únicamente al TAFI_{fc}. La concentración de TAFI se determina por extrapolación de este resultado sobre las absorbancias observadas en la curva estándar. El resumen de la técnica se muestra en la Figura 3.3.

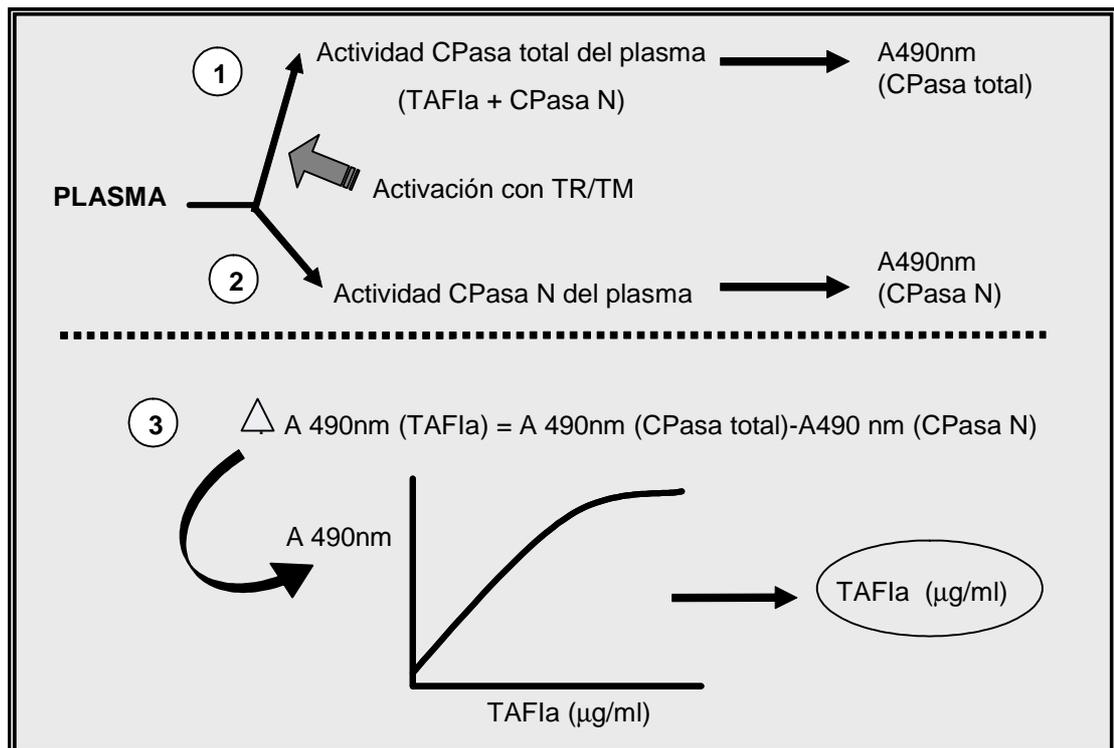


Figura 3.3. Esquema del protocolo para la cuantificación del TAFI_{fc}. Gracias a la adición del complejo trombina-trombomodulina (activador específico del TAFI) se calcula la actividad CPasa total del plasma, que corresponde a la suma de la actividad CPasa N y la actividad del TAFIa (1). El mismo procedimiento sin adicionar el complejo trombina-trombomodulina permite cuantificar la actividad CPasa N del plasma (2). La diferencia de las absorbancias de ambos resultados corresponderá a la absorbancia debida al TAFI y a partir de una curva patrón se extrapolarán los resultados de las muestras problema (3). TAFIa: TAFI activado; CPasa: carboxipeptidasa; TR: trombina; TM: trombomodulina; A: absorbancia.

3. 4. 5. DETERMINACIÓN ANTIGÉNICA DEL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINÓGENO

La determinación de tPAag se llevó a cabo utilizando el kit comercial de ELISA Imulyse t-PA (*Biopool*) y los resultados se expresan en ng/ml.

El ensayo cuantifica con la misma eficiencia tanto las formas libres de tPA como las acomplejadas con sus inhibidores. El protocolo aplicado fue básicamente el mismo que el descrito anteriormente para el PAI-1ag, con la única diferencia de que los anticuerpos de captura y detección eran específicos para el tPA. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del 4% y 6%, respectivamente.

3. 4. 6. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE LISIS DE LAS EUGLOBULINAS

El TLE se calculó en plasma fresco, tal y como se ha descrito previamente [170] y los resultados se expresaron en minutos. La variación intraensayo fue del 3%.

El tiempo de lisis del coágulo formado por las euglobulinas plasmáticas es un método generalizado que permite estimar la actividad lítica global. Esta técnica detecta alteraciones de los activadores fibrinolíticos, del plasminógeno o del fibrinógeno.

Este ensayo se basa en forzar la precipitación de la fracción euglobulínica mediante acidificación. Esta fracción euglobulínica contiene gran parte del fibrinógeno, del plasminógeno y de los activadores del plasminógeno, pero solamente una pequeña cantidad de los inhibidores, fundamentalmente PAI-1, de forma que gran parte del PAI-1 y el resto de los inhibidores quedan en el sobrenadante. El precipitado, separado por centrifugación, se redisuelve en un tampón adecuado y se añade CaCl_2 . Finalmente, el tiempo de lisis de las euglobulinas corresponde al tiempo transcurrido hasta que se verifica la lisis del

coágulo formado. Tiempos acortados indican un aumento de la fibrinólisis y tiempos alargados indican una disminución de la fibrinólisis o un coágulo más resistente a la lisis.

Básicamente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) En un tubo de ensayo se introducen 0,5 ml de plasma pobre en plaquetas y 9,5 ml de agua bidestilada. A continuación la mezcla se acidifica con ácido acético 0,5% hasta un pH de 5,3.
- 2) La mezcla anterior se mantiene en hielo durante 30 minutos. El precipitado formado se separa por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos más, y se decanta el sobrenadante. A continuación se redisuelve el precipitado en 0,5 ml de tampón barbital sódico-HCl 0,1 M pH 7,3.
- 3) La solución se incuba a 37°C, se le añaden 0,5 ml de una solución de CaCl₂ 0,02 M y se espera hasta la formación del coágulo. A partir de ese momento, se cuantifica el tiempo que tarda en lisarse completamente.

3. 5. LIPOPROTEÍNA (a)

Se estudiaron los niveles de Lp(a) y la isoforma mayoritaria de apo(a) (genéticamente determinada por el tamaño del gen que la codifica), ya que son nexo de unión entre el metabolismo lipídico y el potencial hipofibrinolítico, proagregante y proaterogénico. Seguidamente se describen las técnicas empleadas para su estudio.

3. 5. 1. DETERMINACIÓN ANTIGÉNICA DE LA LIPOPROTEÍNA (a)

La concentración de Lp(a) plasmática se determinó con el ELISA comercial Macra Lp(a) (*Terumo, Newark DEL, EEUU*) y sus valores se expresan en mg/dl.

Las placas de ELISA están recubiertas de un anticuerpo monoclonal anti-Lp(a) sin reactividad cruzada con el plasminógeno ni con las lipoproteínas LDL, HDL o VLDL. El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue del 8% y 3%, respectivamente, y el límite inferior de detección de 0,8 mg/dl.

Básicamente, el protocolo utilizado fue el siguiente:

- 1) Se diluyen las muestras a 1:201 en tampón dilución. Los estándares vienen prediluidos.
- 2) Se añaden 100 µl de la muestra de plasma diluido en cada pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación (500- 600 rpm). Se retira el antígeno sobrante mediante 4 lavados de la placa con tampón lavado.
- 3) En cada pocillo se añaden 100 µl de un anticuerpo policlonal anti-Lp(a) conjugado con peroxidasa. Tras una incubación a temperatura ambiente y en agitación (500-600 rpm) durante 20 minutos, se retira el anticuerpo sobrante con 4 lavados de la placa con tampón lavado.
- 4) Se añaden 100 µl de una solución de OPD a cada pocillo y se mantiene en incubación durante 20 minutos en agitación (500-600 rpm).
- 5) Con 50 µl de ácido sulfúrico 2 N por pocillo se bloquea la reacción colorimétrica. Seguidamente, se mide la absorbancia a 492 nm y se resta la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas (*Thermo Labsystems MRX*).

3. 5. 2. DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LA LIPOPROTEÍNA (a)

La Lp(a) está formada por una molécula de apoB-100 unida mediante puente disulfuro a la glicoproteína apo(a). Siguiendo el método descrito por Kamboh MI y col [307] con ligeras modificaciones [202], de acuerdo a la movilidad relativa con respecto a la apoB, la electroforesis horizontal en gel de agarosa permitió identificar las isoformas de apo(a).

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1,6% de 15x15 cm (*Pronadisa, Madrid, España*) disuelta en tampón Tris (90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA.Na₂ 2 mM, SDS 0,1%) durante 5 horas a 140 v y 4°C (VxH= 700). Como fuente de alimentación se utilizó el sistema Biorad Model 3000Xi, en tanque horizontal ADN Subcell (*Biorad, Hercules CA, EEUU*) con tampón Tris (45 mM, ac. bórico 45 mM, EDTA.Na₂ 2 mM, SDS 0,1%). Las muestras se prepararon a partir de alícuotas de plasma citratado. El plasma se diluyó en la proporción 1:1 con el tampón muestra, formado por β-mercaptoetanol, 0,5% azul bromofenol en 5% glicerol y SDS 5% en la proporción 1:2:10. La mezcla se llevó a ebullición durante 5 minutos y se sembraron 15 µl en cada pocillo del gel. Puesto que la concentración plasmática de Lp(a) varía entre individuos, el volumen de plasma citratado en cada muestra se ajustó a fin de mantener constante la cantidad de Lp(a) aplicada (1-3 µg) en cada pocillo, ya que cantidades superiores de proteína y volúmenes de plasma superiores a 15 µl producen distorsión de la banda. En cada gel se incluyó una mezcla de isoformas de apo(a) humana (*Immuno AG, Viena, Austria*) que contenía cinco de las isoformas designadas por Utermann: la isoforma B (520 kDa), la isoforma S1 (550 kDa), la isoforma S3 (650 kDa), la isoforma S4 (700 kDa) y la isoforma S5 (800 kDa). Estos marcadores de masa molecular fueron utilizados como control interno.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm (*Biorad*) mediante electrotransferencia en un tanque de transferencia (*Biorad*) a 90 V, durante 3 horas a 4°C, en tampón de transferencia Tris 10 mM (glicina 40 mM y metanol 5%).

La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con tampón bloqueo consistente en tampón PBS en el que se disuelve leche desnatada (0,1% de materia grasa) en polvo al 5% para bloquear las zonas de unión inespecífica. A continuación se añadió anti-Lp(a) humana de origen ovino (*Immuno AG*) diluida a 1/1000 en tampón bloqueo y la membrana fue incubada durante toda la noche a 4°C con agitación lenta. Posteriormente se lavó con tampón bloqueo (3x10 min) para retirar el exceso del primer anticuerpo. Concluida esta fase, se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente con un segundo anticuerpo, esta vez dirigido contra las IgG de oveja (procedente de conejos) y conjugado con fosfatasa alcalina (*Immuno AG*), igualmente diluido a 1/1000 en tampón bloqueo. Finalmente se lavó la membrana generosamente con tampón PBS y se equilibró durante 10 minutos con tampón Tris (HCl 0,1 M pH 9,5).

Las bandas de Lp(a) se visualizaron con la adición del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato (BCIP) que produce un color azul al interaccionar con la fosfatasa alcalina. La reacción se paró con agua y la membrana se dejó secar a temperatura ambiente.

La intensidad de cada banda se determinó mediante reflexión en un lector Shimadzu 9000-CR/DR.13 a una longitud de onda de 535nm. El lector lleva asociado un procesador de datos que proporciona directamente el porcentaje de intensidad de color de cada banda respecto a la intensidad total en un individuo dado.

El control interno sirvió de referencia para identificar la isoforma predominante en cada muestra. Para ello, se determinó el parámetro Rf de cada banda^{III}. La relación existente entre las masas moleculares del estándar y su correspondiente Rf originó una ecuación, útil para calcular la masa molecular de cada isoforma de las muestras problema a partir de su Rf (Figura 3.4).

^{III} El parámetro Rf de una determinada muestra problema se calculó como sigue:
Rf (muestra problema)= distancia al origen de la banda problema / distancia al origen de la isoforma B del estándar

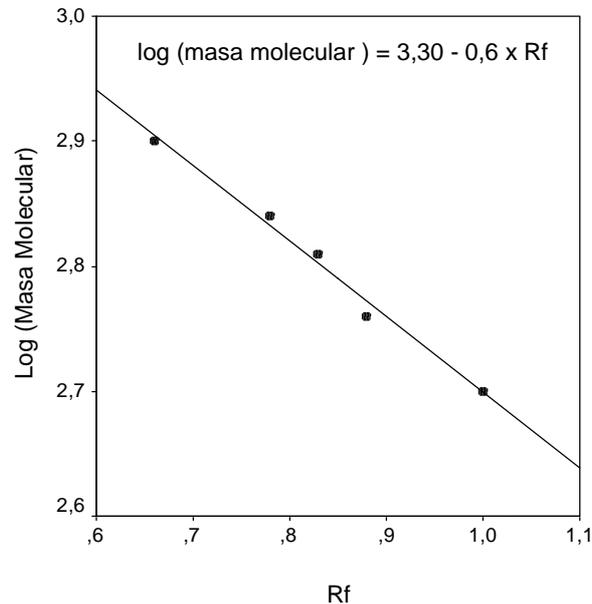


Figura 3. 4. Correlación entre el Rf de cada banda y el log de la masa molecular (kDa) de las apo(a). Rf: migración relativa respecto a la isoforma B. Log: logaritmo decimal.

Aunque mediante la técnica utilizada se pueden identificar hasta 23 isoformas de la apo(a), para simplificar el estudio se agruparon en función de su rango de Rf en seis tipos de isoformas (isoforma B, S1, S2, S3, S4 y S5) (Tabla 3.2). Según este criterio, a cada banda de apo(a) se la asignó un tipo de isoforma de apo(a). Existe la posibilidad de que un mismo sujeto posea una o dos bandas. En el primer caso, el paciente puede ser homocigoto para esa isoforma de apo(a) o bien heterocigoto con alelo nulo. En el segundo caso, se trata de un sujeto heterocigoto y en nuestro estudio fue catalogado en función de su isoforma *predominante*, que es aquella correspondiente a la banda con mayor intensidad y, por tanto, con mayor concentración plasmática. Finalmente, estas seis isoformas se categorizaron en dos amplios grupos: las isoformas de bajo peso molecular (con masa molecular estimada ≤ 620 kDa) e isoformas de alto peso molecular (con masa molecular estimada >620 kDa) (Tabla 3.2 y Figura 3.5).

Isoforma de Utermann	Rango de Rf	Rango de masa molecular (kDa)	Masa molecular de Utermann (kDa)
BPM:			
• B	≥ 0,97	≤ 523	500
• S1	0,96 - 0,90	524 – 578	550
• S2	0,89 - 0,86	579 - 620	600
APM:			
• S3	0,85 - 0,79	621 – 676	650
• S4	0,78 - 0,72	677 – 747	700
• S5	≤ 0,71	≥ 748	800

Tabla 3. 2. Clasificación de isoformas de apo(a) de acuerdo con su movilidad electroforética. BPM: bajo peso molecular. APM: alto peso molecular; Rf: migración relativa respecto a la isoforma B.

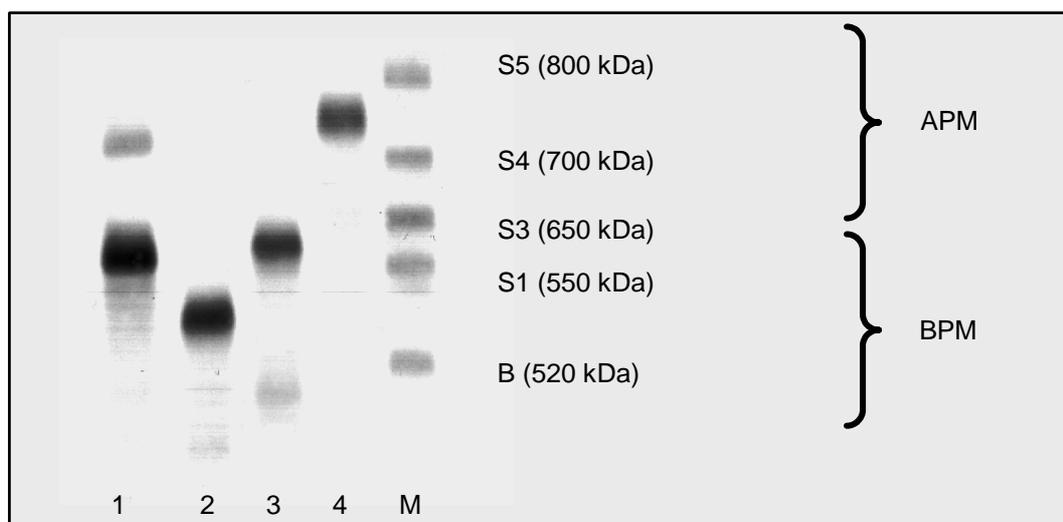


Figura 3.5. Clasificación de isoformas de acuerdo con su movilidad electroforética. Las líneas 1-4 corresponden a pacientes y la línea M a marcadores de masa molecular (estándar o control interno). BPM: bajo peso molecular; APM: alto peso molecular.

3. 6. FACTORES DEL SISTEMA DE LA COAGULACIÓN

Se estudiaron varios aspectos de los componentes del sistema de la proteína C en la medida en que pueden influir en la concentración final de APC, uno de los más destacados inhibidores naturales de la coagulación *in vivo*. La APC circulante constituye un íntimo nexo de unión entre las cascadas de la coagulación, la fibrinólisis y la inflamación y goza, además, de actividad antiapoptótica. A continuación se describe sucintamente la técnica empleada para su cuantificación, así como las utilizadas para la determinación de otros parámetros relacionados con el sistema de la coagulación.

3. 6. 1. CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE

Los niveles de APC circulante se determinaron siguiendo el método descrito previamente [308], con algunas modificaciones [224], basado en un ensayo tipo ELISA para la detección de la APC acomplejada con su principal inhibidor en plasma, el PCI. Los valores de APC se expresan en ng/ml. El límite de detección del ensayo de APC es 0,1 ng/ml. La variación intraensayo e interensayo fue inferior al 6% y al 11%, respectivamente.

A partir de 4,5 ml sangre anticoagulada con 0,129 M de citrato trisódico, el ensayo consiste en la medición de los complejos APC:PCI en dos tubos con preparaciones diferentes (uno con heparina y otro con benzamidina y PPACK) (Figura 3.6). El primer tubo se prepara añadiendo 46 µl de una disolución de heparina (1.000 UI/ml) y la mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos, con el fin de que toda la APC presente en el plasma (APC circulante) forme complejos con su principal inhibidor plasmático, el PCI, pues se sabe que en presencia de heparina, más del 95% del APC forma complejos con el PCI [309]. Así, en el primer tubo los complejos APC:PCI serán la suma de los complejos APC:PCI circulantes *in vivo* (A)

y los complejos APC:PCI formados *in vitro* a partir de la APC circulante *in vivo* (B) (Figura 3.6). El segundo tubo se prepara añadiendo 46 µl de una mezcla de 0,58 M benzamidina HCl y 0,5 mM PPACK para inactivar la APC circulante y evitar que pueda formar nuevos complejos. Así, en el segundo tubo los complejos APC:PCI serán los complejos APC:PCI circulantes *in vivo* (A) (Figura 3.6). Para calcular la concentración de los complejos APC:PCI en cada tubo se fuerza una reacción colorimétrica inmuno específica contra el PCI, se lee su absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA (*Thermo Labsystems MRX Revelation*) y se extrapola la concentración de los complejos APC:PCI a partir de una curva patrón construida con concentraciones conocidas de complejos APC:PCI (véase protocolo detallado a continuación). De la resta de la concentración de los complejos APC:PCI en el tubo de heparina y en el tubo de benzamidina y PPACK se obtiene el valor de la APC circulante [$B=(A+B)-A$].

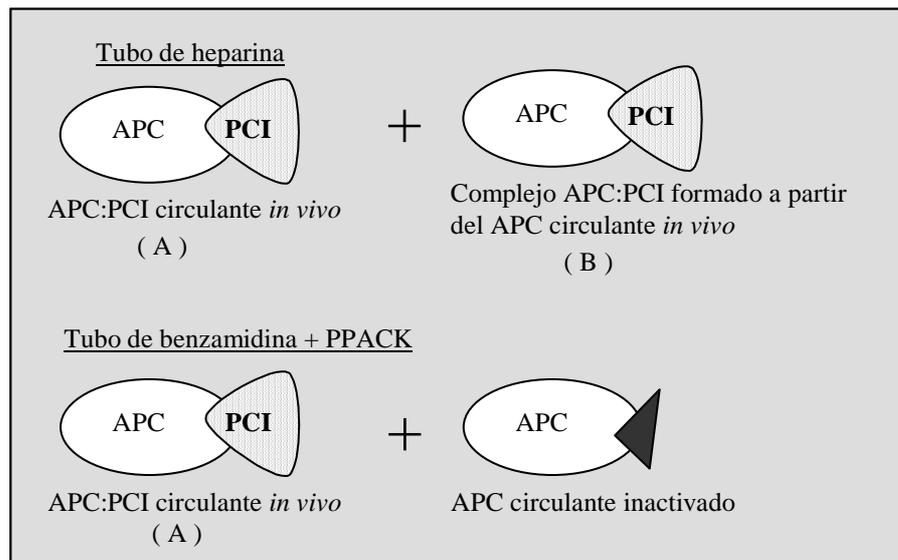


Figura 3.6. Esquema del fundamento del método de cuantificación de la APC circulante. APC: proteína C activada; PCI: inhibidor de la proteína C.

El protocolo para la cuantificación de complejos APC:PCI fue el siguiente:

- 1) Adsorción del anticuerpo de captura a la placa. Al menos durante una noche a 4°C en atmósfera húmeda, la placa de poliestireno Maxisorp F96 (*NUNC, Roskilde, Dinamarca*) se recubrió con una solución de anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3) en tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 0,1 M, 0,02% azida sódica, pH 9,6) (50 μl /pocillo).
- 2) Lavado. La placa se lavó tres veces añadiendo 250 μl de tampón bloqueo (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,14 M, 0,04% azida sódica, 0,02% Tween 20, 1% caseína, pH 7,4) en cada pocillo.
- 3) Bloqueo. La superficie libre restante de los pocillos se bloqueó por incubación con tampón bloqueo durante 1 hora a 37°C.
- 4) Lavados. La placa se lavó dos veces como se ha descrito anteriormente.
- 5) Incubación de las muestras. Se añadió a cada pocillo 50 μl de la muestra convenientemente diluida en tampón bloqueo (habitualmente 1/6), y se incubó en agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Lavados. La placa se lavó tres veces con tampón bloqueo, seguido de tres lavados con tampón conjugado (NaH_2PO_4 0,01 M, NaCl 0,14 M, 0,05% timerosal, 0,05% Tween 20, 0,1% seroalbúmina bovina, pH 7,4).
- 7) Incubación con el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. A cada pocillo de la placa se le añadió 50 μl del anticuerpo de detección, un anticuerpo policlonal anti-PCI diluido en tampón conjugado, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente, en agitación.
- 8) Lavados. La placa se lavó seis veces con tampón conjugado.
- 9) Revelado. Para ello, en cada pocillo se añadieron 50 μl de una solución de citrato sódico 0,1 M y fosfato sódico 0,2 M (pH 5,0), a la que en el momento de su uso se le añadieron 0,4 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de 30% H_2O_2 y 0,4 mg/ml de o-fenilendiamina (OPD) (*Sigma Chemical, Saint Louis MO, EEUU*) como sustrato de la enzima peroxidasa. El desarrollo de color tuvo lugar a temperatura ambiente y se paró la reacción a los 30 minutos mediante la adición de 40 μl de H_2SO_4 4M en cada pocillo. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA (*Thermo Labsystems MRX Revelation*).

3. 6. 2. DETERMINACIONES DE LA PROTEÍNA C

Los **niveles de proteína C antigénica** se determinaron mediante un ensayo tipo ELISA descrito previamente [310] y sus valores se expresan como % del valor de la proteína C antigénica presente en una mezcla de 28 plasmas de donantes sanos. El límite de detección del ensayo es de 2%. La variación intraensayo e interensayo fue inferior al 6% y 9%, respectivamente.

Brevemente, como anticuerpo de captura se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-proteína C (C3), y como anticuerpo de detección se utilizó la fracción IgG de un anticuerpo policlonal anti-proteína C conjugada con peroxidasa. La reacción se paró a los 25 minutos. La curva de calibración se preparó utilizando diluciones seriadas de una mezcla de plasmas de donantes sanos.

Los **niveles de proteína C funcional** se determinaron con un kit comercial de proteína C (*Instrumentation Laboratory, Milán, Italia*) basado en un ensayo cromogénico que se desarrolla en dos etapas: la incubación del plasma con el activador de la proteína C y la cuantificación de la proteína C activada usando un substrato cromogénico sintético (la paranitroanilina liberada se mide cinéticamente a 405 nm, siendo su nivel directamente proporcional a la actividad de la proteína C de la muestra). Los valores de la proteína C funcional se expresan como % del valor de la proteína C funcional presente en una mezcla de 28 plasmas de donantes sanos. Las variaciones intraensayo e interensayo fueron inferiores al 7%.

La deficiencia de proteína C se definió como el hallazgo de valores de proteína C funcional inferiores a la media menos 2 desvíos estándar en una mezcla de plasmas de donantes sanos, que en nuestro entorno correspondió a valores inferiores al 70%. Siempre se recomienda confirmar la deficiencia en una segunda determinación y, si es posible, realizar estudio familiar.

3. 6. 3. DETERMINACIÓN FUNCIONAL DEL INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA C

La determinación funcional del PCI se llevó a cabo siguiendo el método previamente descrito [309] y sus valores se expresan como % del valor del PCI presente en una mezcla de 28 plasmas de donantes sanos. El límite de detección del ensayo fue del 4%. La variación intraensayo e interensayo fue inferior al 8 y 12%, respectivamente.

Este ensayo se basa en la capacidad del PCI nativo para formar complejos con la APC. En presencia de heparina a una concentración final de 4-10 U/ml, la adición de un exceso de APC al plasma resulta en la formación de complejos entre todo el PCI plasmático activo y parte de la APC añadida, mientras que el posible PCI degradado o acomplejado no reacciona con la APC. Por tanto, cuando a una muestra plasmática que contiene PCI se le añade un exceso de APC purificada en presencia de heparina, la cantidad de complejos APC:PCI formados será proporcional (el doble en términos de concentración) a la concentración de PCI activo presente en la muestra.

Brevemente, a una alícuota de las muestras se le añadió heparina y un exceso de APC, y la mezcla fue incubada durante 60 minutos a 37°C. A continuación, estas mezclas se diluyeron convenientemente en tampón bloqueo y se determinaron los complejos APC:PCI mediante el ensayo de ELISA tipo “sandwich” descrito anteriormente.

3. 7. OTROS PARÁMETROS

3. 7. 1. OTROS PARÁMETROS HEMOSTÁTICOS

Los **niveles funcionales de fibrinógeno** se determinaron utilizando un reactivo estándar de alta sensibilidad IL (*Instrumentation Laboratory*).

El **fragmento 1+2 de la protrombina (F1+2)** se midió por una técnica comercial de ELISA (*Dade-Behring, Marburg, Alemania*), en plasma obtenido a partir de sangre anticoagulada con citrato que contenía benzamidina y PPACK.

Para la determinación inmunológica de la **α_1 -antitripsina** utilizó un método de ELISA específico, que se basa en la utilización de la fracción IgG de antisuero de conejo (*Calbiochem, La Jolla CA, EEUU*). La variación intraensayo e interensayo fue inferior al 8% y al 10%, respectivamente.

La **proteína S funcional** se determinó como el grado de prolongación del tiempo de protrombina en presencia de tromboplastina bovina, iones calcio y APC, empleando un ensayo comercial (*Instrumentation Laboratory*). Los valores de la proteína S funcional se expresan como % del valor de la proteína S funcional presente en una mezcla de 28 plasmas de donantes sanos. La variación intraensayo e interensayo fue inferior al 7%. Se definió deficiencia de proteína S como el hallazgo de valores inferiores a la media menos 2 desvíos estándar en una mezcla de plasmas de donantes sanos, que en nuestro entorno correspondió a valores inferiores al 60%. Siempre se recomienda confirmar la deficiencia en una segunda determinación y, si es posible, realizar estudio familiar.

3. 7. 2. OTROS PARÁMETROS GENERALES

El **colesterol total y los triglicéridos** se determinaron con técnicas enzimáticas en un autoanalizador (*DAX Technicon, Tarrytown NY, EEUU*). Las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) se cuantificaron por espectrofotometría después de precipitación selectiva con heparina y manganeso (*DAX Technicon*). La concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) se calculó con la fórmula de Friedewald.

La **glucemia** se cuantificó por un método automático (*DAX Techicon*).

Los **niveles de proteína C reactiva** se determinaron mediante un método de alta sensibilidad por nefelometría (*Behringwerke AG, Marburg, Alemania*).

El **índice de masa corporal (IMC)** se calculó dividiendo el peso (en kilogramos) por la altura (en metros) elevada al cuadrado y se expresó en kg/m^2 .

3. 8. TÉCNICAS MOLECULARES

3. 8. 1. EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se empleó el *Wizard Genomic Purification kit* (Promega, Madison WI, EEUU) en muestras de sangre periférica anticoaguladas con EDTA. Este ensayo permite el aislamiento de ADN genómico de doble cadena a partir de diferentes tipos de muestras biológicas, más concretamente en nuestro caso a partir de los leucocitos de sangre periférica de los individuos estudiados.

Este método de purificación de ADN se basa en un proceso de cuatro pasos [311]. El primer paso consiste en la lisis específica de los eritrocitos mediante una solución que deja intactos los leucocitos. En un segundo paso, los leucocitos y su núcleo son lisados y solubilizados. En este punto del proceso puede añadirse de forma opcional un paso de degradación de ARN mediante la incubación de las muestras con una RNasa en las condiciones óptimas para su actividad. Posteriormente se eliminan, por precipitación salina, las proteínas celulares presentes como consecuencia de la previa degradación de las estructuras celulares; de esta forma los restos celulares son concentrados en el fondo del tubo mientras que el ADN genómico de elevado peso molecular permanece intacto en solución. Finalmente, este ADN genómico es concentrado y desalado mediante una precipitación con isopropanol y, tras su lavado con etanol, es resuspendido en una solución tamponada para un adecuado uso o almacenamiento.

Básicamente, el proceso de extracción fue el siguiente:

- 1) A un tubo estéril de 1,5 ml que contiene 900 µl de una solución de lisis (*Cell Lysis Solution*), se le añade una alícuota de 300 µl de la muestra de sangre total y se invierte varias veces para homogeneizarla.
- 2) Se incuba la mezcla durante 10 minutos en un agitador orbital con el fin de lisar los eritrocitos. Posteriormente se centrifuga durante 20 segundos a 13000-16000 x g.

- 3) Se elimina la mayor cantidad de sobrenadante posible dejando el pellet de leucocitos. En aquellos casos en los que el pellet parezca contener glóbulos rojos residuales o la muestra de partida haya estado congelada durante un largo periodo de tiempo, se recomienda repetir los pasos 1-3 para una máxima degradación de los eritrocitos que, de otra forma, podrían interferir negativamente en los pasos subsiguientes.
- 4) Se resuspenden completamente los leucocitos agitando vigorosamente la muestra durante 10-15 segundos.
- 5) Para disgregar los leucocitos, se añade 300 µl de una segunda solución (*Nuclei Lysis Solution*) y la mezcla se pipetea varias veces para favorecer la lisis. La solución se vuelve viscosa, y se recomienda incubarla durante 1 hora a 37°C hasta que los grumos hayan desaparecido. Si no fuera así, podría añadirse de nuevo 100 µl de la solución de lisis y repetir la incubación.
- 6) Llegados a este punto del procedimiento se puede realizar, de manera opcional, una degradación del ARN presente en la muestra mezclándola cuidadosamente con 1,5 µl de RNasa A 4 mg/ml (*Promega*) mediante incubación a 37°C durante 15 minutos. Antes de proseguir con el siguiente paso, debe atemperarse la muestra.
- 7) Para purificar el lisado nuclear deben precipitarse las proteínas que conforman los restos celulares. Para ello, se añaden 100 µl de una tercera solución (*Protein Precipitation Solution*) y la mezcla se agita vigorosamente durante 20 segundos hasta obtener grumos de proteínas en la solución.
- 8) Para separar la solución que contiene el ADN de los restos celulares, la muestra se centrifuga durante 3 minutos a 13000-16000 x g.
- 9) Se recupera el sobrenadante y se transfiere a un tubo estéril de 1,5 ml. Es fundamental recuperar la mayor parte de sobrenadante (con el ADN) que sea posible, aunque debe despreciarse un pequeño volumen del mismo que quedará como remanente junto con el pellet de proteínas. Así se evitará la contaminación de la solución de ADN con las proteínas, pues interferirían en su purificación.

- 10) Al tubo que contiene el ADN se le añaden 300 µl de isopropanol de grado molecular para favorecer la precipitación del ADN. Este objetivo se consigue incubando la muestra en un agitador orbital durante 2 minutos o hasta hacerse visible la madeja de ADN.
- 11) La muestra se centrifuga durante 1 minuto a 13000-16000 x g para recuperar el ADN en forma de un pequeño pellet blanco.
- 12) Puesto que el pellet de ADN es extremadamente lábil, debe prestarse un especial cuidado a la hora de eliminar el sobrenadante, lo cual puede realizarse por decantación o por aspiración con una pipeta Pasteur capilar. Seguidamente, se añaden 300 µl de etanol 70% y se invierte con cuidado para lavar el precipitado y las paredes del tubo. Seguidamente, la muestra se centrifuga durante 1 minuto a 13000-16000 x g.
- 13) A continuación se elimina con mucho cuidado el sobrenadante y se seca el ADN durante 10-15 minutos a temperatura ambiente colocando el tubo invertido sobre un papel secante o por aspiración en el SpeedVac.
- 14) La muestra de ADN es resuspendida con 100 µl de una cuarta solución (*DNA Rehydration Solution*: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) durante toda una noche a temperatura ambiente o a 4°C. Alternativamente la muestra puede incubarse durante 1 hora a 65°C, a ser posible con agitación periódica.

La muestra de ADN resuspendido puede almacenarse a 2-8°C hasta su utilización, o bien congelar a -20°C.

3. 8 .2. AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que permite la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN situado entre dos oligonucleótidos que sirven como cebadores para una serie de reacciones de síntesis catalizadas por la polimerasa de ADN [312]. Los cebadores específicos para cada PCR fueron proporcionados por MWG-Biotech (*Roche, Highpoint WC, EEUU*).

El protocolo original de la PCR fue inicialmente descrito por Saiki RK y col [313], Mullis K y col [314] y Mullis K y Faloona FA [315]. En él utilizaron el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* para catalizar la extensión de los cebadores. Puesto que este enzima es inactivado a las elevadas temperaturas requeridas para la desnaturalización del ADN, Saiki RK y col [316] introdujeron una ADN polimerasa termoestable purificada a partir de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa) [317], con una vida media de 40 minutos a 95°C y una temperatura óptima de 75°C. De esta manera, la reacción de reconocimiento y extensión del cebador puede llevarse a cabo a temperaturas en las que la unión del cebador a regiones no específicas es muy baja, evitando además la presencia de estructura secundaria en el ADN molde.

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. Durante el segundo paso 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.

La PCR es altamente tolerante a las impurezas de las muestras de ADN a amplificar, siempre que no contengan inhibidores de la polimerasa (urea, SDS acetato sódico...). El fragmento del tamaño a amplificar puede oscilar entre 100 y 10000 pb. La cantidad de ADN molde necesaria para la reacción es muy baja, del orden de 1 µg para ADN genómico y la concentración óptima de deoxinucleótidos

trifosfato se ha estimado en 200 μM de cada uno de ellos. La concentración de MgCl_2 en el tampón influye mucho sobre el resultado de la PCR, por ello es aconsejable realizar un ensayo previo para optimizarla.

El protocolo de PCR utilizado fue el siguiente:

- 1) Desnaturalización inicial: mediante la incubación de la muestra a elevada temperatura se separan las dobles cadenas de ADN para poder ser copiadas. Suele realizarse a 94°C durante 3 minutos, aunque puede incrementarse hasta 96°C e incluso hasta 5 minutos en moldes ricos en guanina y citosina o con alto grado de estructura secundaria, si bien hay que tener en cuenta que la Taq polimerasa expuesta a elevadas temperaturas durante intervalos prolongados pierde su actividad.
- 2) Un número de ciclos de PCR constituidos por las siguientes etapas:
 - 2.1- Desnaturalización: incubación a 95°C aproximadamente, entre 30 segundos y 1 minuto, para permitir la separación de las dobles cadenas de ADN.
 - 2.2- Hibridación: al disminuir la temperatura de la mezcla de reacción, se permite que los cebadores hibriden con su secuencia homóloga del ADN molde para la posterior elongación de los fragmentos. La temperatura de hibridación determina si las condiciones de la amplificación son permisivas (baja temperatura de hibridación) o restrictivas (alta temperatura de hibridación) condicionando la especificidad y el rendimiento de la PCR, puesto que los cebadores pueden hibridar a secuencias no complementarias dando lugar a la síntesis de fragmentos no específicos, cuya producción compite con la de los productos específicos, reduciendo el rendimiento final de la PCR. Esta temperatura debe establecerse empíricamente para cada ensayo. El paso de hibridación de cada ciclo suele durar de 30 segundos a 1 minuto.
 - 2.3- Extensión: se aumenta la temperatura de la muestra para permitir que la Taq polimerasa copie la secuencia del ADN molde incorporando detrás de los cebadores hibridados sobre el ADN los nucleótidos adecuados, generando así nuevos fragmentos. Por las características de la Taq polimerasa, la duración

óptima de la extensión de cada ciclo suele ser de 1 minuto a 72°C, pero para fragmentos de PCR más largos de 1 kb debe emplearse un tiempo de extensión de 1 minuto/kb de ADN. Esto es debido a que el número de fragmentos que se obtienen en la PCR es exponencial: el número final de copias del fragmento deseado es de 2^n , siendo n el número de ciclos. Hacia el final de la PCR la actividad de la Taq se va extinguiendo y la disponibilidad de nucleótidos y de cebadores es menor. Por ello, la extensión de tal cantidad de fragmentos costará proporcionalmente mucho más que en los ciclos iniciales y se recomienda realizar la extensión durante un periodo de tiempo más prolongado, incluso con un paso de extensión final.

- 3) Extensión final: este paso es opcional y suele realizarse a 72°C durante 4-10 minutos para permitir que todos los fragmentos que se están generando puedan ser copiados completamente. Una extensión excesivamente prolongada puede dar lugar a la obtención de bandas inespecíficas de mayor peso molecular a la banda esperada.

3. 8. 3. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO 4G/5G DEL PROMOTOR DEL GEN DEL PAI-1 MEDIANTE PCR

La técnica de PCR utilizada para genotipar el polimorfismo 4G/5G del PAI-1 se basó en la descrita por Margaglione M y col [318] con modificaciones.

Los cebadores específicos utilizados fueron los siguientes:

- Forward oligonucleotide: 5'- CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'
- Reverse oligonucleotide: 5'- CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'

Las condiciones del programa para la PCR se reflejan en la Figura 3.7.

- 1.- Desnaturalización: 95°C, 3 minutos.
- 2.- Desnaturalización: 95°C, 1 minuto.
- 3.- Hibridación: 60°C, 1 minuto.
- 4.- Extensión: 72°C, 2 minutos.
- 5.- Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 30 ciclos más.
- 6.- Extensión final: 72°C, 5 minutos.

Figura 3.7. Condiciones del programa para PCR de PAI-1

A continuación, 20 µl del producto amplificado se sometieron a digestión durante 210 minutos a 55°C con 1 U del enzima de restricción Bs1 I (*New England Biolabs, Ipswich MA, EEUU*). Después de la digestión, la muestra se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 4%, durante 40 minutos a 90 V. El resultado de la electroforesis de la digestión del fragmento amplificado del PAI-1 ofrece tres posibilidades: una única banda de 98 pb si se trata de un individuo homocigoto 4G/4G, tres bandas de 98, 77 y 22 pb si se trata de un heterocigoto 4G/5G, o bien, dos bandas de 77 y 22 pb en caso de tratarse de un sujeto homocigoto 5G/5G. La utilización de un gel de agarosa del 4% permite una adecuada separación de las bandas, a pesar de que con estas condiciones no se visualiza la banda correspondiente a 22 pb. Por lo tanto, un sujeto con el genotipo 4G/4G presenta una única banda de 98 pb, un sujeto con el genotipo 4G/5G presenta dos bandas una de 98 y otra de 77 pb, mientras que un sujeto con el genotipo 5G/5G presenta una única banda de 77 pb. Como referencia se incluyen marcadores de masa molecular, a partir de los cuales se clasifican las bandas correspondientes a las muestras problema (Figura 3.8.).

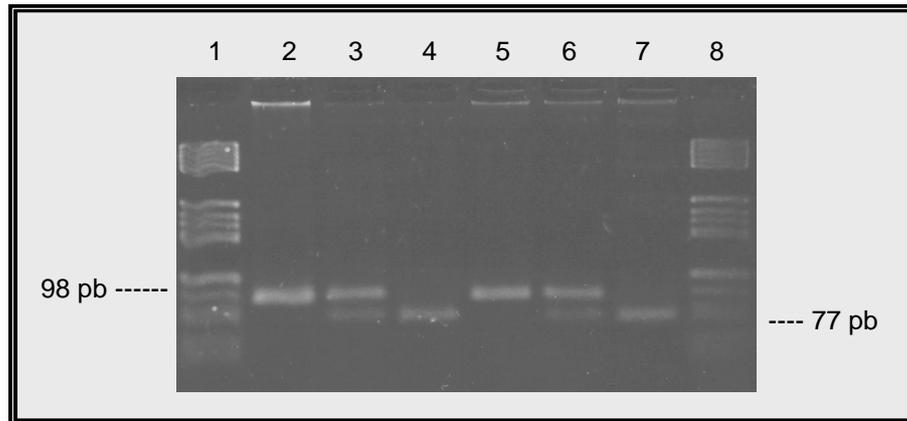


Figura 3.8. Genotipado del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1, resultado de la electroforesis en gel de agarosa. Los pocillos 2 y 5 corresponden al genotipo 4G/4G, los pocillos 3 y 6 al genotipo 4G/5G y los pocillos 4 y 7 al genotipo 5G/5G; los pocillos 1 y 8 son marcadores.

3. 8. 4. DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO C1040T DEL GEN DEL TAFI MEDIANTE PCR.

El polimorfismo C1040T del gen del TAFI se analizó por un PCR alelo-específico y digestión endonucleasa.

El par de cebadores específicos del TAFI se diseñó utilizando el análisis software específico de cebador (Oligo 4.0) y la secuencia se analizó por FASTA en la base de datos EMBL (<http://www.emblheidelberg.de/>). El par de cebadores utilizados fue el siguiente:

- Forward oligonucleotide: 5'-GCTTTGTTTCAGCATTGTCATAG-3'
- Reverse oligonucleotide: 5'-CAATTGTGATTGCCATAAAGTG-3'

La PCR del producto obtenido de 453 pb se llevó a cabo en un termociclador Eppendorff en un volumen final de 50 µl que contenía 0,5 µg de ADN genómico, 15 pmoles de cada cebador, 2.5 mM MgCl₂, 200 µM de nucleótidos, 1X PCR Buffer y 1 U Taq ADN Polimerasa (*Invitrogen, Carlstadt CA, EEUU*) (Figura 3.9).

- 1.- Desnaturalización: 95°C, 1 minuto.
- 2.- Hibridación: 60°C, 1 minuto.
- 3.- Extensión: 72°C, 2 minutos.
- 5.- Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 26 ciclos más.
- 6.- Extensión final: 72°C, 5 minutos.

Figura 3.9. Condiciones del programa para PCR de TAFI.

A continuación, 20 µl del producto amplificado se sometieron a digestión durante 3 horas a 37°C con 5 U del enzima de restricción Spe I (*New England Biolabs*) y los fragmentos obtenidos según el genotipo de cada individuo se esquematizan a continuación (Figuras 3.10 y 3.11). La utilización de un gel de agarosa del 3% permite una adecuada separación de las bandas, a pesar de que en estas condiciones las bandas de 236 y 217 pb no se separan completamente. Por lo tanto, un sujeto con el genotipo TT presenta una única banda a 453 pb, un sujeto con el genotipo CT presenta dos bandas a 453 y 236-217 pb, mientras que un sujeto con el genotipo CC presenta una única banda a 236-217 pb. Como referencia se incluyen marcadores de masa molecular, a partir de los cuales se clasifican las bandas correspondientes a las muestras problema.

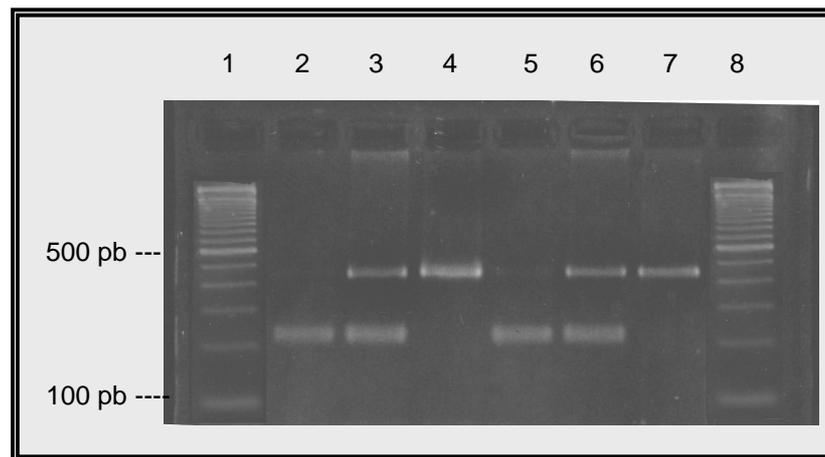


Figura 3.10. Genotipado del polimorfismo C1040T del gen del TAFI, resultado de la electroforesis en gel de agarosa. Los pocillos 2 y 5 corresponden al genotipo CC (variante Thr/Thr), los pocillos 3 y 6 al genotipo CT (variante Thr/Ile) y los pocillos 4 y 7 al genotipo TT (variante Ile/Ile); los pocillos 1 y 8 son marcadores.

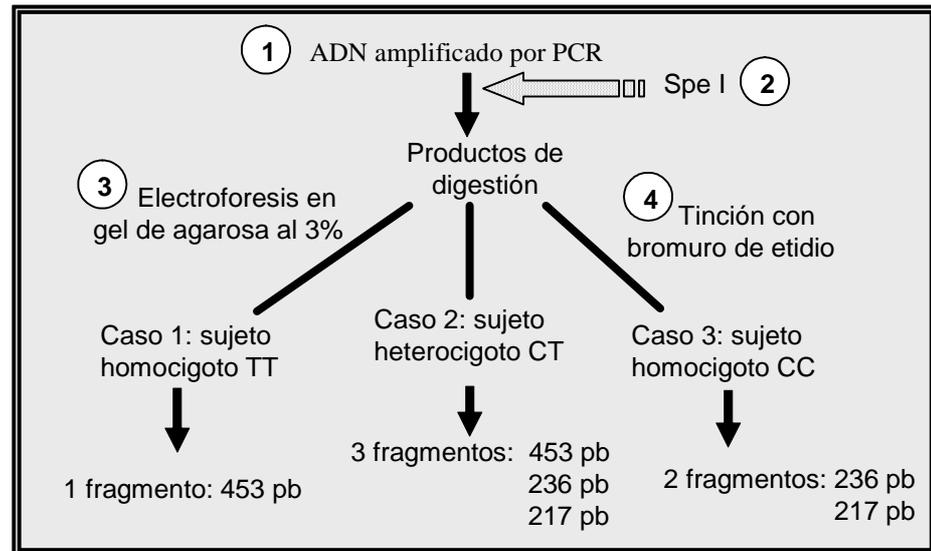


Figura 3.11. Esquema de la técnica para el genotipado del polimorfismo C1040T del gen del TAFI. Se amplifica el ADN mediante PCR (1) y el fragmento amplificado de ADN obtenido se somete a la acción de la enzima de restricción Spe I (2). Se practica una electroforesis con los fragmentos obtenidos (3) y se tiñen las franjas con bromuro de etidio (4) para visualizar los resultados. Se presentan los tamaños de los fragmentos en función del polimorfismo C1040T presente en cada sujeto. El genotipo TT corresponde a la variante Ile/Ile, el genotipo CT a la variante Thr/Ile y el genotipo CC a la variante Thr/Thr.

3. 8. 5. DETECCIÓN DEL FACTOR V LEIDEN Y DE LA MUTACIÓN G20210A DEL GEN DE LA PROTROMBINA.

El interés por el estudio del factor V Leiden y de la mutación G20210A de la protrombina se basó en su capacidad para promocionar la trombosis (por aumentar la generación de trombina) y, simultáneamente, disminuir la actividad fibrinolítica de forma indirecta (pues la trombina es el mayor activador del TAFI y de esta manera aumentaría el potencial antifibrinolítico).

La presencia del **factor V Leiden** se evaluó utilizando el kit comercial de detección LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit (*Roche Molecular Biochemicals*, Mannheim, Alemania) (Figura 3.12).

La presencia de la **mutación G20210A del gen de la protrombina** se evaluó con el kit de detección comercial LightCycler Protrombin-G20210A Mutation Detection Kit (*Roche Molecular Biochemicals*).

Los ADNs de los genotipos homocigotos (mutante y normal) y heterocigotos se amplificaron y analizaron con un LightCycler Instrument, utilizando sondas específicas para hibridación (*Roche Molecular Biochemicals*).

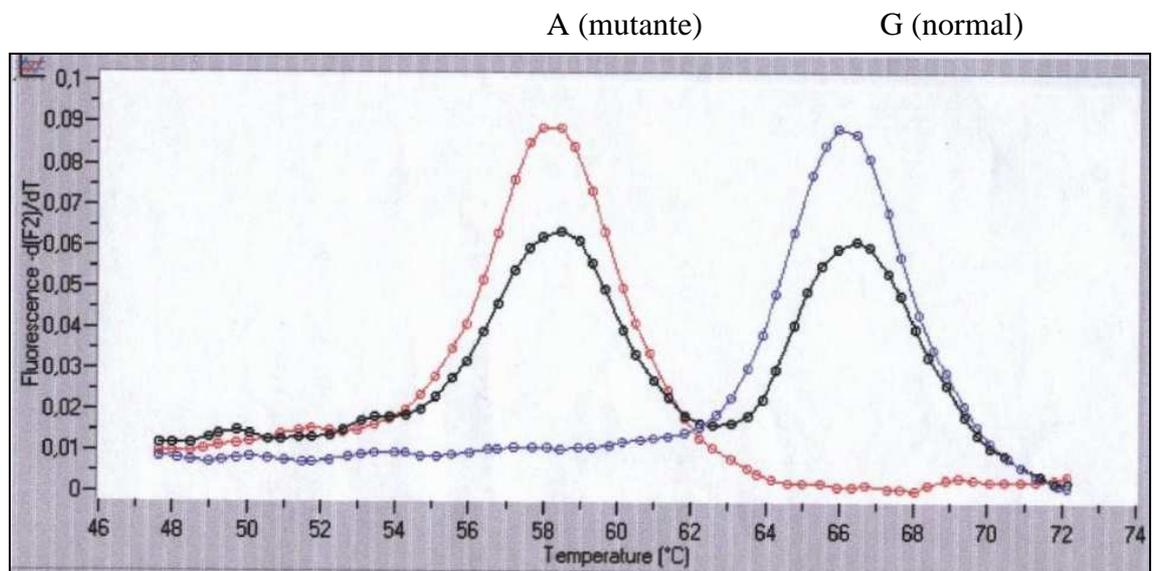


Figura 3. 12. Curva patrón de los tres posibles genotipos del factor V para la detección del factor V Leiden. La muestra representada en roja corresponde a un sujeto homocigoto para el factor V Leiden, la negra a un sujeto heterocigoto para el factor V Leiden y la azul a un individuo sin la mutación del factor V Leiden.

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS 11.5 para Windows (*SPSS Inc.*, Chicago IL, EEUU) y se consideró estadísticamente significativo un nivel de $p < 0,05$.

Se aplicó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors a las variables cuantitativas continuas. Algunas demostraron poseer distribuciones normales (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, TAFIag, TAFIfc, cociente TAFIfc/ag, PCIag, tPAag, TLE, fibrinógeno, entre otras) y sus valores se expresaron como media ± 1 desvío estándar. Para comparar las medias de estas variables cuantitativas continuas con distribución normal se utilizó el test t de Student o el test de ANOVA, según correspondiera por el número de grupos analizado. Cuando el test de ANOVA detectó diferencias significativas entre las medias, se aplicó el test de Bonferroni, Scheffé y Tukey para establecer qué grupos presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí. El estudio de correlaciones entre dos variables de este tipo se basó en el método de correlación de Pearson. En caso de no cumplir criterios de normalidad [triglicéridos, VLDL-colesterol, PAI-1ag, PAI-1fc, Lp(a), APC, proteína C reactiva, entre otros], sus valores se expresaron como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y se aplicaron tests no paramétricos, como la U de Mann-Whitney o el test de Kruskal-Wallis, según correspondiera por el número de grupos analizado. Para el análisis de correlaciones entre dos variables, de las que al menos una tenía una distribución no normal, se aplicó el método de correlación de Spearman. Determinadas variables continuas (PAI-1ag, PAI-1fc, TAFIag y TAFIfc) fueron analizadas también como variables discretas previa transformación en cuartiles según los puntos de corte correspondientes a los percentiles 25%, 50% y 75% en la distribución de controles. Igualmente, los niveles de Lp(a) se analizaron como variable dicotómica utilizando el punto de corte de 30 mg/dl para diferenciar a los sujetos con concentraciones altas [Lp(a) ≥ 30 mg/dl] o bajas [Lp(a) < 30 mg/dl], tal y como se ha venido haciendo con anterioridad en la literatura.

Para comparar variables discretas se utilizó el test de χ^2 excepto en aquellos casos en los que menos del 80% de las casillas de una tabla de 2x2 tenían valores esperados mayores de 5; entonces se aplicó el test exacto de Fisher. Fueron variables discretas los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, dislipemia, tabaquismo, diabetes mellitus y obesidad), el genotipo de PAI-1, el genotipo del TAFI, la isoforma mayoritaria de apo(a), la presencia del factor V Leiden o de la mutación G20210A de la protrombina, entre otras. En el caso de variables dicotómicas se mostraron las odds ratio (OR) obtenidas con sus correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95% y, en caso de tener que transformar una variable discreta con más de dos categorías en otra dicotómica, siempre se tomó como referencia aquella con menor riesgo a priori.

El análisis multivariante ajustó los resultados del análisis univariado según dos modelos de regresión logística. El primero (modelo 1) incluyó los llamados factores de riesgo cardiovascular, mientras que el segundo (modelo 2) incorporó además otros aspectos de interés, según la variable analizada. En el caso de variables continuas se mostraron los valores de p y se calcularon las OR para cada incremento o disminución de 1 desvío estándar en su concentración, según la variable seleccionada. En el caso de variables discretas se mostraron las OR con sus correspondientes IC 95%.

Tras dicotomizar las variables de interés, su asociación con el desarrollo de eventos trombóticos en la evolución se analizó con el test de Kaplan-Meier (Log Rank). El valor del PAI-1ag, del PAI-1fc, del TAFIag y del TAFIfc correspondiente a los percentiles 80% y 90% sirvieron como puntos de corte para analizar el efecto de los niveles altos de estas variables como predictoras de eventos trombóticos en la evolución. En cuanto a la Lp(a), se utilizó el punto de corte de 30 mg/dl para estudiar su asociación con los eventos adversos. Finalmente, se utilizó el valor de APC correspondiente al percentil 10% y al 20% como punto de corte para analizar el efecto de los niveles bajos de esta variable como predictora de eventos trombóticos en la evolución.

4.- RESULTADOS

Con el objeto de facilitar la interpretación de los resultados, se expondrán los datos obtenidos siguiendo el siguiente esquema:

4.1. Análisis descriptivo general:

- 4.1.1. Comparación entre pacientes y controles
- 4.1.2. Características específicas de los pacientes

4.2. Parámetros de la fibrinólisis y la coagulación:

- 4.2.1. Marcadores de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz.
 - 4.2.1.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo1, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina y otros
 - 4.2.1.2. Lipoproteína (a)
 - 4.2.1.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina
- 4.2.2. Marcadores de extensión y severidad de la enfermedad coronaria y/o del desarrollo de eventos en la evolución.
 - 4.2.2.4. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo1 e inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
 - 4.2.2.5. Lipoproteína (a)
 - 4.2.2.6. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina
 - 4.2.2.4. Otros parámetros: fibrinógeno y proteína C reactiva

NOTA: En general, todos los análisis utilizan como grupo de pacientes el conformado por los pacientes que completaron el protocolo con la segunda extracción en fase clínica estable (N=222). Para no perder a aquellos pacientes con peor evolución y mortalidad precoz, en los análisis genéticos se incluyeron a todos los pacientes que participaron inicialmente en el estudio con una primera extracción realizada durante la fase aguda y destinada al análisis de los aspectos genéticos de las variables seleccionadas (N=237). Los motivos por los que 15 pacientes no completaron el estudio fueron por declinar acudir a la segunda extracción (N=11) y por exitus durante los 3 primeros meses de evolución tras la inclusión (N=4).

4. 1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL

4.1.1. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES Y CONTROLES

A continuación se muestran las características clínicas más relevantes de los grupos de pacientes y controles. Tal y como se ha explicado antes, los resultados que se muestran corresponden al grupo de pacientes que completaron el protocolo (N=222). Sin embargo, interesa destacar que las comparaciones para edad, sexo y el resto de características clínicas fueron similares al tener en cuenta la totalidad de pacientes incluidos en el estudio (N=237) (datos no mostrados).

Tal y como se observa en la Tabla 4.1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y el sexo de pacientes y controles ($p=0,103$ y $p=0,799$, respectivamente). Llama la atención que los pacientes presentaron cifras de colesterol total y fraccionado (HDL-, LDL- y VLDL-colesterol) menores que los controles, lo cual se puede explicar por el uso generalizado de estatinas en primer grupo para cumplir los objetivos de prevención secundaria.

En general, la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular fue similar a la descrita en otros estudios y registros realizados en nuestro país [7,8]. Todos los factores de riesgo cardiovascular fueron significativamente más frecuentes en el grupo de pacientes que en el de controles (Tabla 4.1), con OR no ajustada de 11,5 para tabaquismo, 4,5 para hipertensión arterial, 2,2 para diabetes mellitus, 5,3 para dislipemia y 2,4 para obesidad. Las ORs ajustadas se obtuvieron del modelo de regresión logística que incluía todos estos factores de riesgo cardiovascular. Todos ellos mantuvieron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles, con ORs ajustadas similares a las no ajustadas, salvo en el caso de la diabetes mellitus (Tabla 4.1).

Factores de la coagulación y de la fibrinólisis relacionados con la cardiopatía isquémica precoz.
Resultados

	Pacientes N=222	Controles N=200	p	
Edad (años)	44,9±5,1	43,8±8,3	0,103	
Sexo (hombres/mujeres)	198/24	180/20	0,799	
Colesterol total (mMol/l)	4,92±1,00	5,55±1,00	<0,001	
HDL-colesterol (mMol/l)	1,11±0,25	1,22±0,32	0,002	
LDL-colesterol (mMol/l)	3,04±0,84	3,63±0,94	<0,001	
VLDL-colesterol (mMol/l)	0,67 (0,39-1,27)	0,62 (0,31-1,27)	0,032	
Triglicéridos (mMol/l)	1,49 (0,84-2,85)	1,21 (0,65-2,60)	<0,001	

	OR (IC 95%)			
			No ajustada	Ajustada
Tabaquismo (%)	89,2	41,7	11,5 (6,9-19,2)	12,7 (6,5-24,7)
Hipertensión arterial (%)	36,0	11,1	4,5 (2,7-7,6)	5,5 (2,3-13,1)
Diabetes mellitus (%)	18,9	9,5	2,2 (1,3-3,9)	4,9 (1,6-15,6)
Dislipemia (%)	67,1	27,6	5,3 (3,5-8,1)	3,7 (2,1-6,6)
Obesidad (%)	26,6	13,1	2,4 (1,5-4,1)	2,8 (1,2-6,5)

Tabla 4.1. Características epidemiológicas y factores de riesgo cardiovascular en los grupos de pacientes y controles. Las variables continuas con distribución normal se expresan como media \pm 1 desvío estándar y para la comparación de estas variables entre los dos grupos se ha aplicado el test t de Student para muestras independientes. Las variables continuas con distribución no normal se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y se ha aplicado el test U de Mann-Whitney para la comparación de estas variables entre los dos grupos. Las variables dicotómicas se expresan en porcentajes y se ha aplicado el test del χ^2 para la comparación de estas variables entre los dos grupos. Se proporcionan las ORs con sus respectivos IC al 95% como estimación del riesgo, de forma no ajustada y ajustada para los factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y obesidad) a partir de un modelo de regresión logística. Véase “Material y Métodos” para la definición de tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, y obesidad. N: tamaño muestral; p: significación estadística; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

4.1.2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínicas más relevantes desde el punto de vista cardiológico del grupo de pacientes se resumen en la Tabla 4.2. Destaca que el 13,9% refería historia previa de angina de pecho, el 5,5% de infarto de miocardio, el 2,9% de revascularización coronaria percutánea, el 1,7% de cirugía de bypass aortocoronario y el 14,8% de cardiopatía isquémica familiar a edad precoz, datos superponibles a los descritos en trabajos previos [12].

Pacientes (N=237)	N (%)
Claudicación intermitente	15 (6,3)
Angina previa	33 (13,9)
Infarto de miocardio previo	13 (5,5)
Revascularización coronaria percutánea previa	7 (2,9)
Revascularización coronaria quirúrgica previa	4 (1,7)
Antecedentes familiares de cardiopatía isquémica precoz	35 (14,8)

Tabla 4.2. Características clínicas de los pacientes. Cardiopatía isquémica precoz: cardiopatía isquémica en padres o hermanos con inicio en edad inferior a 51 años. N: tamaño muestral.

En cuanto a los detalles más significativos del ingreso por infarto de miocardio (Tabla 4.3), destaca que el 24,5% correspondieron a infartos sin elevación inicial del segmento ST y el 75,5% a infartos con elevación inicial del segmento ST, de los cuales el 81,0% fueron tratados con trombolisis. De los pacientes en los que se cuantificó la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (N=213), el 65,7% presentaron buena función sistólica, el 20,7% depresión ligera y el 13,6% depresión moderada-severa. La prueba de esfuerzo como test de estratificación de riesgo postinfarto estuvo de alguna manera infrautilizada en la población estudiada, ya que sólo se solicitó en el 37,1% de los pacientes, siendo además no concluyente (por no alcanzar la frecuencia cardiaca submáxima) en un porcentaje nada desdeñable (26,1%). Por último, se realizó estudio coronariográfico en el 86,5% de los pacientes, la mayoría de las veces por complicaciones en la evolución clínica o a criterio del médico responsable (por criterio de “edad”), pero no en función de un resultado positivo en la estratificación no invasiva de riesgo.

Pacientes	N (%)
Manifestación electrocardiográfica inicial (N=237)	
• IMA con elevación inicial del segmento ST	179 (75,5)
• IMA sin elevación inicial del segmento ST	58 (24,5)
Trombolisis (N=179)*	
• Sí	145 (81,0)
• No	34 (19,0)
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo (N=213)	
• Buena	140 (65,7)
• Depresión ligera	44 (20,7)
• Depresión moderada-severa	29 (13,6)
Test de Esfuerzo (N=88)	
• Negativo	47 (53,4)
• Positivo	18 (20,5)
• No concluyente	23 (26,1)
Coronariografía (N=205)	
• Presencia/ausencia de lesiones coronarias significativas:	
- presencia de lesiones significativas	29 (14,1)
- ausencia de lesiones significativas	176 (85,9)
• Número de vasos afectados	
- 0 vasos	29 (14,1)
- 1 vasos	85 (41,5)
- 2 vasos	57 (27,8)
- 3 vasos	34 (16,6)
• Severidad-extensión de la aterosclerosis coronaria	
- Aterosclerosis ausente	25 (12,2)
- Aterosclerosis leve	149 (72,7)
- Aterosclerosis grave	31 (15,1)
Revascularización coronaria durante el ingreso (N=237)	
• Intervencionismo coronario percutáneo	116 (48,9)
• Cirugía de bypass aortocoronario	26 (11,0)

Tabla 4.3. Detalles del ingreso por infarto agudo de miocardio referido al grupo de pacientes. Véase “Material y Métodos” para la definición de cada variable. N: tamaño muestral.

**El apartado de trombolisis se refiere exclusivamente al subgrupo de pacientes que debutaron con elevación inicial del segmento ST en el electrocardiograma.*

Finalmente, una vez definidos los eventos mayores en el apartado 3.1 de Material y Métodos, se analizó su incidencia en el grupo de pacientes desde el inicio de la inclusión (septiembre de 2000) hasta septiembre de 2005 (periodo de seguimiento de $30,7 \pm 24,3$ meses) (Tabla 4.4). Se registraron 8 exitus en total, 7 de causa trombótica (6 por síndrome coronario agudo y 1 por accidente vascular cerebral) y 1 por rotura de un aneurisma de aorta abdominal. De los 6 exitus por síndrome coronario agudo, 5 de ellos sucedieron durante el ingreso inicial por infarto agudo de miocardio (mortalidad intrahospitalaria 2,1%). En cuanto a los reingresos de causa trombótica, se registraron 56, la mayoría de ellos (53) por síndrome coronario agudo (45 por angina inestable y 8 por reinfarto no fatal) (Tabla 4.4).

Pacientes y eventos	N (%)
Exitus (N=237)	
• Sí	8 (3,4)
- Trombótico	7 (2,9)
<i>Síndrome coronario agudo</i>	6 (2,5)
<i>Accidente vascular cerebral</i>	1 (0,4)
- No trombótico*	1 (0,4)
• No	229 (96,6)
Reingreso trombótico (N=229) [‡]	
• Sí	56 (24,4)
<i>Síndrome coronario agudo</i>	53 (23,1)
<i>Accidente vascular cerebral</i>	3 (1,3)
• No	173 (75,5)
Evento combinado (N=237)	
• Sí	63 (26,6)
• No	174 (73,4)

Tabla 4.4. Eventos al final del seguimiento en el grupo de pacientes. Evento trombótico (en cursiva): exitus, reingreso y combinado de exitus y/o reingreso de causa trombótica. N: tamaño muestral.

*Un paciente falleció por rotura de un aneurisma de aorta abdominal.

[‡]El apartado de reingresos trombóticos se refiere a aquellos pacientes que no fallecieron en la evolución.

El análisis univariado posterior (Kaplan Meier, Log Rank) comprobó que ninguno de los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo y obesidad) se asoció de forma significativa al desarrollo de eventos, aunque la diabetes mellitus presentó una tendencia no estadísticamente significativa con el evento combinado (exitus y/o reingreso trombótico) ($p=0,088$). La presencia de depresión moderada-severa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo se asoció significativamente con el exitus trombótico ($p=0,001$), pero no con los otros eventos analizados. Finalmente, del resto de variables clínicas (sexo masculino, no revascularización coronaria en el ingreso inicial, presencia de lesiones coronarias significativas, enfermedad de tres vasos y aterosclerosis coronaria difusa) ninguna se asoció significativamente a cualquiera de los tres eventos (Tabla 4.5).

Pacientes N=237	Exitus trombótico (N=7) p	Reingreso trombótico (N=56) p	Evento combinado (N=63) p
Sexo masculino	0,905	0,904	0,895
Tabaquismo	0,754	0,639	0,788
Hipertensión arterial	0,665	0,640	0,543
Diabetes mellitus	0,101	0,214	0,088
Dislipemia	0,582	0,303	0,405
Obesidad	0,190	0,264	0,352
Depresión moderada-severa de la de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo	0,001	0,286	0,914
Presencia de lesiones coronarias significativas	0,386	0,995	0,906
Enfermedad de tres vasos	0,200	0,613	0,466
Aterosclerosis coronaria difusa	0,829	0,102	0,137
Revascularización coronaria durante el ingreso	0,992	0,885	0,899

Tabla 4.5. Análisis univariado de los eventos al final del seguimiento: asociación con los factores de riesgo y con determinadas variables clínicas en el grupo de pacientes. Evento combinado: exitus y/o reingreso de causa trombótica. El valor de p se ha obtenido a partir del test de Kaplan-Meier, Log Rank. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

4. 2. PARÁMETROS DE LA FIBRINOLISIS Y LA COAGULACIÓN

Los parámetros seleccionados del sistema de la coagulación y de la fibrinólisis se analizaron desde dos puntos de vista, como marcadores de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz (apartado 4.2.1) y como marcadores de la extensión-severidad de la enfermedad coronaria así como del desarrollo de eventos en la evolución (apartado 4.2.2). Se valoraron las características genéticamente determinadas y los niveles plasmáticos de las variables seleccionadas.

4. 2. 1. MARCADORES DE RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO A EDAD PRECOZ

Para estimar la posible relación de las variables seleccionadas con el desarrollo de infarto de miocardio a edad precoz, analizamos los grupos de pacientes y controles. A continuación se desarrollan cada uno de los apartados que engloban a las variables seleccionadas.

4.2.1.1. SISTEMA FIBRINOLÍTICO: INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1, INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA Y OTROS

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

En la Tabla 4.6 se muestra la distribución de los diferentes genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 (4G/4G, 4G/5G y 5G/5G). Tanto en el grupo de pacientes como en el de controles los genotipos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg^{IV}.

^{IV} En un modelo de herencia codominante la distribución de los genotipos (aa, ab, bb) de un polimorfismo con 2 alelos (a, b) se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, siempre que la población sea grande, no esté sometida a mutación o selección y los sujetos elijan pareja al azar. Siendo p la frecuencia del alelo a y q la del alelo b, en el equilibrio de Hardy-Weinberg la frecuencia de los genotipos aa, ab y bb es p^2 , $2pq$ y q^2 , respectivamente, puesto que $p^2+2pq+q^2=1$ y $p+q=1$. Si la hipótesis nula que afirma que las frecuencias esperadas (E_i) son similares a observadas (O_i), una población está en equilibrio de Hardy-Weinberg si tras comparar las E_i con O_i se obtiene un valor de χ^2 [$\chi^2 = ([O_{aa}-E_{aa}]^2/E_{aa}) + ([O_{ab}-E_{ab}]^2/E_{ab}) + ([O_{bb}-E_{bb}]^2/E_{bb})$] mayor al valor de χ^2 establecido para los grados de libertad (n° de genotipos posibles-1) y nivel de probabilidad oportunos. Para 2 grados de libertad (como es este caso) la hipótesis nula se descarta con valores de $\chi^2 > 6,0$, pues implican $p < 0,05$ de que sea cierta. Puesto que en controles $\chi^2 = 0,4$ y pacientes $\chi^2 = 2,3$, no puede descartarse la hipótesis nula en ningún caso (es decir, en ambos grupos la herencia del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 sigue el modelo de la herencia codominante).

La distribución del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 fue diferente en pacientes y controles ($p=0,005$) (Figura 4.1). Tomando el genotipo 5G/5G como grupo de referencia (subgrupo de menor riesgo), se calcularon las ORs (como estimación de riesgo de cardiopatía isquémica precoz) que supone la presencia de un genotipo 4G/5G, por un lado, y 4G/4G, por el otro (Tabla 4.6). Ambas circunstancias incrementaron el riesgo en torno a 2 veces de forma significativa (Tabla 4.6). Al analizar la presencia/ausencia del alelo 4G en pacientes y controles, se encontraron diferencias significativas a favor de una mayor presencia del alelo 4G en los pacientes (OR no ajustada 2,0 IC 95% 1,3-3,1) (Tabla 4.6 y Figura 4.2.).

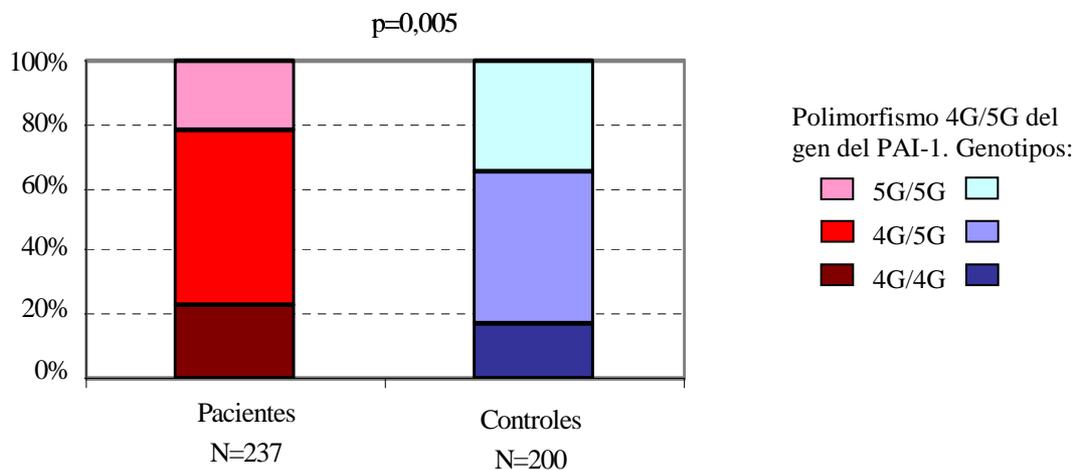


Figura 4.1. Comparación entre pacientes y controles basada en la distribución de genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 . N : tamaño muestral; p : significación estadística.

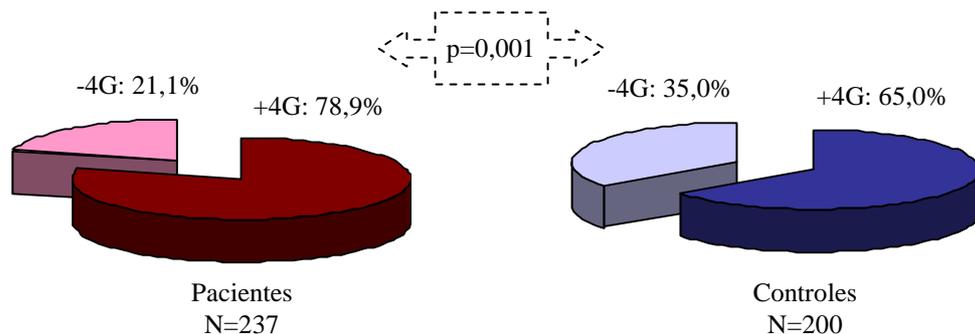


Figura 4.2. Comparación basada en la presencia o ausencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 . N : tamaño muestral; p : significación estadística; +4G: presencia del alelo 4G; -4G: ausencia del alelo 4G.

También se estudiaron las diferencias entre pacientes y controles en función del genotipo analizando las frecuencias alélicas de los alelos 4G y 5G^V. Los pacientes presentaron una frecuencia alélica del 4G mayor que los controles ($p=0,005$) (Tabla 4.6). Finalmente, se ajustaron estos resultados con un modelo de regresión logística que incluyó los factores de riesgo cardiovascular, es decir, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y obesidad. En este modelo, las ORs asociadas a los genotipos 4G/5G y 4G/4G se mantuvieron ligeramente por encima de 2,0, siempre con diferencias estadísticamente significativas. Igualmente, la presencia del alelo 4G mantuvo una OR ajustada de 2,0, también estadísticamente significativa (Tabla 4.6).

Objeto del análisis	Pacientes N=237	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada
Genotipos, N (%):				
• 5G/5G	50 (21,1)	70 (35,0)	1*	1*
• 4G/5G	132 (55,7)	94 (47,0)	2,0 (1,3-3,0)	2,3 (1,3-4,1)
• 4G/4G	55 (23,2)	36 (18,0)	2,1 (1,2-3,6)	2,3 (1,1-4,7)
Alelo 4G, N (%):				
• Ausencia de 4G	50 (21,1)	70 (35,0)	1*	1*
• Presencia de 4G	187 (78,9)	130 (65,0)	2,0 (1,3-3,1)	2,0 (1,2-3,5)
Frecuencia alélica ^ψ :				
• FA(5G)	0,49	0,59	-	-
• FA(4G)	0,51	0,41	-	-

Tabla 4.6. Comparación entre pacientes y controles basada en el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. Las ORs se han calculado a partir modelos de regresión logística que incluían la variable de interés para la OR no ajustada y la anterior más los factores de riesgo cardiovascular para la OR ajustada, siempre tomando como grupo de referencia el de menor riesgo a priori (el genotipo 5G/5G en el primer análisis y la ausencia del alelo 4G en el segundo). FA: frecuencia alélica; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; N: tamaño muestral; p: significación estadística.

* Grupo de referencia con menor riesgo a priori.

^ψ Test de χ^2 con $p=0,005$.

^V Las frecuencias alélicas (FA) se calculan de la siguiente manera:

$$FA(5G) = (N_{4G/5G} + 2 \times N_{5G/5G}) / (2 \times N)$$

$$FA(4G) = (N_{4G/5G} + 2 \times N_{4G/4G}) / (2 \times N)$$

Siendo en cada grupo clínico $N_{4G/5G}$, $N_{5G/5G}$ y $N_{4G/4G}$ el número de sujetos con genotipo 4G/5G, 5G/5G y 4G/4G, respectivamente y N el número de sujetos total.

Los pacientes presentaron niveles significativamente mayores de PAI-1ag y PAI-1fc en comparación con los controles (p no ajustada <0,001 en ambos casos) (Tabla 4.7). Estos resultados se ajustaron para todos los factores de riesgo cardiovascular en dos modelos de regresión logística, es decir, hipertensión arterial, tabaquismo, dislipemia, diabetes mellitus y obesidad (modelo 1) y para los anteriores más la presencia del alelo 4G (modelo 2) (Tabla 4.7). Con cada incremento en la concentración de PAI-1ag de 12,1 ng/ml (correspondiente a 1 desvío estándar en la distribución de los controles), la OR aumentó un 70% en el modelo no ajustado, un 40% en el modelo 1 y un 30% en el modelo 2, siempre manteniendo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en el caso del PAI-1fc, con cada incremento de 13,0 U/ml (correspondiente a 1 desvío estándar en la distribución de los controles) la OR no ajustada aumentó 60%, aunque en el análisis multivariante disminuyó y perdió la significación estadística (OR ajustada 1,1 y 1,0, según modelo 1 y 2, respectivamente) (Tabla 4.7).

	Pacientes N=222	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
PAI-1ag (ng/ml) [#]	25,5 (13,3-56,9)	19,0 (7,0-37,0)	1,7 (1,4-2,1)	1,4 (1,0-1,7)	1,3 (1,0-1,7)
PAI-1fc (U/ml) ^ψ	20,2 (4,0-34,0)	12,4 (0,0-32,7)	1,6 (1,3-2,1)	1,1 (0,8-1,4)	1,0 (0,8-1,3)

Tabla 4.7. Comparación de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc (analizadas como variables continuas) en pacientes y controles. Los valores de PAI-1 se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%). Las ORs que se muestran reflejan el incremento del riesgo con cada aumento en la concentración de PAI-1ag o PAI-1fc equivalente a 1 desvío estándar en controles (PAI-1ag 12,1 ng/ml y PAI-1fc 13,0 U/ml). Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la variable de interés (PAI-1ag o PAI-1fc); en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y en el caso de la OR ajustada modelo con el 2, los anteriores más la presencia del alelo 4G. N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; p: significación estadística.

[#]Los valores de p para el PAI-1ag fueron p <0,001, p=0,006 y p=0,016 según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

^ψ Los valores de p para el PAI-1fc fueron p <0,001, p=0,578 y p=0,904 según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

La variable PAI-1ag se transformó en una variable discreta con cuatro valores posibles (1^{er} cuartil, 2^o cuartil, 3^{er} cuartil y 4^o cuartil) teniendo en cuenta los puntos de corte del percentil 25%, 50% y 75% de la distribución de esta variable en el grupo control, de forma que los rangos de los cuartiles fueron <11,2 ng/ml para el 1^{er} cuartil, 11,2-19,0 ng/ml para el 2^o cuartil, 19,1-28,8 ng/ml para el 3^{er} cuartil y ≥28,9 ng/ml para el 4^o cuartil. Se compararon las distribuciones de los pacientes y los controles en base a los cuartiles de PAI-1ag, tomándose siempre como grupo de referencia el cuartil de menor riesgo (1^{er} cuartil). Se calculó la OR no ajustada (como estimación de riesgo de cardiopatía isquémica precoz que supone estar en cuartiles superiores al 1^{er} cuartil) (Tabla 4.8). Se procedió igualmente con la variable PAI-1fc, con rangos de los cuartiles de <3,7 U/ml para el 1^{er} cuartil, 3,7-11,4 U/ml para el 2^o cuartil, 11,5-21,9 U/ml para el 3^{er} cuartil y ≥22,0 U/ml para el 4^o cuartil. Se compararon las distribuciones de los pacientes y los controles en base a los cuartiles de PAI-1fc, tomándose siempre como grupo de referencia el cuartil de menor riesgo (1^{er} cuartil). Se calculó la OR no ajustada (como estimación de riesgo de cardiopatía isquémica precoz que supone estar en cuartiles superiores al 1^{er} cuartil) (Tabla 4.8). En el caso del PAI-1ag, se observó un incremento progresivo en el riesgo a medida que aumentaba su concentración (ORs no ajustadas 3,2, 4,6 y 6,9 al comparar el 1^{er} cuartil con los cuartiles 2^o, 3^o y 4^o, respectivamente). La comparación de los cuartiles de PAI-1fc también mostró un incremento progresivo del riesgo en el análisis no ajustado, con diferencias significativas en los cuartiles más extremos (1^{er} cuartil con 3^{er} cuartil y 1^{er} cuartil con 4^o cuartil) (Tabla 4.8).

Los resultados anteriormente expuestos se ajustaron con modelos de regresión logística similares a los utilizados cuando las variables PAI-1ag y PAI-1fc se analizaron como variables continuas (Tabla 4.8). En el caso del PAI-1ag, en los dos modelos de análisis multivariante se mantuvieron estadísticamente significativas las diferencias entre pacientes y controles, si bien se perdió la progresión de las ORs observadas en el análisis no ajustado a medida que se comparaban los cuartiles de forma creciente. Sin embargo, en el caso del PAI-1fc se redujeron las ORs y se perdió la significación estadística al comparar pacientes y controles en los dos modelos de regresión logística empleados (Tabla 4.8).

Cuartiles	Pacientes N=222 N (%)	Controles N=200 N (%)	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
PAI-1 ag:					
• 1º: <11,2 ng/ml	14 (6,3)	50 (25,0)	1*	1*	1*
• 2º: 11,2-19,0 ng/ml	47 (21,2)	52 (26,0)	3,2 (1,5-6,5)	3,8 (1,5-9,6)	3,2 (1,2-8,3)
• 3º: 19,1-28,8 ng/ml	63 (28,4)	48 (24,0)	4,6 (2,3-9,3)	4,9 (1,8-12,8)	4,7 (1,8-12,6)
• 4º: ≥28,9 ng/ml	98 (44,1)	50 (25,0)	6,9 (3,5-13,8)	4,0 (1,6-10,0)	3,2 (1,2-8,3)
PAI-1 fc:					
• 1º: <3,7 U/ml	18 (8,1)	49 (24,5)	1*	1*	1*
• 2º: 3,7-11,4 U/ml	34 (15,3)	49 (24,5)	1,8 (0,9-3,7)	1,1 (0,4-2,5)	2,0 (0,4-2,4)
• 3º: 11,5-21,9 U/ml	76 (34,2)	51 (26,5)	4,1 (2,1-7,7)	2,2 (0,9-5,2)	2,0 (0,8-4,8)
• 4º: ≥22,0 U/ml	94 (42,4)	51 (26,5)	5,0 (2,6-9,5)	1,5 (0,6-3,5)	1,2 (0,5-2-8)

Tabla 4.8. Resultados de la comparación de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc (analizadas como variables discretas) entre pacientes y controles. Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la variable de interés (un determinado cuartil de PAI-1ag o PAI-1fc en comparación con el cuartil de referencia, 1^{er} cuartil); en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y en el caso de la OR ajustada con el modelo 2, los anteriores más la presencia del alelo 4G. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza. N: tamaño muestral.

*Grupo de referencia con menor riesgo a priori.

Los niveles de PAI-1ag y de PAI-1fc fueron superiores en el grupo de pacientes que en el de controles, independientemente del polimorfismo 4G/5G (Tabla 4.9). Igualmente, tanto en presencia como en ausencia del alelo 4G, los pacientes presentaron niveles mayores de PAI-1ag y PAI-1fc que los controles (Tabla 4.9).

Dentro del grupo de pacientes, los niveles de PAI-1ag y de PAI-1fc no mostraron diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo ni en función de la presencia/ausencia del alelo 4G (Tabla 4.9). En cambio, en el grupo de controles se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de PAI-1ag cuando fueron analizados en función del genotipo ($p=0,032$) y en función de la presencia del alelo 4G ($p=0,010$) (Tabla 4.9).

Comparación por	Pacientes (N=222)			Controles (N=200)			Pacientes versus controles, p	
	N	PAI-1ag	PAI-1fc	N	PAI-1ag	PAI-1fc	PAI-1ag	PAI-1fc
Genotipos:								
• 5G/5G	49	26,1 (14,6-57,7)	20,5 (0,0-34,5)	70	15,0 (6,0-34,6)	9,5 (0,0-29,3)	<0,0001	0,013
• 4G/5G	119	24,5 (12,0-56,8)	18,70 (3,7-33,6)	94	22,0 (8,5-40,4)	16,5 (0,1-33,0)	<0,0001	0,002
• 4G/4G	54	26,5 (13,5-56,4)	27,3 (5,7-36,6)	36	20,0 (6,2-38,0)	14,1 (0,0-37,0)	<0,0001	<0,0001
p		0,905	0,177		0,032	0,165		
Alelo 4G:								
• Ausencia de 4G	49	26,0 (14,9-57,6)	20,5 (0,0-34,5)	70	15,0 (6,0-34,6)	9,5 (0,0-29,3)	<0,0001	0,013
• Presencia de 4G	173	26,2 (13,5-56,0)	20,0 (4,0-34,0)	130	21,2 (8,4-39,3)	16,0 (0,0-33,6)	<0,0001	<0,0001
p		0,775	0,976		0,010	0,074		

Tabla 4.9. Comparación de niveles de PAI-1 entre pacientes y controles basada en el genotipo y en la presencia/ausencia del alelo 4G del gen del PAI-1. Los valores de PAI-1 se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%). Unidades de PAI-1ag: ng/ml; PAI-1fc: U/ml. Para la comparación de niveles de PAI-1 entre pacientes y controles y en función de la presencia/ausencia del alelo 4G en cada grupo se ha utilizado el test U de Mann-Whitney. Dentro de cada grupo, la comparación de los niveles de PAI-1 en función del genotipo se ha realizado con el test de Kurskal-Wallis. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

La distribución del polimorfismo C1040T (variante Thr325Ile) del gen del TAFI fue similar en pacientes y controles ($p=0,384$) (Figura 4.3). En la Tabla 4.10 se muestra la distribución de los diferentes genotipos de este polimorfismo (genotipo CC que corresponde a la variante Thr/Thr, genotipo CT que corresponde a la variante Thr/Ile y genotipo TT que corresponde a la variante Ile/Ile). Este polimorfismo se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg^{VI}, tanto en el grupo de pacientes como en el de controles. Tomando el genotipo CC como grupo de referencia (subgrupo de

^{VI} Véase nota al pie de la página 103. Puesto que en controles $\chi^2=0,8$ y pacientes $\chi^2=0,2$, no puede descartarse la hipótesis nula en ningún caso (es decir, en ambos grupos la herencia del polimorfismo C1040T sigue el modelo de la herencia codominante).

menor riesgo a la luz de los datos publicados en la literatura), se calculó la OR que supone la presencia de un genotipo CT, por un lado, y un genotipo TT, por el otro.

Ninguna de estas circunstancias incrementó el riesgo de padecer cardiopatía isquémica precoz (ORs no ajustadas no significativas) (Tabla 4.10). Al analizar la presencia/ausencia del alelo T en pacientes y controles, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles ($p=0,920$) (Tabla 4.10 y Figura 4.4). Paralelamente, una vez calculadas las frecuencias alélicas de los alelos C y T, se observó una distribución similar en los dos grupos, pacientes y controles ($p=0,604$) (Tabla 4.10). Finalmente, se ajustaron estos valores con un modelo de regresión logística que incluyó la presencia de los factores de riesgo cardiovascular, es decir, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y obesidad, sin observarse cambios relevantes respecto al análisis no ajustado (Tabla 4.10).

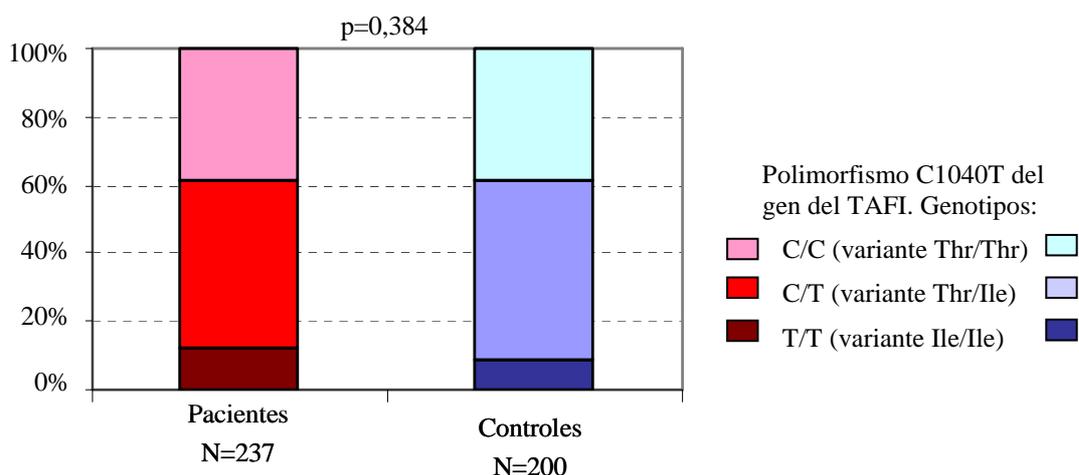


Figura 4.3. Comparación entre pacientes y controles basada en la distribución de genotipos del polimorfismo C1040T del gen del TAFI. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 . N: tamaño muestral; p : significación estadística.

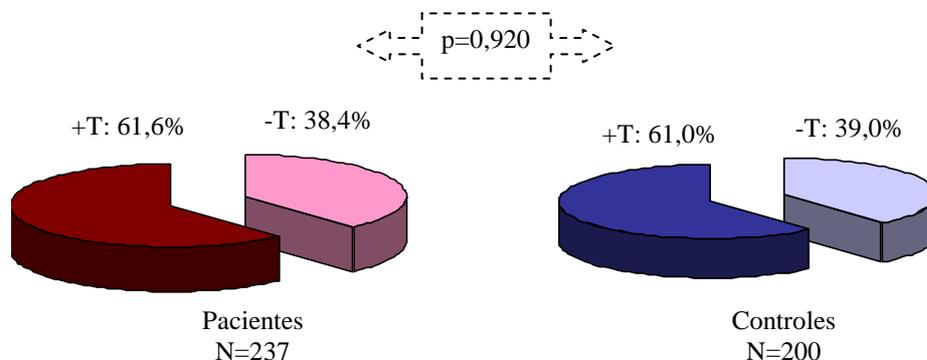


Figura 4.4. Comparación basada en la presencia o ausencia del alelo T del polimorfismo C1040T del gen del TAFI. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 . +T: presencia del alelo T; -T: ausencia del alelo T; N: tamaño muestral; p : significación estadística.

Tipo de análisis	Pacientes N=237	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada
Genotipos, N (%):				
• CC (variante Thr/Thr)	91 (38,4)	78 (39,0)	1*	1*
• CT (variante Thr/Ile)	117 (49,4)	104 (52,0)	1,0 (0,6-1,4)	1,0 (0,6-1,7)
• TT (variante Ile/Ile)	29 (12,2)	18 (9,0)	1,3 (0,7-2,6)	1,6 (0,7-3,8)
Alelo T, N (%):				
• Ausencia de T	91 (38,4)	78 (39,0)	1*	1*
• Presencia de T	146 (61,6)	122 (61,0)	1,0 (0,7-1,5)	0,9 (0,5-1,6)
Frecuencia alélica ^Ψ :				
• FA(C)	0,63	0,65	-	-
• FA(T)	0,37	0,35	-	-

Tabla 4.10. Comparación entre pacientes y controles basada en el polimorfismo C1040T del gen del TAFI (variante Thr325Ile). Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística incluían la variable de interés para la OR no ajustada y la anterior más los factores de riesgo cardiovascular para la OR ajustada, siempre tomando como grupo de referencia el grupo de menor riesgo a priori (el genotipo CC en el análisis por genotipos y la ausencia del alelo T en el segundo análisis). FA: frecuencia alélica; N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

*Grupo de referencia con menor riesgo a priori.

^ΨTest de χ^2 con $p=0,604$.

En el análisis no ajustado (Tabla 4.11), los niveles de TAFIag fueron similares en pacientes y en controles ($p=0,791$), mientras que los niveles de TAFIfc y el cociente TAFIfc/TAFIag fueron significativamente mayores en los pacientes en comparación con los controles. En sendos modelos de regresión logística se ajustaron estos resultados para todos los factores de riesgo cardiovascular, es decir, hipertensión arterial, tabaquismo, dislipemia, diabetes mellitus y obesidad (modelo 1) y para los anteriores más la presencia del alelo T (modelo 2) (Tabla 4.11). En ambos modelos ajustados, siguieron sin observarse diferencias significativas entre pacientes y controles. Sin embargo, las diferencias de niveles de TAFIfc y del cociente TAFIfc/TAFIag entre estos grupos se mantuvieron estadísticamente significativas (Tabla 4.11). Con cada aumento en la concentración de TAFIfc de 1,8 $\mu\text{g/ml}$ (correspondiente a 1 desvío estándar en la concentración de controles), la OR aumentó un 130%, un 210% y un 220%, según el modelo no ajustado, ajustado modelo 1 y modelo 2, respectivamente, siempre con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.11). Finalmente, con cada incremento de 0,28 en el cociente TAFIfc/TAFIag (correspondiente a 1 desvío estándar en la concentración de

controles), la OR aumentó un 60%, un 70% y un 110%, según el modelo no ajustado, ajustadas modelo 1 y modelo 2, respectivamente, de nuevo con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.11).

	Pacientes N=222	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
TAFIag (%) [#]	101±30	100±28	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,8-1,3)	1,0 (0,7-1,4)
TAFIfc (µg/ml) [*]	12,0±2,3	10,4±1,8	2,3 (1,6-3,3)	3,1 (1,8-5,5)	3,2 (1,8-5,5)
TAFIfc/ag x 10 ^Ψ	1,29±0,35	1,12±0,28	1,6 (1,2-2,2)	1,7 (1,2-2,3)	2,1 (1,4-3,2)

Tabla 4.11. Comparación de los niveles de TAFI (analizadas como variables continuas) en pacientes y controles. Los valores de TAFI se expresan como media ± 1 desvío estándar. Las ORs que se muestran reflejan el incremento del riesgo con cada aumento en la concentración de TAFIag, TAFIfc o cociente TAFIag/TAFIfc equivalente a 1 desvío estándar en controles (TAFIag 28,0%, TAFIfc 1,8 µg/ml y cociente TAFIag/TAFIfc 0,28). Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la variable de interés (TAFIag, TAFIfc o cociente TAFIfc/TAFIag); en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y en el caso de la OR ajustada modelo con el 2, los anteriores más la presencia del alelo T. N: tamaño muestral; p: significación estadística; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

[#] Los valores de p para el TAFIag fueron p=0,811, p=0,917 y p=0,815 según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

^{*} Los valores de p para el TAFIfc fueron p<0,001, p<0,001 y p<0,001 según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

^Ψ Los valores de p para el cociente TAFIag/TAFIfc fueron p<0,001, p=0,003 y p<0,001 según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

La variable TAFIag se transformó en una variable discreta con cuatro valores posibles (1^{er} cuartil, 2^o cuartil, 3^{er} cuartil y 4^o cuartil) teniendo en cuenta los puntos de corte del percentil 25%, 50% y 75% de su distribución en controles, siendo los rangos de los cuartiles: 1^{er} cuartil <81,2 ng/ml, 2^o cuartil 81,2-97,3%, 3^{er} cuartil 97,4-115,0 % y 4^o cuartil ≥115,1 %. Se compararon los grupos de pacientes y controles en base a estos cuartiles, tomándose siempre como grupo de referencia el cuartil de menor riesgo (1^{er} cuartil). Se calcularon las ORs no ajustadas (como estimación de riesgo de cardiopatía isquémica precoz que supone estar en cuartiles superiores al 1^{er} cuartil) (Tabla 4.12). Se procedió igualmente con la variable TAFIfc, siendo los rangos de los

cuartiles: 1^{er} cuartil <9,4 µg/ml, 2^o cuartil 9,5-10,4 µg/ml, 3^{er} cuartil 10,5-11,7 µg/ml y 4^o cuartil ≥11,8 µg/ml. Se compararon los grupos de pacientes y controles en base a estos cuartiles, siendo el grupo de referencia el cuartil de menor riesgo (1^{er} cuartil). En la Tabla 4.12 se muestran las ORs no ajustadas (como estimación de riesgo de cardiopatía isquémica precoz que supone estar en cuartiles superiores al 1^{er} cuartil). Al igual que sucedía con el TAFIag (como variable continua), no hubo incrementos significativos del riesgo al aumentar la concentración de TAFIag por cuartiles. Sin embargo, paralelamente a lo sucedido con el TAFIfc (como variable continua), las ORs no ajustadas se incrementaron al aumentar su concentración por cuartiles (Tabla 4.12).

Los resultados anteriores se ajustaron en modelos de regresión logística similares a los utilizados para las variables TAFIag y TAFIfc como variables continuas (Tabla 4.12). De nuevo, no se encontraron diferencias entre pacientes y controles en los distintos cuartiles de TAFIag. Ahora bien, los cuartiles de TAFIfc mantuvieron el patrón creciente de OR que se observó previamente en el análisis no ajustado, con ORs mayores y estadísticamente significativas en los cuartiles 3^o y 4^o (Tabla 4.12).

Cuartiles	Pacientes N=222 N (%)	Controles N=200 N (%)	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
TAFIag:					
• 1 ^o : <81,2 %	61 (27,5)	50 (25,0)	1*	1*	1*
• 2 ^o : 81,2-97,3 %	53 (23,9)	50 (25,0)	0,8 (0,5-1,6)	0,9 (0,4-2,0)	1,0 (0,4-2,2)
• 3 ^o : 97,4-115,0 %	48 (21,6)	52 (26,0)	0,7 (0,4-1,4)	0,7 (0,3-1,6)	0,7 (0,3-1,8)
• 4 ^o : ≥115,1 %	60 (27,0)	48 (24,0)	1,0 (0,5-1,9)	1,0 (0,5-2,2)	1,0 (0,4-2,8)
TAFIfc:					
• 1 ^o : <9,5 µg/ml	18 (8,1)	49 (24,5)	1*	1*	1*
• 2 ^o : 9,5-10,4 µg/ml	27 (12,2)	56 (28,0)	1,3 (0,5-3,5)	1,1 (0,3-3,6)	1,0 (0,3-3,4)
• 3 ^o : 10,5-11,7 µg/ml	73 (32,9)	46 (23,0)	4,3 (1,7-10,8)	4,1 (1,5-38,0)	6,6 (1,8-24,3)
• 4 ^o : ≥11,8 µg/ml	104 (46,8)	49 (24,5)	4,3 (3,0-10,8)	6,6 (1,8-24,2)	6,6 (1,8-24,3)

Tabla 4.12. Comparación de los niveles de TAFIag y TAFIfc (analizadas como variables discretas) entre pacientes y controles. Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la variable de interés (un determinado cuartil de TAFIag o TAFIfc en comparación con el cuartil de referencia, 1^{er} cuartil); en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y en el caso de la OR ajustada con el modelo 2, los anteriores más la presencia del alelo T. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza. N: tamaño muestral.
 *Grupo de referencia con menor riesgo a priori.

En relación al polimorfismo C1040T del gen del TAFI, en la literatura se ha apuntado que la presencia del genotipo TT (variante Ile/Ile) se asocia con concentraciones de TAFIag ligeramente reducidas y niveles de TAFIfc incrementados. Por este motivo se analizaron los niveles de TAFIag y TAFIfc en los dos grupos (pacientes y controles) en relación al genotipo y a la presencia del alelo T (Tabla 4.13). Para cualquier genotipo, así como para la presencia/ausencia del alelo T, se cumplió que los pacientes presentaban concentraciones de TAFIfc superiores a las de los controles (Tabla 4.13). Los niveles de TAFIag no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles al ser analizados por genotipos o en base a la presencia/ausencia del alelo T (Tabla 4.13). En consecuencia, el cociente TAFIfc/TAFIag tendió a ser mayor en los pacientes que en los controles, con diferencias significativas sólo en los genotipos CC (variante Thr/Thr) y CT (variante Thr/Ile) (Tabla 4.13).

Analizados en detalle los niveles de TAFI en función del genotipo, se comprobó que los niveles de TAFIag fueron progresivamente menores en los sujetos con CC, CT y TT, tanto en pacientes como en controles (Tabla 4.13), con análisis post-hoc (Bonferroni, Scheffe y Tukey) que mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto entre CC y CT ($p < 0,001$ en los tres análisis), como entre C/T y T/T ($p < 0,001$ en los tres análisis) y entre CC y TT ($p = 0,020$, $p = 0,025$ y $p = 0,018$, respectivamente). Igualmente, la presencia del alelo T se asoció con menores niveles de TAFIag tanto en pacientes como en controles (Tabla 4.13). Sin embargo, los niveles de TAFIfc no mostraron diferencias estadísticamente significativas en función del genotipo, ni en el grupo de pacientes ni en el de controles (Tabla 4.13).

En el grupo de pacientes los niveles de TAFIfc se correlacionaron significativamente con el TLE (correlación de Pearson $r = 0,206$ $p = 0,003$) y con el PAI-1ag (correlación de Spearman $r = 0,162$, $p = 0,020$) pero no con la actividad del PCI (correlación de Spearman $r = 0,066$ $p = 0,346$).

Comparación por	Pacientes (N=222)				Controles (N=200)				Pacientes vs controles p		
	N	TAFI _{ag}	fc	fc/ag	N	TAFI _{ag}	fc	fc/ag	TAFI _{ag}	fc	fc/ag
Genotipos:											
● CC	86	119±26	12,4±2,7	1,08±0,24	78	116±24	11,1±1,6	0,97±0,17	0,445	<0,001	0,001
● CT	109	94,2±25,8	11,8±2,1	1,38±0,28	104	94,3±25,9	9,99±1,90	1,12±0,21	0,978	<0,001	<0,001
● TT	27	73,2±20,2	11,2±1,3	1,72±0,44	18	68,6±19,5	10,6±1,3	1,59±0,39	0,456	0,112	0,321
p		<0,001	0,175	<0,001		<0,001	0,060	<0,001			
Alelo T:											
● Ausencia T	86	119±26	12,4±2,7	1,07±0,24	78	115±23	11,1±1,6	0,97±0,17	0,503	0,027	0,060
● Presencia T	136	90,3±26,1	11,7±2,0	1,44±0,34	122	91,4±26,4	10,1±1,8	1,89±0,29	0,769	<0,001	<0,001
p		<0,001	0,098	<0,001		<0,001	0,026	<0,001			

Tabla 4.13. Comparación de niveles de TAFI entre pacientes y controles basada en el genotipo y en la presencia/ausencia del alelo T del polimorfismo C1040T del gen del TAFI. Los valores de TAFI se expresan como media \pm 1 desvío estándar. Para la comparación de los niveles de TAFI entre pacientes y controles y en función de la presencia/ausencia del alelo T en cada grupo se ha empleado el test t de Student para muestras independientes. Para la comparación en cada grupo de los niveles de TAFI en función del genotipo se ha empleado un ANOVA. Genotipo CC: variante Thr/Th; genotipo CT: variante Thr/Ile; genotipo TT: variante Ile/Ile; ag: antigénico; fc: funcional. Unidades de: TAFI_{ag}, %; TAFI_{fc}, μ g/ml; TAFI_{fc/ag} x10. N: tamaño muestral. p: significación estadística.

Otros parámetros fibrinolíticos

La evaluación global del sistema fibrinolítico en pacientes y controles se muestra en la Figura 4.5.

Los pacientes presentaron una reducción del potencial fibrinolítico reflejado en una prolongación del TLE ($p < 0,001$). En el grupo de controles el TLE se correlacionó positivamente con el PAI-1_{ag}, el PAI-1_{fc}, el fibrinógeno y los triglicéridos (correlación de Spearman, $p < 0,001$). Por ello se construyó un modelo de regresión logística ajustado para estas variables en el que el TLE mantuvo las diferencias entre pacientes y controles ($p = 0,029$). Así, con cada incremento de 1 desvío estándar en el TLE (74,36 minutos) la OR aumentó un 130% y un 60%, según el modelo no ajustado y el ajustado, respectivamente. También el fibrinógeno, uno de los determinantes principales del TLE, fue significativamente mayor en el

grupo de pacientes ($p < 0,001$). De entre los factores de riesgo cardiovascular, los niveles de fibrinógeno fueron significativamente mayores en presencia de hipertensión arterial y de tabaquismo ($p = 0,016$ y $p = 0,001$, respectivamente). En el modelo multivariante ajustado para estos factores, los niveles de fibrinógeno siguieron siendo significativamente mayores en el grupo de pacientes ($p = 0,003$). Así, con cada incremento de 1 desvío estándar en la concentración de fibrinógeno (71 mg/dl) la OR aumentó 120% y un 90%, según el modelo no ajustado y el ajustado, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en cuanto al tPAag al comparar su concentración en pacientes y controles ($p = 0,315$).

Tal y como se ha comentado previamente, otros parámetros directamente relacionados con el potencial antifibrinolítico, como las concentraciones de PAI-1ag, PAI-1fc y TAFIfc, fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles ($p < 0,001$). En sus respectivos apartados se muestran análisis más detallados en relación a estas variables.

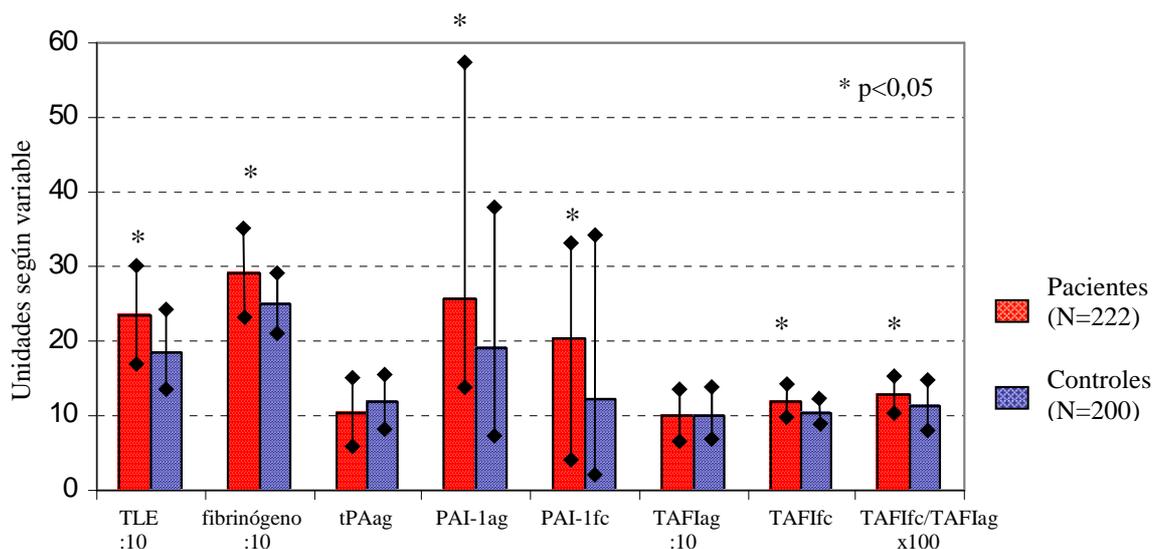


Figura 4.5. Análisis del sistema fibrinolítico en pacientes y controles. En el caso de variables sin distribución normal (PAI-1ag y PAI-1fc) las barras representan la mediana y las líneas acotan el rango (percentil 10%-percentil 90%). En el resto de variables con distribución normal las barras representan medias y las líneas señalan 1 desvío estándar por encima y por debajo de ellas. Unidades (en ocasiones ajustadas $\times 100$ ó $:10$): TLE, minutos; fibrinógeno, g/l; tPAag, ng/ml; PAI-1ag, ng/ml; PAI-1fc, U/ml; TAFIag, %; TAFIfc, $\mu\text{g/ml}$; N: tamaño muestral; p: significación estadística.

*Diferencias estadísticamente significativas (véase valor de p en el texto) con el test t de Student para muestras independientes para las variables con distribución normal y con el test U de Mann-Whitney para las variables sin distribución normal.

4.2.1.2. LIPOPROTEÍNA (a)

El estudio de las isoformas mayoritarias de apo(a) con el test de χ^2 verificó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las prevalencias de las isoformas de bajo peso molecular de apo(a) de pacientes y controles ($p < 0,001$) (Figura 4.6), con una frecuencia mayor de las isoformas de bajo peso molecular (isoformas B, S1 y S2) en los pacientes. La presencia de una isoforma de apo(a) de bajo peso molecular supuso una OR no ajustada de 2,4 como marcador de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz (Tabla 4.14). Finalmente, tras ajustar estos valores con un modelo de regresión logística que incluyó la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia y obesidad) no se observaron diferencias relevantes respecto a la OR observada en el análisis no ajustado (Tabla 4.14).

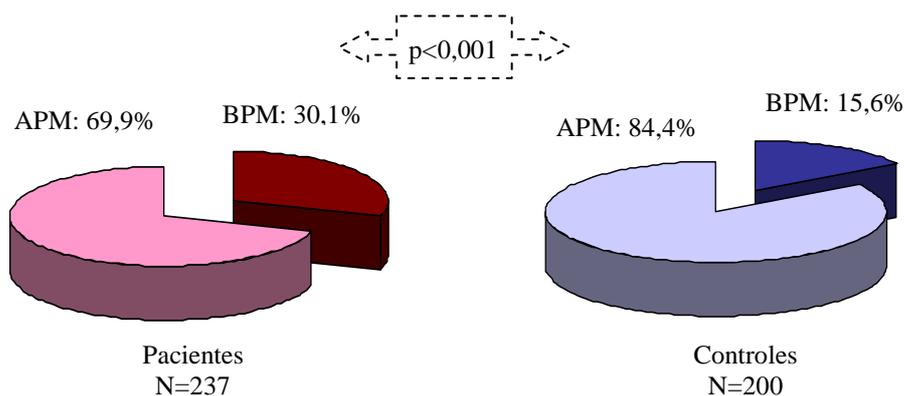


Figura 4.6. Comparación de prevalencias de isoformas de bajo peso molecular como isoforma mayoritaria de apo(a) entre pacientes y controles. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 . APM: isoforma mayoritaria de apo(a) de alto peso molecular; BPM: isoforma mayoritaria de apo(a) de bajo peso molecular; N: tamaño muestral; p : significación estadística.

	Pacientes N=237	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada
Apo(a) de bajo peso molecular, N (%)	73 (30,1)	31 (15,6)	2,4 (1,5-3,9)	2,2 (1,2-4-1)

Tabla 4.14. Comparación de la prevalencia de la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular como isoforma mayoritaria en pacientes y controles. Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística que incluían la isoforma mayoritaria de apo(a) para la OR no ajustada y la anterior más los factores de riesgo cardiovascular para la OR ajustada. N: tamaño muestral. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza.

Por lo que respecta a los niveles de Lp(a), los pacientes presentaron concentraciones plasmáticas mayores que los controles, al tener en cuenta tanto la Lp(a) analizada como variable continua ($p < 0,001$) como la Lp(a) analizada como variable dicotómica (niveles ≥ 30 mg/dl o < 30 mg/dl) ($p < 0,001$) (Tabla 4.15).

Se construyeron dos modelos de regresión logística que incluyeron la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (modelo 1) y los anteriores más isoforma mayoritaria de apo(a) (modelo 2) (Tabla 4.15). En ambos modelos se mantuvieron significativas las diferencias de niveles de Lp(a) entre pacientes y controles, tanto como variable continua y como variable discreta (p ajustada $\leq 0,001$ en ambos casos), con una ligera reducción de la OR asociada a los niveles altos de Lp(a) (Tabla 4.15). Así, cada incremento en la concentración de Lp(a) de 10,8 mg/dl (1 desvío estándar en la distribución de controles), incrementó la OR de forma invariable en el análisis no ajustado y en el multivariante cerca de un 50% (OR no ajustada 1,6 y OR ajustada con el modelo 1 1,5 y con el modelo 2 1,6), con diferencias significativas (Tabla 4.15). Cuando la Lp(a) se valoró como variable dicotómica, la OR disminuyó ligeramente en el análisis multivariante (OR no ajustada 4,6 y ORs ajustadas 3,8 y 3,1 según modelo 1 y 2, respectivamente) (Tabla 4.15).

	Pacientes N=222	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
Niveles Lp(a) (mg/dl) *	13,2 (1,0-48,7)	6,0 (0,4-26,5)	1,6 (1,4-1,9)	1,5 (1,2-1,9)	1,6 (1,2-2,0)
Niveles Lp(a) ≥ 30 mg/dl, N (%)	63 (26,6)	15 (7,5)	4,6 (2,5-8,4)	3,8 (1,8-7,7)	3,1 (1,3-8,1)

Tabla 4.15. Comparación de niveles de Lp(a) (analizada como variable continua y dicotómica) entre pacientes y controles. Los niveles de Lp(a) como variable continua se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y sus ORs muestran el incremento del riesgo para cada aumento en su concentración equivalente a 1 desvío estándar en controles (10,8 mg/dl). Las ORs con sus respectivos IC 95% se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la variable de interés [Lp(a) o Lp(a) ≥ 30 mg/dl]; en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y en el caso de la OR ajustada modelo con el 2, los anteriores más la presencia de la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular. N: tamaño muestral; p: significación estadística; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

*Los valores de p para la Lp(a) como variable continua fueron $p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p = 0,001$ según los modelos no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

También se analizó la relación entre la concentración de Lp(a) y la isoforma mayoritaria de apo(a) en pacientes y controles. Para cualquiera de las dos isoformas mayoritarias analizadas, la concentración de Lp(a) fue siempre significativamente mayor en el grupo de pacientes que en el de controles (pacientes versus controles con isoforma de alto peso molecular $p=0,001$, pacientes versus controles con isoforma de bajo peso molecular $p<0,001$) (Figura 4.7). Tanto dentro del grupo de pacientes como en el controles, aquellos individuos con isoforma de apo(a) de bajo peso molecular presentaron niveles de Lp(a) mayores que los que tenían isoformas de alto peso molecular ($p<0,001$) (Figura 4.7).

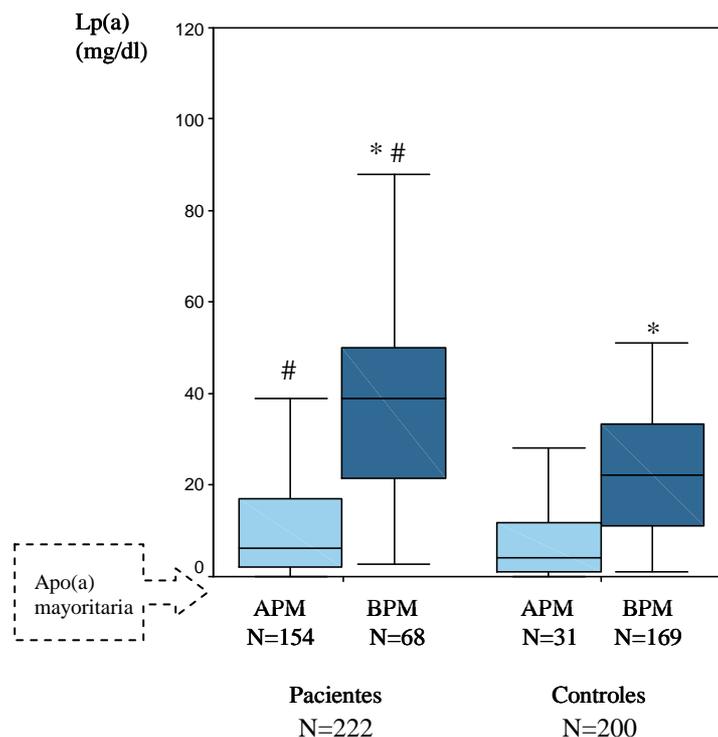


Figura 4.7. Análisis comparativo de isoformas mayoritarias de apo(a) y niveles de Lp(a) entre pacientes y controles. Las cajas representan la concentración de Lp(a) desde el percentil 25% hasta el percentil 75% y la línea que atraviesa cada una de ellas es su mediana. APM: isoforma mayoritaria de apo(a) de alto peso molecular; BPM: isoforma mayoritaria de apo(a) de bajo peso molecular; N: tamaño muestra; p: significación estadística.

* $p<0,05$, BPM versus APM en pacientes y en controles.

$p<0,05$, pacientes versus controles en presencia de APM y de BPM.

Se analizó comparativamente el peso que confería una concentración de Lp(a) ≥ 30 mg/dl y la presencia de isoformas de apo(a) de bajo peso molecular y se observó un mayor riesgo en presencia de niveles elevados (Tabla 4.16).

	Pacientes N=222 N (%)	Controles N=200 N (%)	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1
Lp(a) <30 mg/dl y apo(a) de APM	139 (62,6)	166 (83,0)	1*	1*
Lp(a) <30 mg/dl y apo(a) de BPM	47 (21,2)	12 (6,0)	1,4 (0,7-2,6)	1,5 (0,7-3,6)
Lp(a) ≥ 30 mg/dl y apo(a) de APM	14 (6,3)	3 (1,5)	5,5 (1,5-19,5)	5,3 (1,1-24,9)
Lp(a) ≥ 30 mg/dl y apo(a) de BPM	22 (9,9)	19 (9,5)	4,6 (2,4-9,0)	3,6 (1,6-8,4)

Tabla 4.16. ORs conferidas por los niveles y las isoformas mayoritarias de apo(a), comparación entre pacientes y controles. Las ORs con sus respectivos IC 95% se han obtenido de modelos de regresión logística: en el caso de la OR no ajustada incluía solamente la combinación de variables de interés y en el caso de la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular. N: tamaño muestral; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; apo(a): isoforma mayoritaria de apolipoproteína (a); APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

*Grupo de referencia con menor riesgo a priori.

Finalmente, aunque se admite que los niveles de Lp(a) están genéticamente determinados, algunos autores han descrito que la aspirina y las estatinas pueden reducirlos en cierta medida (véase Introducción). Por ello, se compararon los niveles de Lp(a) de aquellos pacientes que seguían tratamiento con estatina (N=158) con respecto a los que no tomaban este tipo de hipolipemiente (N=64), así como los niveles de Lp(a) de los pacientes con aspirina (N=199) con respecto a los que no llevaban este fármaco (N=23, 21 con otros antiagregantes y 2 de ellos no antiagregados por indicación temporal de su odontólogo). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,120$) en cuanto al tratamiento con estatinas (mediana 15,0 mg/dl y rango 1,2-50,0 mg/dl versus 10,9 y 0,9-39,8 mg/dl, respectivamente) aunque sí se observaron niveles menores de Lp(a) ($p=0,042$) en aquellos pacientes en tratamiento con aspirina (mediana 12,0 mg/dl y rango 1,0-45,0 mg/dl) en comparación con aquellos que no seguían este tratamiento (mediana 19,5 mg/dl y rango 2,6-56,4 mg/dl).

4.2.1.3. SISTEMA DE LA COAGULACIÓN: PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE, FACTOR V LEIDEN Y MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA

Proteína C activada circulante

Los niveles de APC en pacientes fueron significativamente menores que en controles, tal y como queda representado en la Figura 4.8.

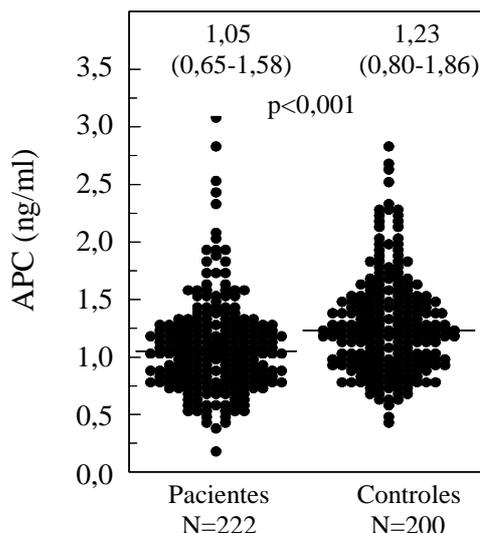


Figura 4.8. Niveles de APC en pacientes y controles. Sobre cada distribución se muestra su mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y las líneas horizontales que las atraviesan representan su mediana. APC: Proteína C activada circulante; N: tamaño muestral; p: significación estadística.

Se observó una asociación inversamente proporcional entre la APC y la presencia de cardiopatía isquémica a edad precoz, pues con cada disminución de 1 desvío estándar (0,43 ng/ml), la OR se incrementó un 60% en el modelo no ajustado ($p < 0,001$) (Tabla 4.17). Se construyeron dos modelos ajustados de regresión logística como en apartados previos (Tabla 4.17). El modelo 1 incluyó los factores clásicos de riesgo cardiovascular y el modelo 2, los anteriores más todos aquellos que fisiopatológicamente pudieran estar asociados simultáneamente con los niveles de APC y la cardiopatía isquémica, como fueron los niveles de fibrinógeno, de proteína C reactiva, del fragmento 1+2 de la protrombina o los defectos trombofílicos (Tabla 4.18). Con cada disminución de 1 desvío estándar en el nivel de APC (0,43 ng/ml) la OR aumentó un 30% de forma significativa en el modelo 1 aunque, la incorporación de nuevas variables en el modelo 2, supuso una mayor reducción de la OR y la pérdida de la significación estadística (Tabla 4.17).

A continuación, la variable APC se transformó en una variable discreta, siguiendo el esquema empleado para otros parámetros. Para ello, los sujetos participantes en el estudio fueron agrupados en cuartiles, tomando como punto de corte los percentiles 25%, 50% y 75% de la distribución de APC del grupo control. Así, los cuartiles quedaron establecidos en: 1^{er} cuartil APC <0,96 ng/ml, 2^o cuartil 0,96-1,22 ng/ml, 3^{er} cuartil 1,23-1,51 ng/ml y 4^o cuartil $\geq 1,51$ ng/ml. De esta manera se calcularon las ORs de cada cuartil en relación al cuartil de referencia de menor riesgo (4^o cuartil) (Tabla 4.17), siendo destacable que la OR para los individuos situados en el 1^{er} cuartil fue 3,6 (IC 95% 2,1-6,2), con una p para la tendencia entre cuartiles de 0,005. Estos resultados se ajustaron con los 2 modelos de regresión logística empleados previamente (Tabla 4.17). En los modelos ajustados se redujeron ligeramente las ORs para cada cuartil de APC, manteniendo una progresión creciente con concentraciones menores de APC (Tabla 4.17).

	Pacientes N=222	Controles N=200	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
APC (ng/ml)*	1,05 (0,65-1,58)	1,23 (0,80-1,86)	1,6 (1,3-2,0)	1,3 (1,0-1,7)	1,2 (0,9-1,6)
Cuartiles APC N (%):					
1 ^o : <0,96 ng/ml	91 (41,0)	48 (24,0)	3,6 (2,1-6,2)	2,2 (1,1-4,2)	1,7 (0,8-3,5)
2 ^o : 0,96-1,22 ng/ml	63 (28,4)	49 (24,5)	2,4 (1,3-4,2)	1,7 (0,8-3,5)	1,5 (0,7-3,3)
3 ^o : 1,23-1,51 ng/ml	40 (18,0)	48 (24,0)	1,6 (0,9-2,9)	1,3 (0,6-2,7)	1,1 (0,4-2,5)
4 ^o : $\geq 1,51$ ng/ml	28 (12,6)	55 (27,5)	1 ^ψ	1 ^ψ	1 ^ψ

Tabla 4.17. Comparación de niveles de APC (como variable continua y como variable discreta) entre pacientes y controles. Los niveles de APC como variable continua se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y sus ORs reflejan el incremento del riesgo con cada disminución en su concentración de 1 desvío estándar en controles (0,43 ng/ml). Las ORs se han obtenido de modelos de regresión logística: para la OR no ajustada incluyó solamente la variable de interés (APC o cuartiles); para la OR ajustada con el modelo 1, la anterior más los factores de riesgo cardiovascular; y para la OR ajustada modelo con el 2, los anteriores más los niveles de fibrinógeno, de proteína C reactiva, del fragmento 1+2 de la protrombina, de la proteína C antigénica y la presencia de defectos trombofílicos. N: tamaño muestral; p: significación estadística; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza.

*Los valores de p para la APC fueron $p < 0,001$, $p = 0,018$ y $p = 0,106$ según los modelos no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2, respectivamente.

^ψGrupo de referencia con menor riesgo a priori.

	Pacientes	Controles	p
Factor V Leiden, N (%) *	4 (1,7)	4 (2,0)	1,000
Protrombina G20210A, N (%) *	8 (3,4)	8 (4,0)	0,801
Deficiencia de proteína C, N (%) ^Ψ	1 (0,4)	0 (0,0)	1,000
Deficiencia de proteína S, N (%) ^Ψ	1 (0,4)	2 (1,0)	0,605

Tabla 4.18. Defectos trombofílicos, pacientes y controles. Del test exacto de Fisher se obtuvo el valor de p. El tamaño muestral del grupo de controles fue de 200. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

* El grupo de pacientes constó de 237 porque su diagnóstico de hizo en la primera extracción de sangre.

^Ψ El grupo de pacientes constó de 222 porque su diagnóstico de hizo en la segunda extracción de sangre.

Se analizaron otras variables, directa o indirectamente relacionadas con el sistema de la proteína C (Tabla 4.19). Los niveles de fibrinógeno (ya comentados) y de proteína C reactiva, marcadores de inflamación, fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles ($p < 0,001$). Por el contrario, la concentración de proteína C antigénica resultó similar en ambos grupos ($p = 0,261$) y se correlacionó positivamente con la de APC en el grupo de controles (correlación de Spearman, $r = 0,244$, $p < 0,001$). El PCI y la α_1 -antitripsina, inhibidores de la APC, presentaron niveles más altos en pacientes ($p < 0,001$). En ellos, se observó una correlación positiva muy débil entre las concentraciones de APC y de PCI pero, en ningún caso, correlaciones negativas entre los niveles de los inhibidores y los de APC (correlación de Spearman APC y PCI, $r = 0,138$ $p = 0,037$ y APC y α_1 -antitripsina, $r = 0,019$ $p = 0,776$). Además, la concentración de sus complejos (APC:PCI y APC: α_1 -antitripsina) fue menor en los pacientes que en los controles ($p = 0,005$ y $p = 0,006$, respectivamente) y el nivel del fragmento 1+2, marcador de la generación de trombina, fue mayor en los pacientes ($p = 0,024$).

En el grupo control se analizó la relación de los niveles de APC con los factores de riesgo cardiovascular, el fibrinógeno, la proteína C reactiva, el PCI, la α_1 -antitripsina, el APC:PCI, el APC: α_1 -antitripsina, el fragmento 1+2 de la protrombina, la presencia del factor V Leiden, de la mutación G20210A de la protrombina, de deficiencia de proteína C y de proteína S. Sólo el tabaquismo (U de Mann-Whitney, $p = 0,012$), los niveles de proteína C reactiva (correlación de Spearman, $r = -0,269$ $p < 0,001$) y la presencia de deficiencia de proteína C (U de Mann-Whitney, $p = 0,032$) presentaron en el grupo de controles una asociación

negativa y significativa con la concentración de APC que no se corroboró en el grupo de pacientes.

	Pacientes N=222	Controles N=200	p
Fibrinógeno (mg/ml)	287±71	260±46	<0,001
Proteína C reactiva (mg/l)	1,8 (0,4-5,8)	1,2 (0,4-3,3)	<0,001
Proteína C antigénica (%)	105,0 (84,0-125,0)	102,0 (85,0-126,0)	0,261
PCI funcional (%)	114±18	108±17	<0,001
α ₁ -AT (%)	115±22	108±20	<0,001
APC:PCI (ng/ml)	0,36 (0,10-0,78)	0,45 (0,12-0,98)	0,005
APC:α ₁ -AT (ng/ml)	7,4±2,6	8,1±2,6	0,006
F 1+2 (Mmol)	0,93±0,51	0,84±0,25	0,024

Tabla 4.19. Variables directa o indirectamente relacionadas con el sistema de la proteína C, comparación entre pacientes y controles. Las variables continuas con distribución normal se expresan como media ± 1 desvío estándar y la comparación entre grupos se ha efectuado con el test t de Student. Las variables continuas sin distribución normal se expresan como mediana y rango (percentil 10%-percentil 90%) y la comparación entre grupos se ha efectuado con el test de U de Mann-Whitney. Las variables dicotómicas, expresadas como número de casos y porcentajes, se han comparado con el test de χ^2 . PCI: inhibidor de la proteína C; α₁-AT: α₁-antitripsina; APC: proteína C activada circulante; F 1+2: fragmento 1+2 de la protrombina; N: tamaño muestral; p: significación estadística.

Finalmente, dadas las interrelaciones entre APC e inflamación (véase Introducción) se compararon los niveles de APC de aquellos pacientes que seguían tratamiento con estatinas (N=158) con respecto a los que no tomaban este tipo de hipolipemiente (N=64), así como los niveles de APC de los pacientes con aspirina (N=199) con respecto a los que no llevaban este fármaco (N=23). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,765) en cuanto al tratamiento con estatinas (mediana 1,06 ng/ml y rango 0,66-1,57 ng/ml versus 1,05 y 0,62-1,60 ng/ml, respectivamente) ni tampoco (p=0,571) en relación al tratamiento con aspirina (mediana 1,07 ng/ml y rango 0,66-1,60 ng/ml versus 1,04 y 0,56-1,30 ng/ml, respectivamente).

Factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina

Ambas mutaciones, del factor V Leiden (Figura 4.9) y protrombina G20210A (Figura 4.10), presentaron prevalencias similares en ambos grupos (pacientes y controles) ($p=1,000$ y $p=0,801$, respectivamente).

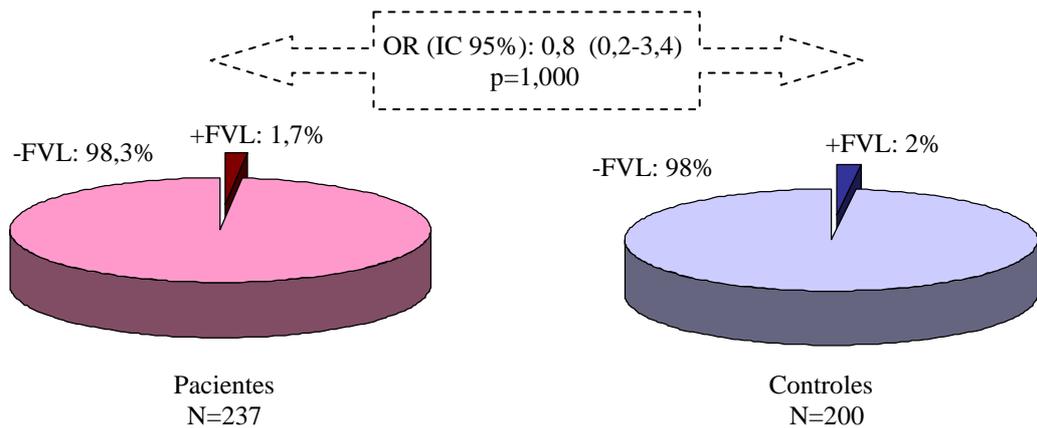


Figura 4.9. Representación de prevalencias del factor V Leiden en pacientes y controles. El valor de p se ha obtenido del test exacto de Fisher. +FVL: presencia del factor V Leiden; -FVL: ausencia del factor V Leiden; N: tamaño muestral; p : significación estadística.

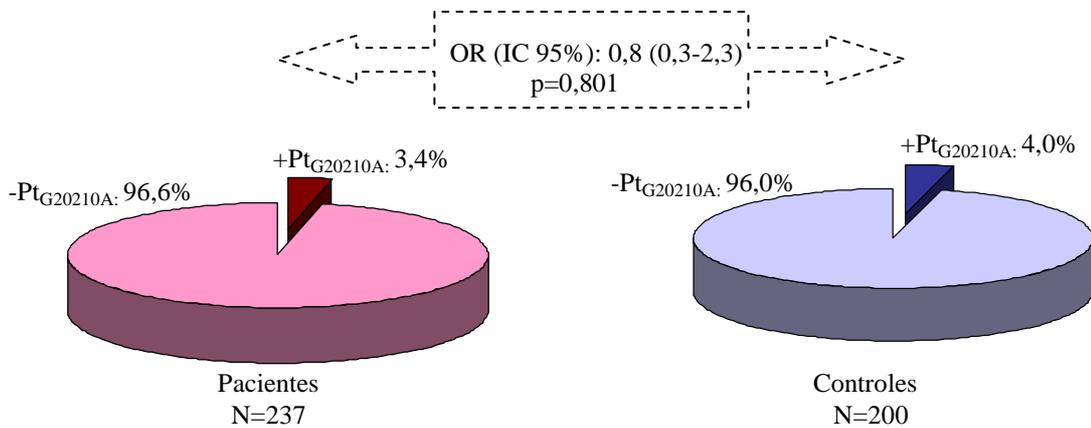


Figura 4.10. Representación de prevalencias de la mutación G20210A del gen de la protrombina en pacientes y controles. El valor de p se ha obtenido del test exacto de Fisher. +Pt_{G20210A}: presencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina; -Pt_{G20210A}: ausencia de la mutación G20210A del gen de la protrombina; N: tamaño muestral; p : significación estadística.

4. 2. 2. MARCADORES DE EXTENSIÓN Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD CORONARIA Y/O DEL DESARROLLO DE EVENTOS EN LA EVOLUCIÓN

En este apartado, el estudio se centró en el grupo de pacientes jóvenes supervivientes de un primer infarto de miocardio a edad precoz. En ellos se analizó la posible relación de las variables seleccionadas con la extensión y severidad de las lesiones coronarias en primer lugar y con el desarrollo de eventos en la evolución posteriormente.

Siguiendo el orden del apartado 4.2.1, a continuación se desarrollan cada uno de las secciones que engloban a las variables seleccionadas.

4.2.2.1. SISTEMA FIBRINOLÍTICO: INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO-1 E INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA.

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

El alelo 4G se distribuyó uniformemente en todos los grupos según las tres valoraciones de la coronariografía (presencia de lesiones significativas, número de territorios coronarios afectados y extensión-severidad de las estenosis ateroscleróticas) (Figura 4.11). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar estas variables en función del genotipo, 5G/5G, 5G/4G o 4G/4G (datos no mostrados). En definitiva, no se objetivó un perfil desfavorable en presencia del alelo 4G ni en presencia del genotipo 4G/4G.

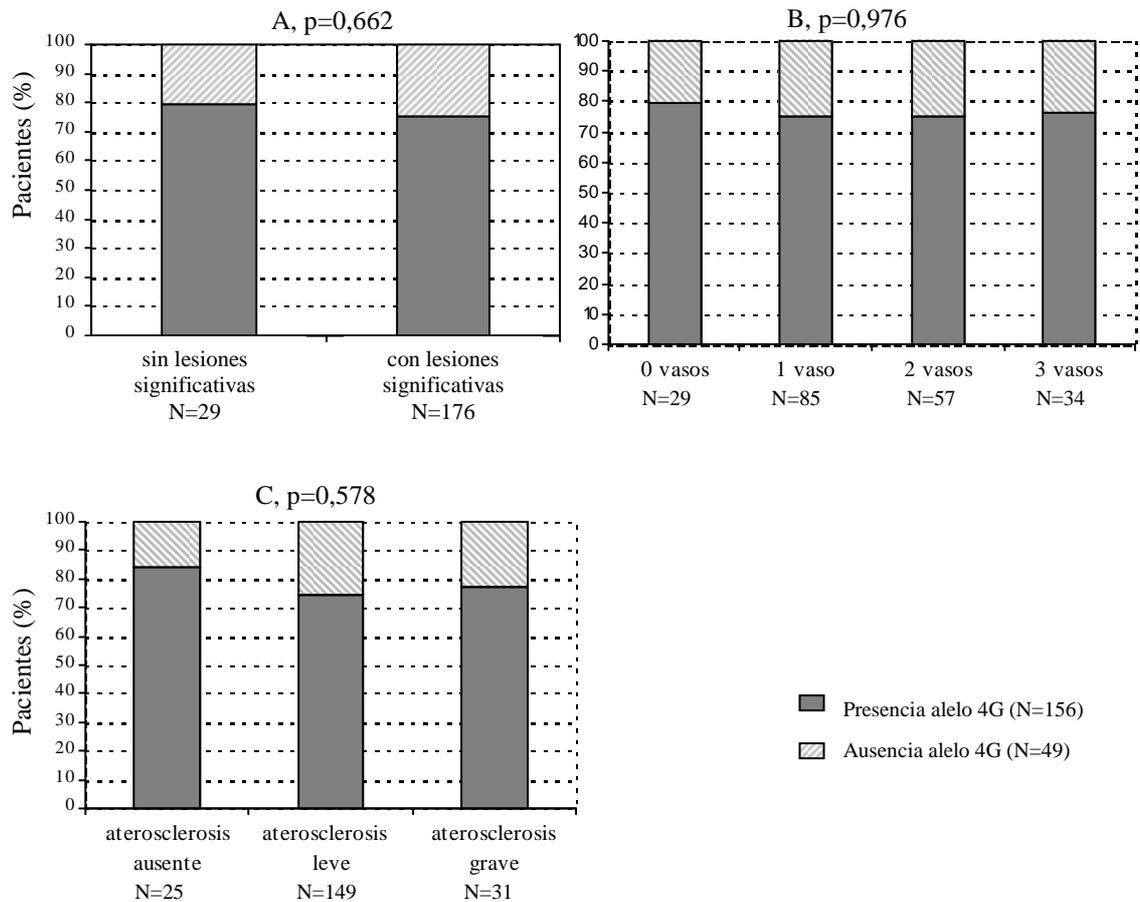


Figura 4.11. Genotipos del gen del PAI-1 en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada). Se representa el porcentaje de pacientes con cada genotipo (véase leyenda) en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Se ha aplicado el test de χ^2 para comparaciones entre grupos. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

Tampoco los niveles de PAI-1ag ni de PAI-1fc se asociaron con los resultados de la coronariografía (Figura 4.12).

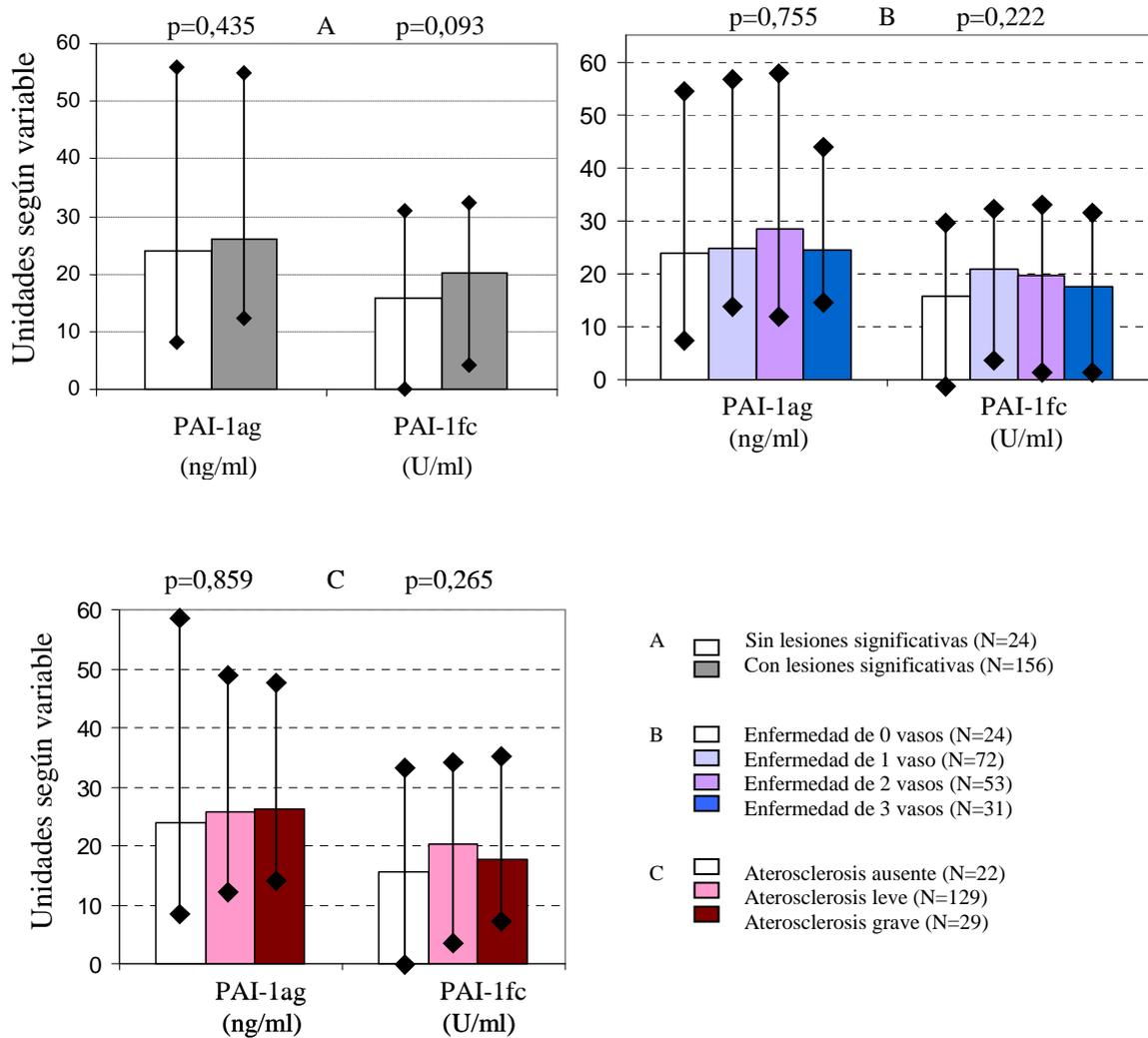


Figura 4.12. Comparación de niveles de PAI-1 en función de las coronariografías (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). Se representan las concentraciones de PAI-1ag y PAI-1fc en los pacientes con coronariografía agrupados según las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” (véase leyenda). Las barras representan medianas y las líneas sobre ellas acotan el rango (percentil 10%-percentil 90%). Se ha aplicado el test U de Mann-Whitney (para 2 grupos) o el test de Kruskal-Wallis (para más grupos). N: tamaño muestral; p: significación estadística.

En cuanto a la repercusión de la presencia del alelo 4G en la aparición de eventos tromboticos en la evolución, encontramos una tendencia no estadísticamente significativa entre esta característica genética y los eventos tromboticos analizados, exitus, reingreso o evento combinado exitus-reingreso, con $p=0,561$, $p=0,126$ y $p=0,103$, respectivamente. Como se muestra en la Figura 4.13, existe una separación progresiva de las líneas de supervivencia libres de eventos en los pacientes con y sin el alelo 4G, aunque no estadísticamente significativa.

Se analizó igualmente la influencia de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc en el desarrollo de eventos. Para ello se dicotomizaron estas variables tomando como puntos de corte los valores correspondientes a los percentiles 80% y 90% (para PAI-1ag 44,0 y 57,4 ng/ml, respectivamente, y para PAI-1fc 30,5 y 34,0 U/ml, respectivamente). Aunque ninguno de los puntos de corte analizados se asoció significativamente con el desarrollo de eventos (Kaplan Meier, Log Rank, $p > 0,05$), se observó una tendencia a una evolución desfavorable en sujetos con niveles de PAI-1 elevados (Figura 4.13).

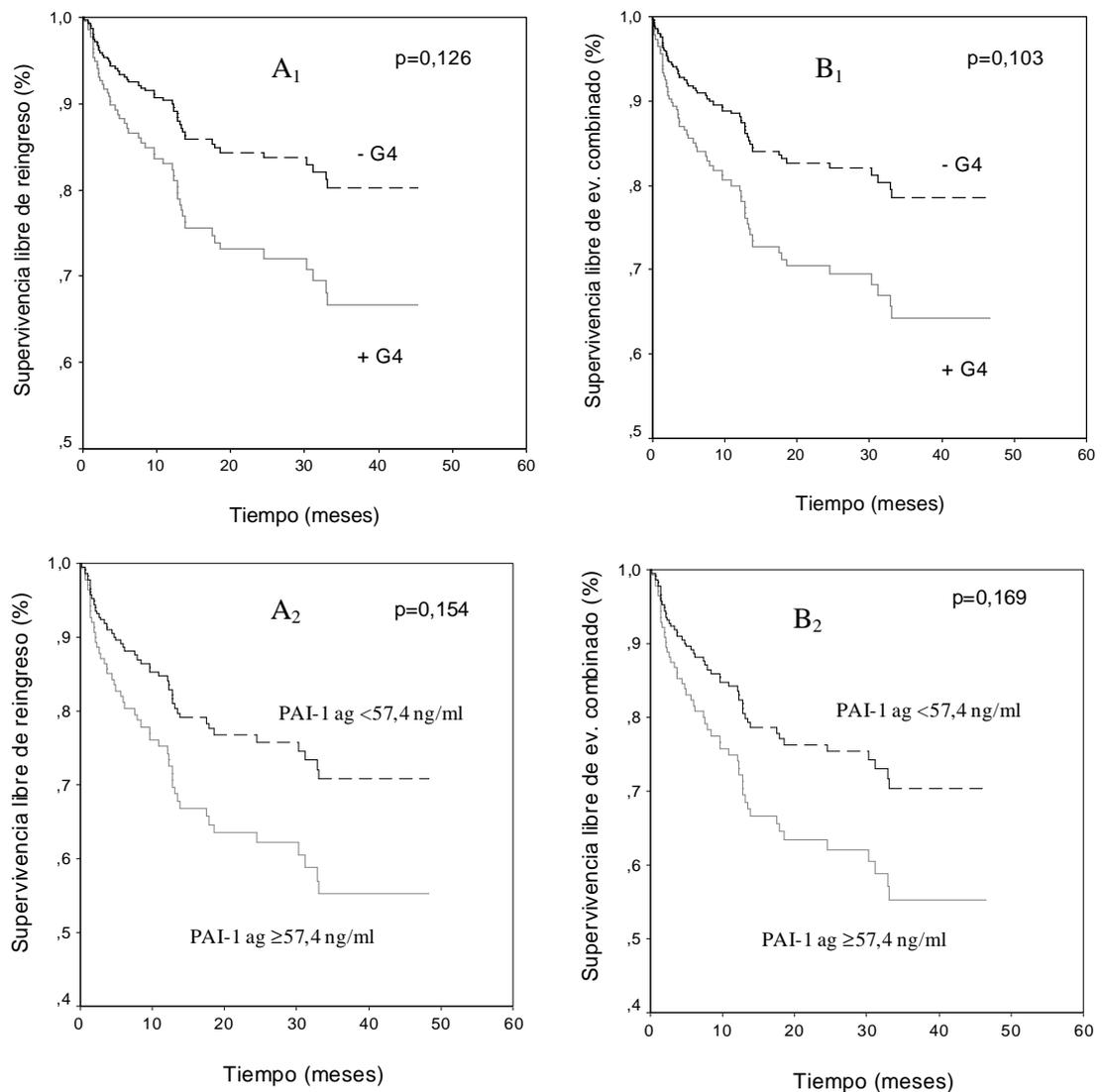


Figura 4.13. Curva de supervivencia libre de eventos y PAI-1. En A, el evento fue el reingreso trombótico. En B, el evento fue el combinado de exitus y reingreso trombótico. El subíndice 1 hace referencia a la presencia o ausencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. El subíndice 2 hace referencia a los niveles de PAI-1ag. El punto de corte de 57,4 ng/ml corresponde al percentil 90% de PAI-1ag en la distribución de pacientes con estudio analítico completo. El valor de p se ha obtenido de curvas de Kaplan Meier (Log Rank). p: significación estadística; -4G: ausencia del alelo 4G; +4G: presencia del alelo 4G.

Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

El alelo T se distribuyó uniformemente en todos los grupos según las tres valoraciones de la coronariografía (presencia de lesiones significativas, número de territorios coronarios afectados y extensión-severidad de las lesiones ateroscleróticas) (Figura 4.14). Tampoco se observaron diferencias significativas al analizar el genotipo, CC, CT o TT en relación a las tres valoraciones de la coronariografía (datos no mostrados). En definitiva, no se objetivó un perfil desfavorable en presencia del alelo T ni en presencia del genotipo TT.

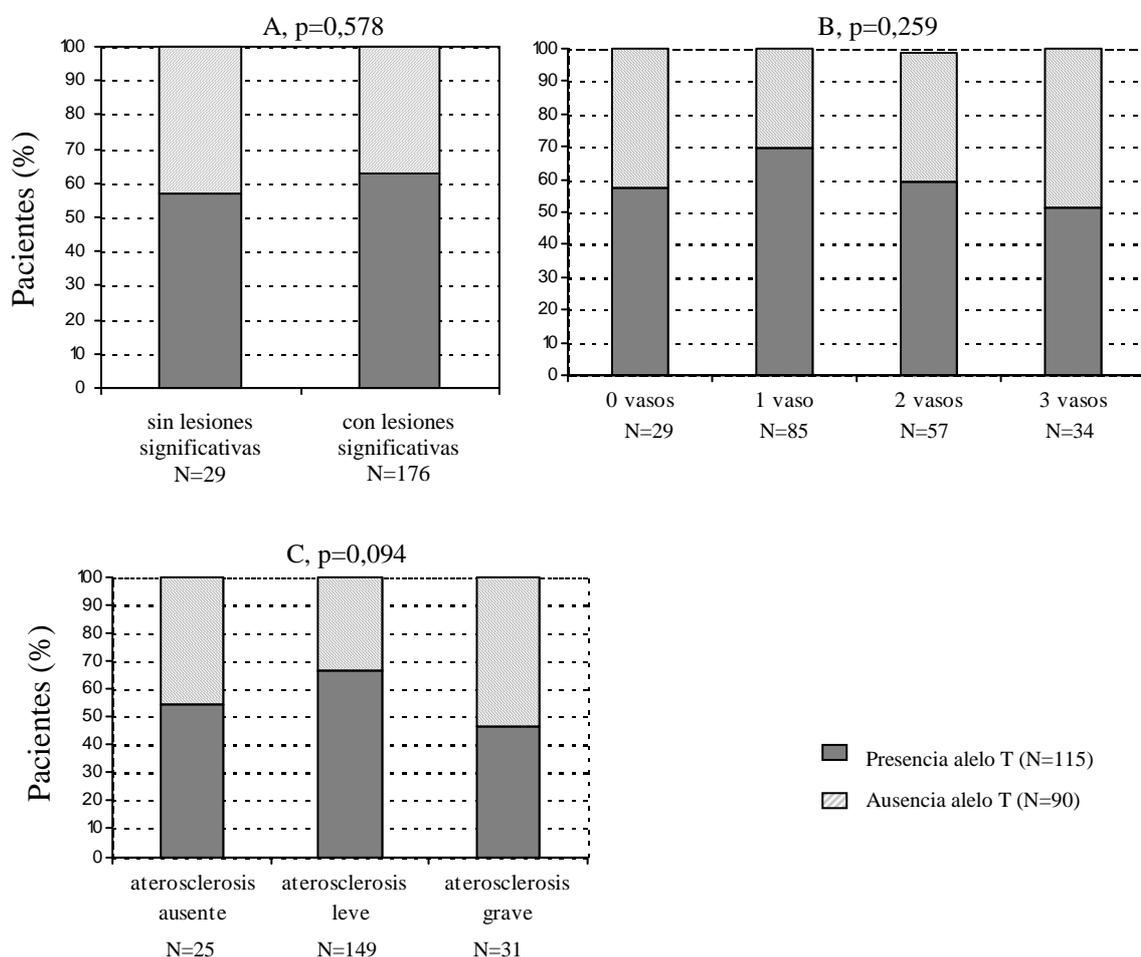


Figura 4.14. Genotipos del gen del TAFI en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada). Se representa el porcentaje de pacientes con cada genotipo (véase leyenda) en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Se ha aplicado el test de χ^2 , (2 para comparaciones entre grupos. Genotipo CC: variante Thr/Thr. Genotipo CT: variante Thr/Ile. Genotipo TT: variante Ile/Ile. N: tamaño muestral. p: significación estadística.

Tampoco los niveles de TAFIag ni de TAFIfc se asociaron con los resultados de la coronariografía (Figura 4.15).

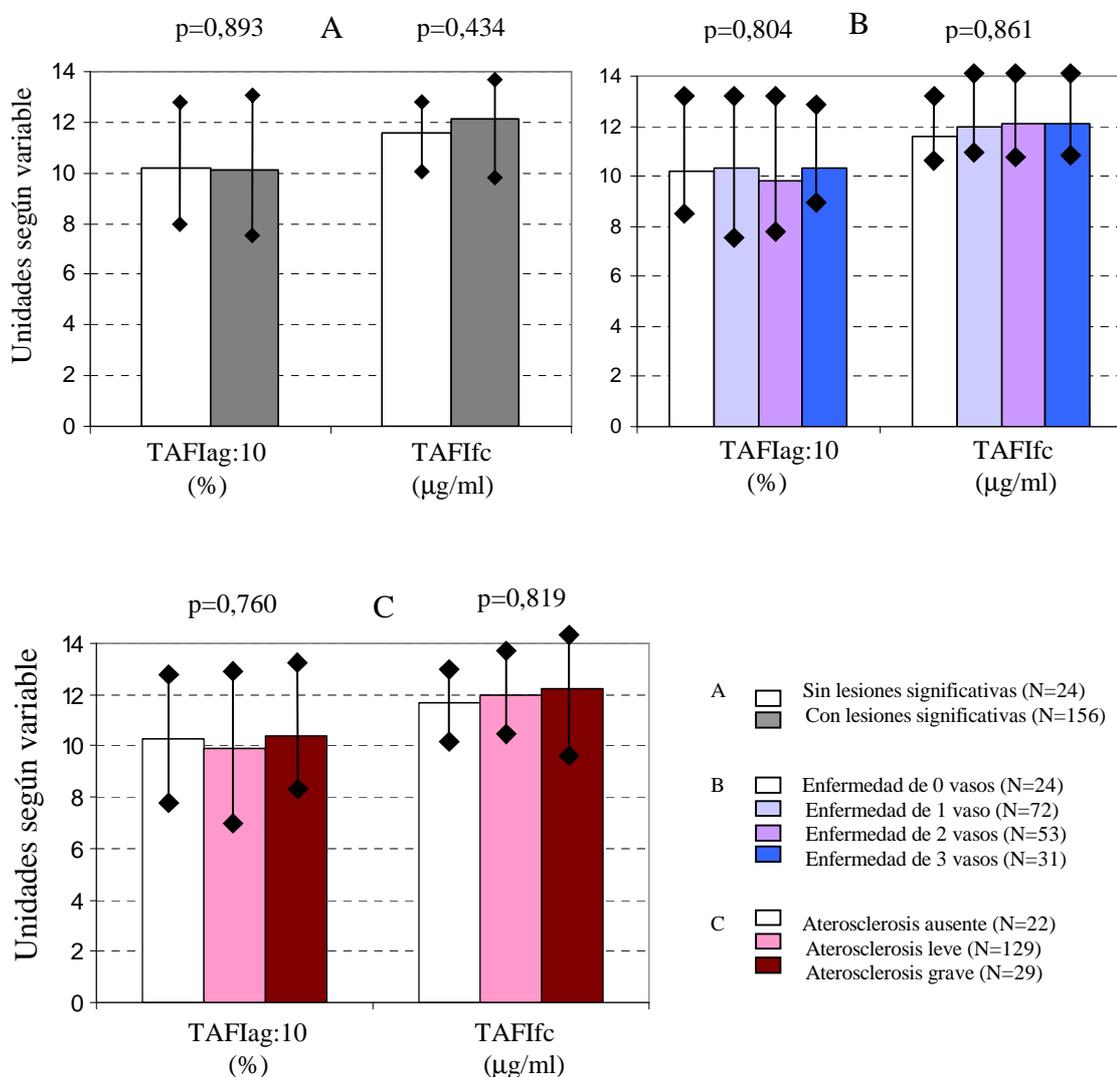


Figura 4.15. Comparación de niveles de TAFI en función de las coronariografías (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). Se muestran las concentraciones de TAFIag y TAFIfc en los pacientes con coronariografía agrupados según las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” (véase leyenda). Las barras representan medias y las líneas sobre ellas 1 desvío estándar. Se ha aplicado el test t-Student para la comparación de muestras independientes (A) o ANOVA (B y C) para la comparación de los niveles entre los distintos subgrupos. Unidades de: TAFIag %; TAFIfc µg/ml. p: significación estadística

Se analizó la asociación de la presencia del alelo T y el desarrollo de eventos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas al analizar el exitus, el reingreso o en evento combinado exitus-reingreso trombótico (Kaplan Meier, Log Rank, $p > 0,05$).

Se aplicó el mismo tratamiento estadístico para analizar la influencia de los niveles de TAFIag y TAFIfc en el desarrollo de eventos. Para ello se dicotomizaron estas variables tomando como punto de corte el valor correspondiente a los percentiles 80% y 90% (para TAFIag 123,4 y 144,7 %, respectivamente y para TAFIfc 12,9 y 14,9 (µg/ml, respectivamente). Ninguno de los puntos de corte analizados se asoció significativamente con el desarrollo de eventos (Kaplan Meier, Log Rank, $p > 0,05$).

4. 2. 2. 2. LIPOPROTEÍNA (a)

La presencia de isoformas de apo(a) de bajo peso molecular no se asoció con una mayor afectación coronaria en cualquiera de las tres valoraciones de las coronariografías. Sin embargo, cuando se excluyeron del análisis a los sujetos que expresaron simultáneamente isoformas de alto y bajo peso molecular de apo(a) (N=26) y se comprobó una relación significativa entre la presencia de isoformas de bajo peso molecular y la presencia de lesiones angiográficas ($p=0,049$) y el número de vasos afectados ($p=0,010$), así como una tendencia no significativa con el grado de aterosclerosis coronaria ($p=0,185$) (Figura 4.16).

Los niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl sí se asociaron significativamente con la presencia de lesiones (χ^2 , $p=0,007$, OR 9,9 IC 95% 1,3-75,6), con el patrón de enfermedad coronaria (χ^2 , $p=0,009$) y con la severidad de la aterosclerosis coronaria (χ^2 , $p=0,002$) (Figura 4.17 A, B y C₁). Igualmente, los niveles de Lp(a) analizados como variable continua se asociaron significativamente con el grado de aterosclerosis coronaria ($p=0,030$) (Figura 4.17 C₂).

Factores de la coagulación y de la fibrinólisis relacionados con la cardiopatía isquémica precoz.
Resultados

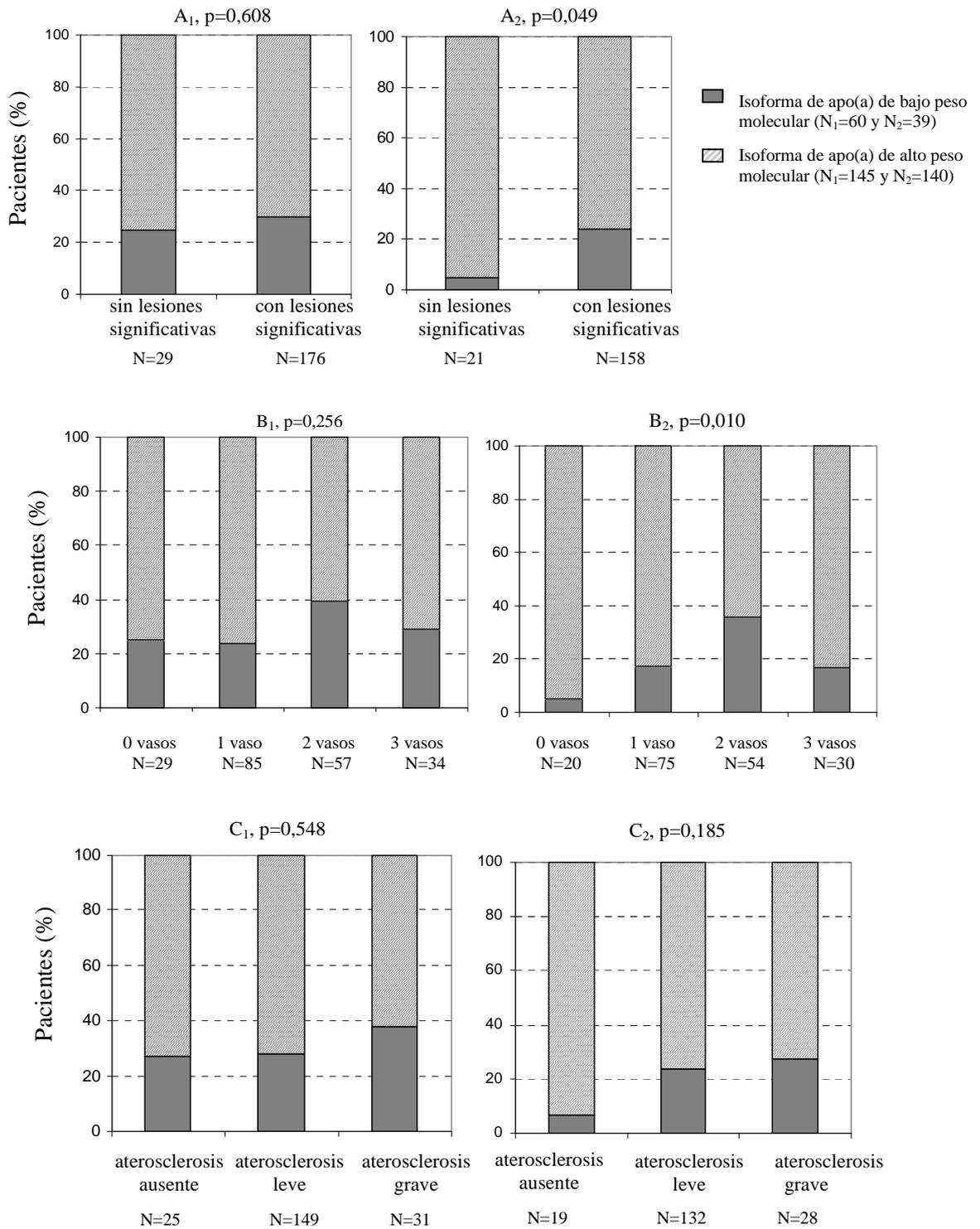


Figura 4.16. Isoformas de apo(a) en función de la coronariografía (pacientes con estudio genético y coronariografía realizada). Se representa el porcentaje de pacientes con cada isoforma apo(a) (véase leyenda) en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). El subíndice 1 hace referencia a N=205 y el subíndice 2 a N=179, cuando los sujetos que expresaron simultáneamente apo(a) de alto y bajo peso molecular (N=26) fueron excluidos. Se ha aplicado el test de χ^2 para comparaciones entre grupos. N: tamaño muestra; p: significación estadística.

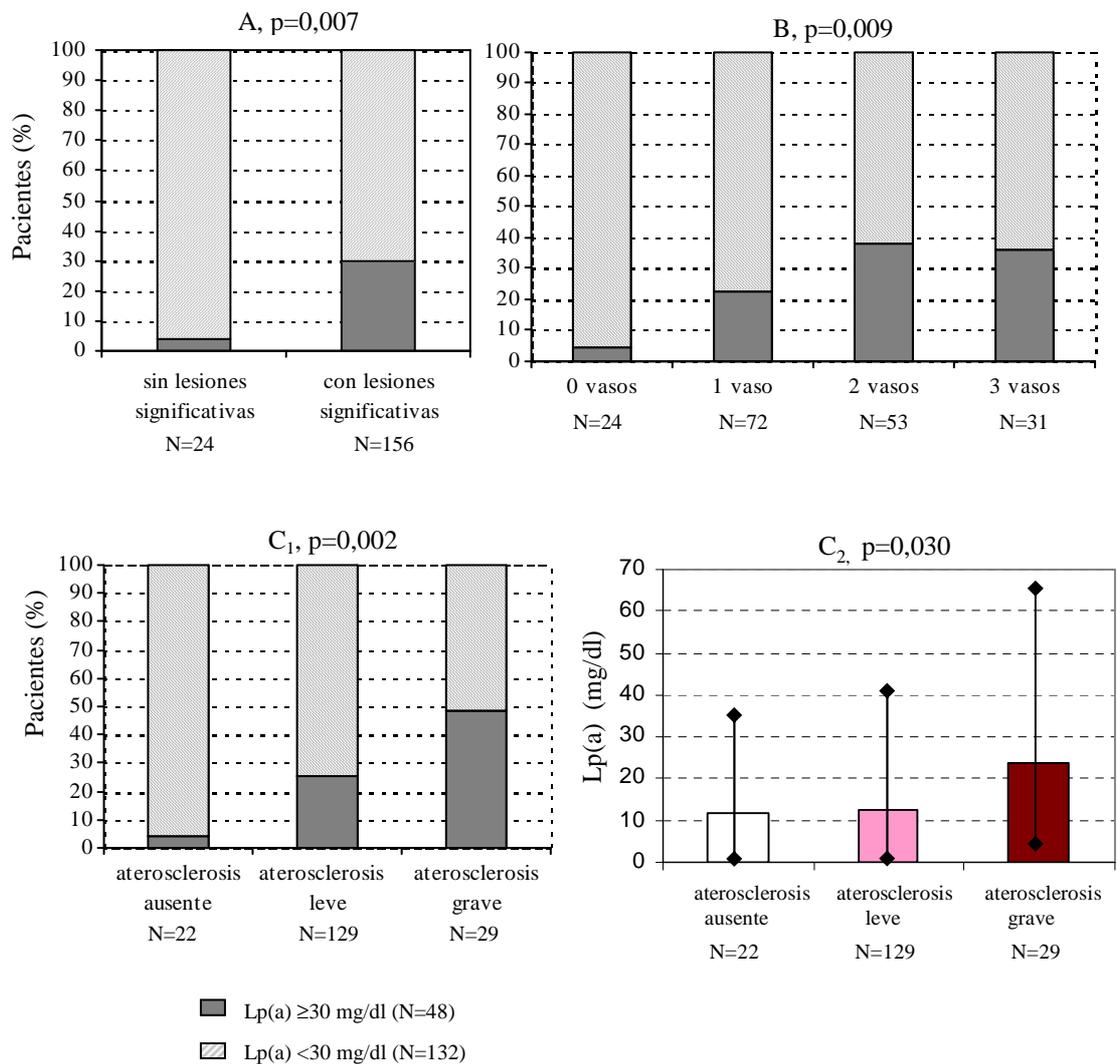


Figura 4.17. Niveles de Lp(a) en función de la coronariografía (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). A, B y C₁ representan el porcentaje de pacientes (ordenadas) con Lp(a) ≥ 30 mg/dl o < 30 mg/dl (véase leyenda) en función de los resultados de la coronariografía (abscisas), según las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria. C₂ muestra la concentración de Lp(a) (cada barra indica una mediana y las líneas sobre ella acotan el rango, percentil 10%-percentil 90%) según el grado de aterosclerosis coronaria (clasificación C). Las comparaciones entre grupos se han efectuado con el test de χ^2 para la variable Lp(a) dicotómica (A, B y C₁) y con el test de Kruskal-Wallis para la Lp(a) como variable continua (C₂). N: tamaño muestra; p: significación estadística.

Este análisis se repitió sólo para aquellos pacientes con decalajes menores de 6 meses entre el cateterismo y el análisis de sangre (111 pacientes). Los resultados fueron superponibles a los anteriores (Figura 4.18).

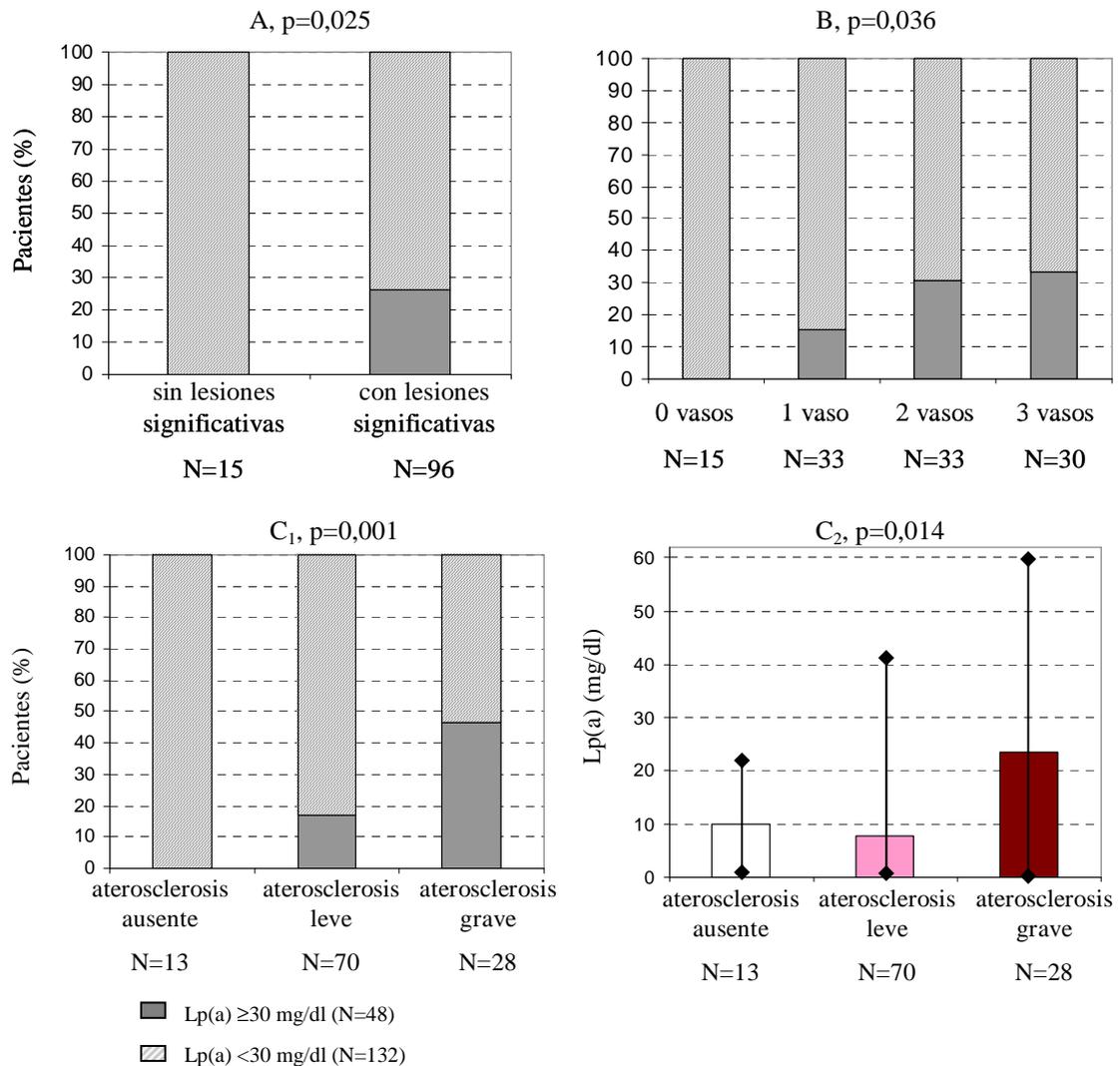


Figura 4.18. Niveles de Lp(a) en función de la coronariografía (N=111 pacientes con estudio de niveles completo y decalaje con la coronariografía <6 meses). A, B y C₁ representan el porcentaje de pacientes (ordenadas) con Lp(a) ≥30 mg/dl o <30 mg/dl (véase leyenda) en función de los resultados de la coronariografía (abscisas), según las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria. C₂ muestra la concentración de Lp(a) (cada barra indica una mediana y las líneas sobre ella acotan el rango, percentil 10%-percentil 90%) en función del grado de aterosclerosis coronaria (clasificación C). Las comparaciones entre grupos se han efectuado con el test de χ^2 para la variable Lp(a) dicotómica (A, B y C₁) y con el test de Kruskal-Wallis para la Lp(a) como variable continua (C₂). N: tamaño muestra; p: significación estadística.

Los niveles elevados de Lp(a), como variable continua, se asociaron a la presencia de aterosclerosis coronaria grave ($p=0,001$). Dos modelos de regresión logística ajustaron estos resultados para la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (modelo 1) y para los anteriores y la isoforma mayoritaria de apo(a) (modelo 2). Los niveles elevados de Lp(a) mantuvieron su asociación con la aterosclerosis coronaria grave, tanto en el modelo 1 como en el modelo 2 ($p=0,004$ y $p=0,003$, respectivamente) y con cada incremento de Lp(a) de 11,7 mg/dl (1 desvío estándar) la OR aumentó un 40%, un 40% y un 60%, según el modelo no ajustado, ajustado con el modelo 1 y con el modelo 2, respectivamente (Tabla 4.20).

Este mismo análisis se repitió para la Lp(a) como variable dicotómica. Se observó una asociación significativa entre niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl y la presencia tanto de lesiones coronarias (OR 9,9 IC 95% 1,3-75,6) y como de aterosclerosis grave (OR 3,2 IC 95% 1,4-7,3). Al igual que en el análisis univariado, estas asociaciones se mantuvieron estadísticamente significativas en los dos modelos de regresión logística empleados en el análisis multivariante (Tabla 4.20).

	OR (IC 95%) no ajustada	OR (IC 95%) ajustada modelo 1	OR (IC 95%) ajustada modelo 2
Lp(a) (mg/dl) * y:			
• Lesiones significativas	1,4 (1,0-2,0)	1,3 (0,9-1,9)	1,5 (0,9-2,3)
• Enfermedad de 3 vasos	1,1 (0,9-1,4)	1,1 (0,8-1,4)	1,2 (0,9-1,6)
• Aterosclerosis grave	1,4 (1,2-1,8)	1,4 (1,1-1,8)	1,6 (1,2-2,2)
Lp(a) ≥ 30 mg/dl y:			
• Lesiones significativas	9,9 (1,3-75,6)	8,3 (1,1-64,9)	15,1 (1,6-140,1)
• Enfermedad de 3 vasos	1,7 (0,7-3,8)	1,3 (0,6-3,2)	1,8 (0,6-5,5)
• Aterosclerosis grave	3,2 (1,4-7,3)	2,8 (1,2-6,9)	3,6 (1,2-11,1)

Tabla 4.20. Lp(a) (como variable continua y como variable dicotómica) y patrones angiográficos desfavorables de enfermedad coronaria. Se muestran ORs con sus respectivos IC 95% obtenidos de modelos de regresión logística que incluyeron sólo la variable de interés (análisis no ajustado), la anterior más los factores de riesgo cardiovascular (análisis ajustado con el modelo 1) y los anteriores más la isoforma mayoritaria de apo(a) (análisis ajustado con el modelo 2). En el caso de la Lp(a) como variable continua se muestran ORs para cada incremento de 11,7 mg/dl. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza. p: significación estadística.

*Según los modelos no ajustado, ajustado con el modelo 1 y con el modelo 2, los valores de p para la Lp(a) continua y los patrones angiográficos desfavorables (A: presencia de lesiones significativas, B: de enfermedad de tres vasos y C: de aterosclerosis grave) fueron $p=0,072$, $p=0,148$ y $p=0,090$ para A, $p=0,364$, $p=0,554$ y $p=0,303$ para B y $p=0,001$, $p=0,004$ y $p=0,003$ para C.

La construcción de curvas ROC para cada estimación dicotómica de la coronariografía (presencia/ausencia de lesiones coronarias, presencia/ausencia de enfermedad de tres vasos y presencia/ausencia de aterosclerosis coronaria grave) permitió comprobar que la mejor utilidad de la concentración de Lp(a) fue para la identificación de aterosclerosis coronaria grave (con mayor área bajo la curva y significación estadística) (Figura 4.19).

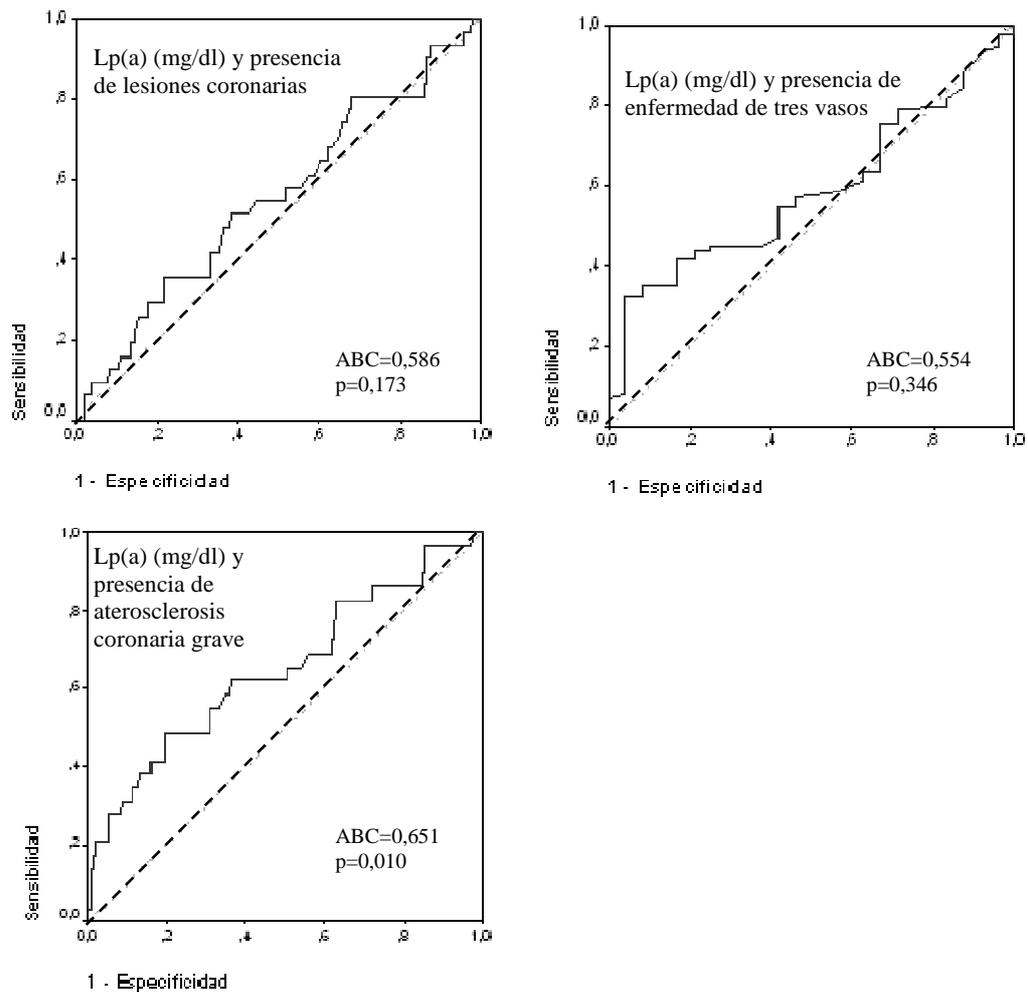


Figura 4.19. Curva ROC para los niveles de Lp(a) (mg/dl) para cada uno de los patrones más desfavorables de la coronariografía (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). Línea discontinua: línea de referencia. ABC: Área bajo la curva. N: tamaño muestral; p: significación estadística; ROC: Receiver Operating Curve.

De estas curvas se obtuvo la sensibilidad y la especificidad para el punto de corte de Lp(a) de 30 mg/dl, del valor ampliamente establecido en la literatura. A continuación se calcularon los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de dicho punto de corte en la identificación de los patrones más desfavorables de la coronariografía, según las tres valoraciones angiográficas (Tabla 4.21).

	Presencia de lesiones coronarias	Enfermedad de tres vasos	Aterosclerosis coronaria grave
Sensibilidad (%)	30	36	48
Especificidad (%)	96	77	79
VPP (%)	98	23	29
VPN (%)	17	85	89

Tabla 4.21. *Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el punto de Lp(a) de 30 mg/dl en relación a los patrones más desfavorables en la coronariografía. Datos extraídos de curvas ROC. VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; ROC: Receiver Operating Curve.*

En el análisis de los eventos registrados en la evolución, no se detectó asociación significativa entre la presencia de la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular y el desarrollo de eventos trombóticos, exitus, reingreso o evento combinado exitus-reingreso (Kaplan Meier, Log Rank, $p > 0,05$). Aunque tampoco la presencia de niveles Lp(a) ≥ 30 mg/dl se asoció significativamente al desarrollo de ninguno de los eventos considerados, se detectó una tendencia entre una menor supervivencia libre de reingresos y la presencia de niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl (Figura 4.20).

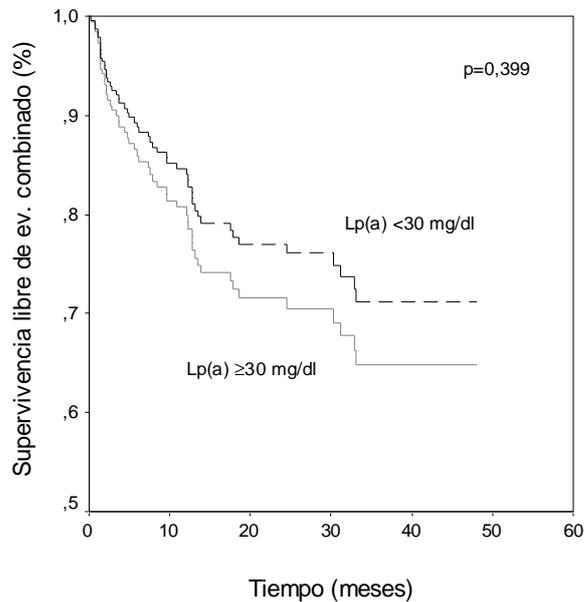


Figura 4.20. Curva de supervivencia libre de evento combinado y niveles de *Lp(a)*. El valor de *p* se ha obtenido de una curva de Kaplan Meier (Log Rank). *p*: significación estadística.

4. 2. 2. 4. SISTEMA DE LA COAGULACIÓN: PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE, FACTOR V LEIDEN Y MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA

Proteína C activada circulante

Los niveles de APC se asociaron significativamente con la afectación coronaria en todas y cada una de las valoraciones angiográficas, siempre de forma inversamente proporcional. De esta forma, en presencia de concentraciones menores de APC la gravedad y la extensión de la aterosclerosis coronaria fue mayor (Figura 4.21).

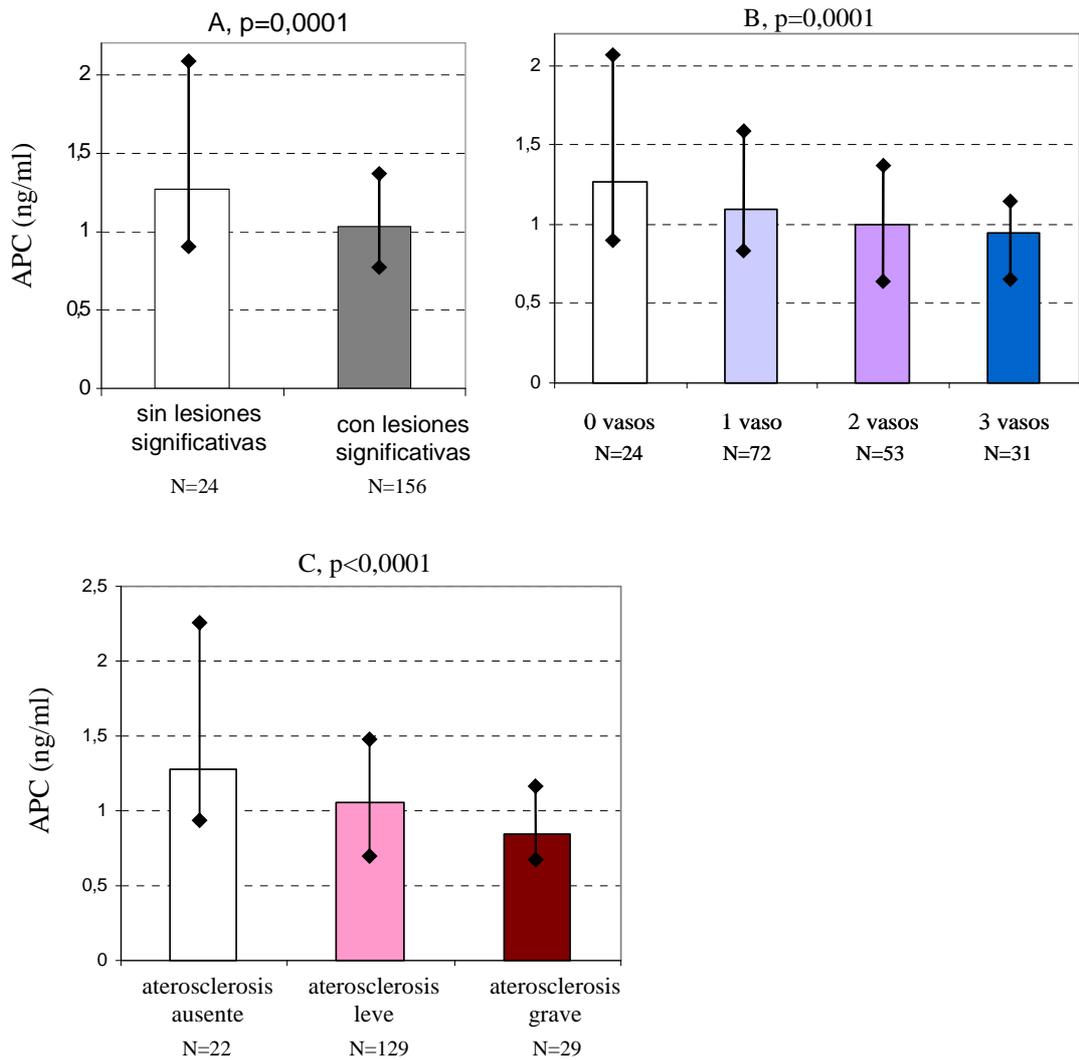


Figura 4.21. Niveles de proteína C activada circulante en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). Se representa la concentración de APC en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Las barras representan medianas y las líneas sobre ellas acotan el rango (percentil 10%-percentil 90%). Se ha aplicado el test U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis para comparar los grupos. N: tamaño muestral; p: significación estadística; APC: proteína C activada circulante.

Este análisis se repitió sólo para aquellos pacientes con decalajes menores de 6 meses entre el catetersimo y el análisis de sangre (111 pacientes). Los resultados fueron superponibles a los anteriores (Figura 4.22).

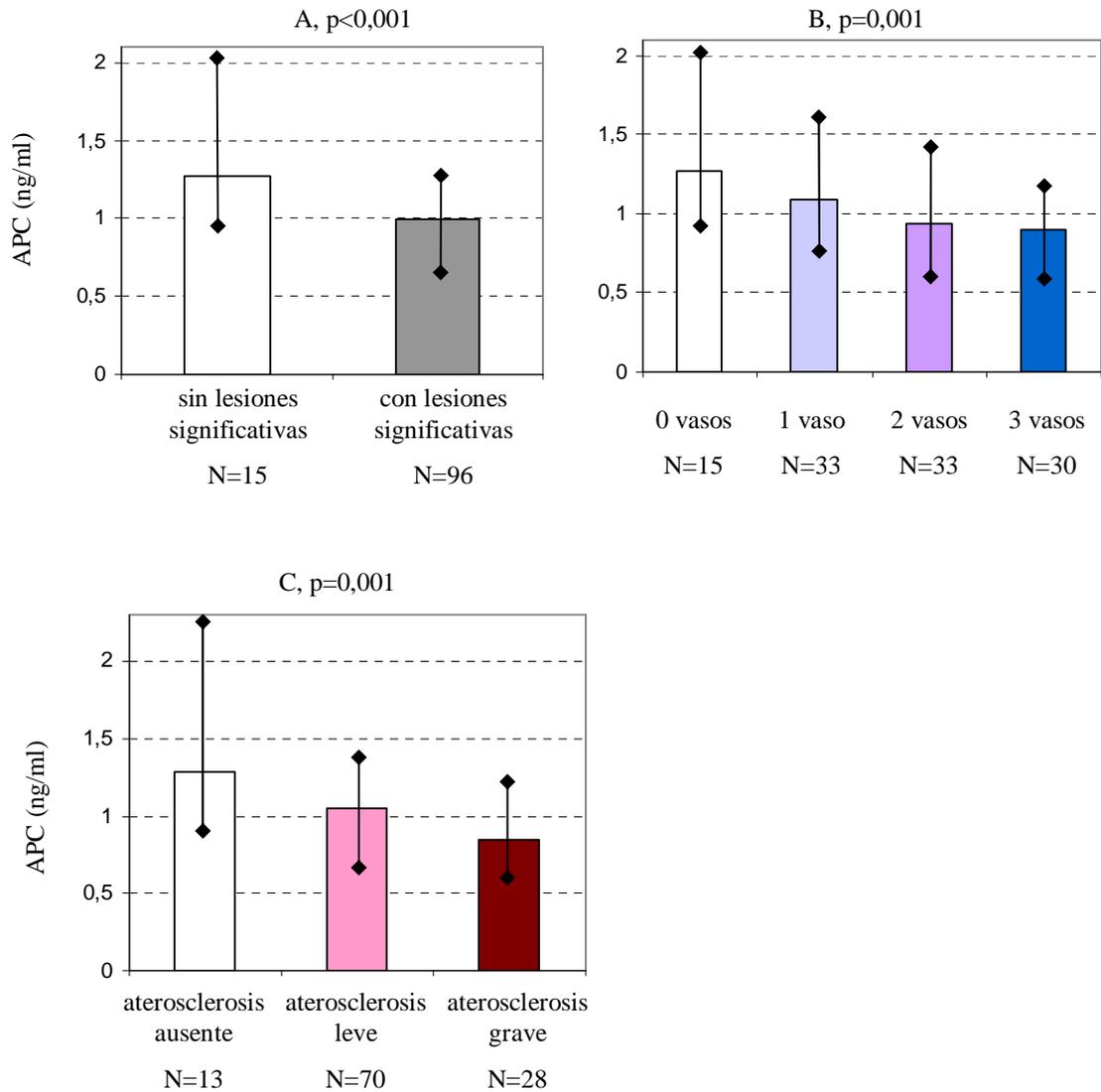


Figura 4.22. Niveles de proteína C activada circulante en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=111 pacientes con estudio de niveles completo y decalaje con la coronariografía <6 meses). Se representa la concentración de APC en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Las barras representan medianas y las líneas sobre ellas acotan el rango (percentil 10%-percentil 90%). Se ha aplicado el test U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis para comparar los grupos. N: tamaño muestral; p: significación estadística; APC: proteína C activada circulante.

Finalmente, se analizaron los eventos registrados en la evolución en relación a los niveles de APC. Para ello se dicotomizó esta variable tomando como punto de corte los valores correspondientes al percentil 10% y 20% (0,64 ng/ml y 0,78 ng/ml, respectivamente). No se detectó asociación significativa entre los niveles de APC y el desarrollo de eventos trombóticos, exitus, reingreso o evento combinado exitus-reingreso (Kaplan Meier, Log Rank, $p>0,05$, datos no mostrados).

Factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina

Aunque su prevalencia en el grupo de pacientes fue demasiado baja para extraer conclusiones, ni la presencia del factor V Leiden ni la de la mutación G20210A de la protrombina se asoció con patrones desfavorables en la coronariografía (Figura 4.23 y Figura 4.24, respectivamente) ni con el desarrollo de eventos adversos en la evolución (Kaplan Meier, Log Rank, $p > 0,05$, datos no mostrados).

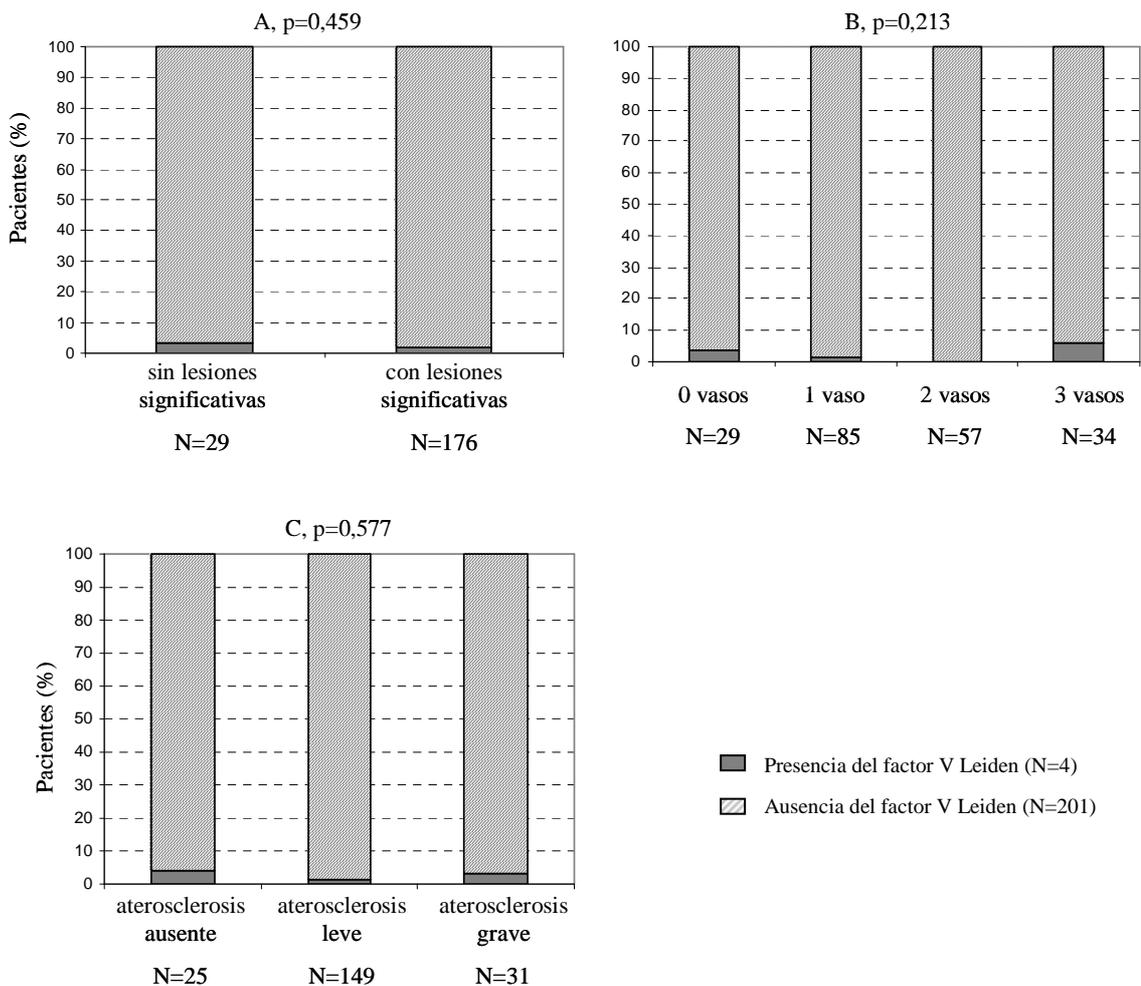


Figura 4.23. Presencia del factor V Leiden en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada). Se representa el porcentaje de pacientes con o sin factor V Leiden (véase leyenda) en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Se ha aplicado el test de χ^2 o el test exacto de Fisher para comparaciones entre grupos. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

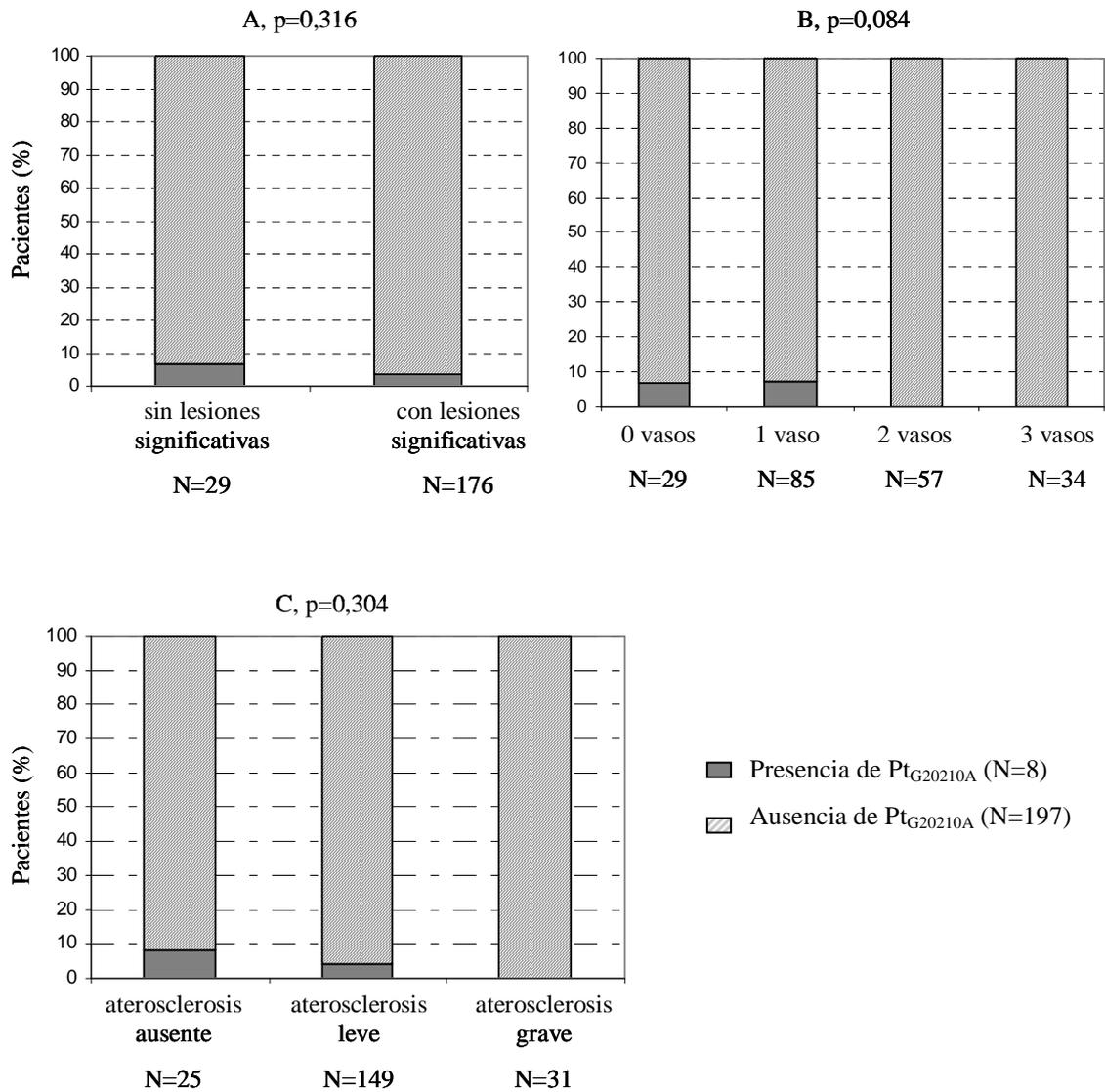


Figura 4.24. Presencia de la mutación G20210A de la protrombina en función de la coronariografía (N=205 pacientes con estudio genético y coronariografía realizada). Se representa el porcentaje de pacientes con o sin mutación G20210A de la protrombina (véase leyenda) en función de las tres clasificaciones (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” para la afectación coronaria (abscisas). Se ha aplicado el test de χ^2 o el test exacto de Fisher para comparaciones entre grupos. Pt_{G20210A}: mutación G20210A del gen de la protrombina; N: tamaño muestral; p: significación estadística.

4.2.2.4. OTROS PARÁMETROS: FIBRINÓGENO Y PROTEÍNA C REACTIVA

Se observó una tendencia no significativa entre los resultados angiográficos y los niveles de fibrinógeno y de proteína C reactiva (Figura 4.25).

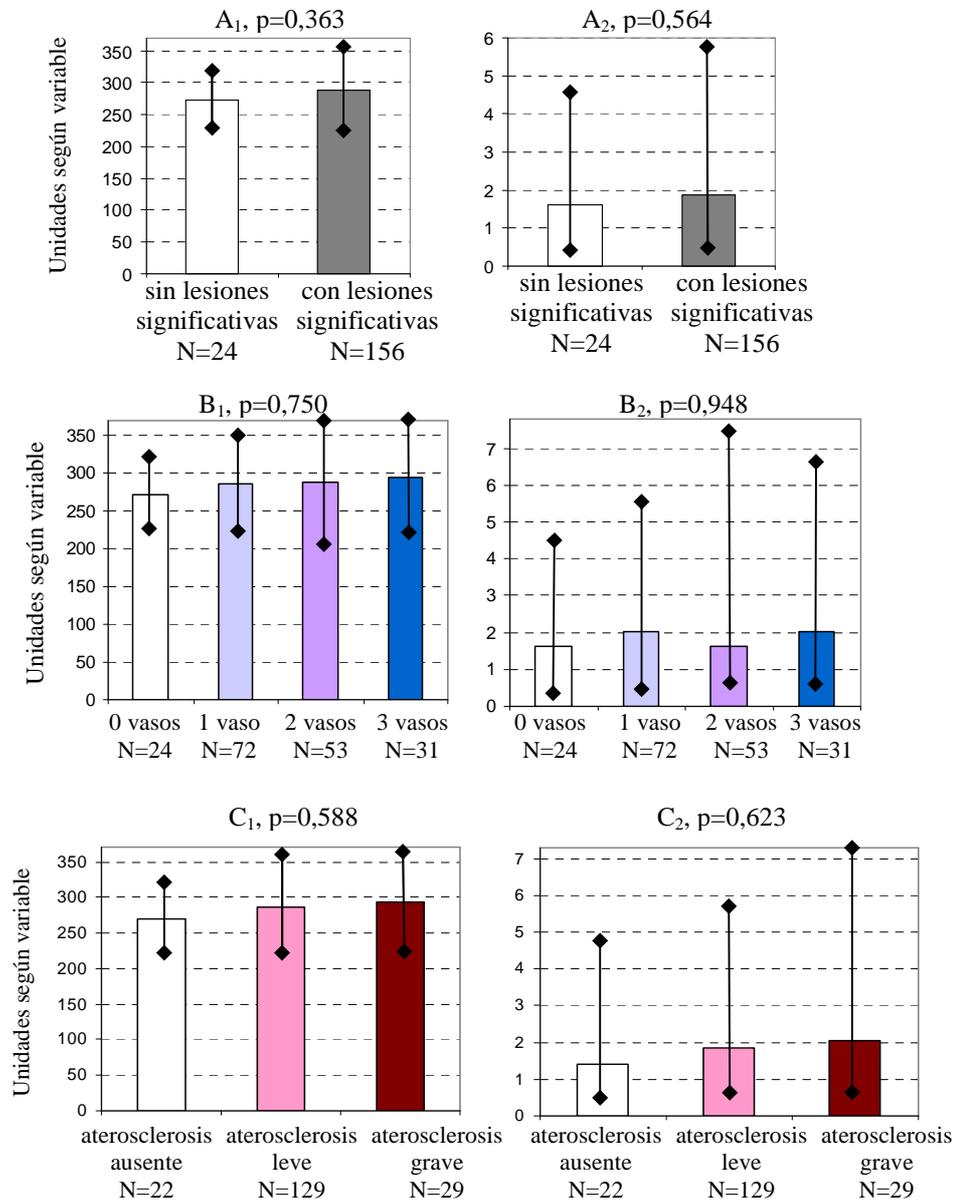


Figura 4.25. Fibrinógeno y de proteína C reactiva en función de las tres clasificaciones de afectación coronaria (N=180 pacientes con estudio de niveles completo y coronariografía realizada). El subíndice 1 se refiere a la concentración de fibrinógeno (mg/dl) y el 2 a la de proteína C reactiva (mg/l) en función de las tres clasificaciones angiográficas (A, B y C) especificadas en “Material y Métodos” (abscisas). Para el fibrinógeno, las barras representan medias y las líneas 1 desvío estándar por encima y debajo de ellas. Para la proteína C reactiva, las barras representan medianas y las líneas sobre ellas acotan el rango (percentil 10%-percentil 90%). Se ha aplicado el test t de Student o ANOVA para el fibrinógeno y el test U de Mann-Whitney o el de Kruskal-Wallis para la proteína C reactiva. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

Finalmente, tampoco los eventos trombóticos en la evolución se asociaron significativamente a la concentración de fibrinógeno ni con la de proteína C reactiva. Tan sólo se observó una tendencia, de nuevo no estadísticamente significativa, entre los niveles elevados de proteína C reactiva y el reingreso o el evento combinado (Figura 4.26).

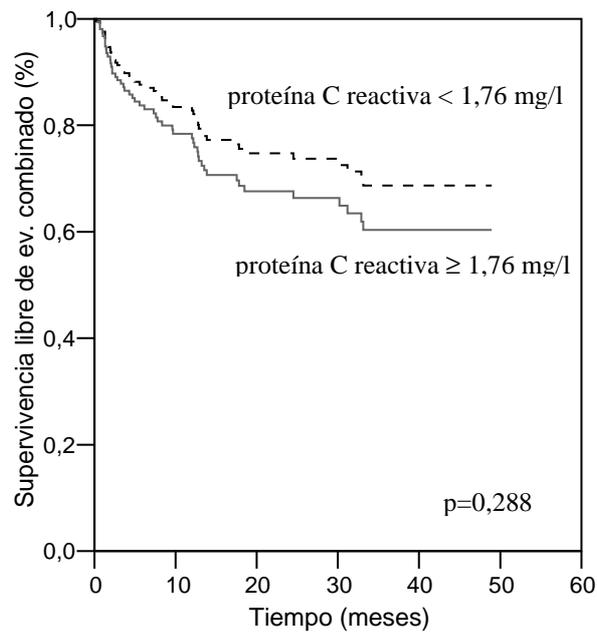


Figura 4.26. Curva de supervivencia libre de evento combinado y niveles de proteína C reactiva. El punto de corte de 1,76 mg/l corresponde al percentil 50% de proteína C reactiva en la distribución de pacientes con estudio analítico completo. El valor de p se ha obtenido de una curva de Kaplan Meier (Log Rank). p: significación estadística.

5.- DISCUSIÓN

Con el mismo orden que hasta ahora, a continuación se discuten los resultados siguiendo este esquema:

5.1. Análisis descriptivo general:

- 5.1.1. Comparación entre pacientes y controles
- 5.1.2. Características específicas de los pacientes

5.2. Parámetros de la fibrinólisis y la coagulación:

5.2.1. Marcadores de riesgo de infarto de miocardio a edad precoz.

- 5.2.1.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina y otros
- 5.2.1.2. Lipoproteína (a)
- 5.2.1.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina

5.2.2. Marcadores de extensión y severidad de la enfermedad coronaria y/o del desarrollo de eventos trombóticos en la evolución.

- 5.2.2.1. Sistema fibrinolítico: inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 e inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina
- 5.2.2.2. Lipoproteína (a)
- 5.2.2.3. Sistema de la coagulación: proteína C activada circulante, factor V Leiden y mutación G20210A de la protrombina
- 5.2.2.4. Otros parámetros: fibrinógeno y proteína C reactiva

5.3. Discusión final

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO GENERAL

5.1.1. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES Y CONTROLES

En general, la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en la población analizada fue similar a la descrita en otros estudios y registros realizados en nuestro país [7,8].

5.1.2. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE LOS PACIENTES

El infarto en gente joven es típicamente una enfermedad de hombres, y así lo reflejan los porcentajes mostrados en la Tabla 4.1 (hombres 89,2%, mujeres 10,8%), cifras totalmente coincidentes con otros trabajos realizados en poblaciones similares tanto de nuestra área [12] como de otros países [319].

El tabaquismo es, sin duda, el factor de riesgo más prevalente en los pacientes jóvenes con infarto de miocardio: 89,2% en la población estudiada (Tabla 4.1) y del 76% al 91% en trabajos previos [12, 320, 321]. Previamente se ha indicado la importancia de la cuantificación del colesterol total y de sus fracciones [322, 323]. En este trabajo de tesis doctoral la prevalencia de la dislipemia (definida a partir de la concentración de colesterol y de triglicéridos, según lo comentado en Material y Métodos) fue del 67,1%. Si se hubieran tenido en cuenta exclusivamente las cifras de colesterol total (≥ 250 mg/dl), registradas en el 43,2% de los pacientes, los resultados habrían sido superponibles (39,9%) a los documentados en trabajos previos realizados en nuestra área geográfica entre 1995 y 1999 [12]. La distribución de factores de riesgo de infarto de miocardio en esta tesis fue diferente a la observada en la población navarra del registro IBERICA [11], especialmente entre los hombres, con una menor representación del grupo con 0 y 1 factor de riesgo cardiovascular (Tabla 5.1). Estas diferencias probablemente estén relacionadas con el criterio utilizado para el diagnóstico de infarto de miocardio (que por motivos de fechas de publicación en el caso del registro IBERICA no pudo incluir la

actualización de la European Society of Cardiology/American College of Cardiology [305]) y/o con el criterio utilizado para el diagnóstico de los factores de riesgo cardiovascular (especialmente la dislipemia/hipercolesterolemia y el tabaquismo, incluyendo o no a los exfumadores). Además, por la edad analizada, los pacientes de la presente tesis doctoral (hasta 51 años) debían incluso haber sido “más sanos” en comparación con el grupo de edad hasta 54 años del registro IBERICA.

Nº de FRCV según sexo	Registro IBERICA*		Esta tesis [‡]		p	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
	N=160	N=21	N=211	N=26		
0 N (%)	15 (9,4)	2 (9,5)	3 (1,4)	3 (11,5)	0,009	1,000
1 N (%)	56 (35,0)	9 (42,9)	44 (22,3)	8 (34,6)	0,009	0,782

Tabla 5.1. Prevalencia de los factores de riesgo en pacientes jóvenes: población navarra del Registro IBERICA [11] y esta tesis. El valor de p se ha obtenido del test de χ^2 o del test exacto de Fisher. FRCV: factores de riesgo cardiovascular. N: tamaño muestral; p: significación estadística.

* Pacientes analizados hasta 54 años

[‡] Pacientes analizados hasta 51 años

Por lo que respecta a las características clínicas específicas de los pacientes, la prevalencia de claudicación intermitente, angina, infarto de miocardio y revascularización coronaria previa (Tabla 4.2) fue similar a la descrita en trabajos previos [12].

En cuanto a las pruebas complementarias realizadas durante el ingreso hospitalario (Tabla 4.3), existen datos de función ventricular en la gran mayoría de los pacientes incluidos en este trabajo (89,9%), procediendo en su mayor parte de estudios ecocardiográficos y, en su defecto, de ventriculografías. Estas cifras parecen ser algo mayores (ecocardiografía practicada en el 77,5%) que las observadas en la población navarra del registro IBERICA [11] y, desde luego, mayores a las observadas (46,0%) en registros estadounidenses [324], aunque ninguna de estas cifras se restringe al grupo de edad de interés. Aunque es bien conocida la utilidad del test de esfuerzo como predictor de eventos en la evolución

[325], es destacable la baja tasa (37,1%) de utilización de esta prueba durante el ingreso hospitalario (Tabla 4.3), quizás motivada porque en algunos casos los especialistas responsables justificaron la realización de una coronariografía directa sin documentación previa de isquemia miocárdica basándose en la edad (joven) de sus pacientes, en el desarrollo de angina postinfarto y/o en el hallazgo de una función sistólica del ventrículo izquierdo deteriorada, dentro del marco general de facilidades en la realización de esta exploración por su buena disponibilidad en el hospital La Fe. Entre los pacientes que se sometieron a un test de esfuerzo, el alto porcentaje de resultados no concluyentes (26,1%) probablemente fue motivado por el empleo de fármacos β -bloqueantes durante el ingreso (52,3%), a pesar de la precaución de retirarlos tres días antes de la realización de la prueba. El porcentaje de empleo de este fármaco durante el ingreso hospitalario por infarto de miocardio fue algo menor (60,6%) a la descrita previamente en la población navarra (25-75 años) del registro IBERICA [11]. Durante prácticamente todo el tiempo de recogida de datos de esta tesis no existía alerta de hemodinámica de 24 horas, y tan sólo en los últimos meses se implementó esta medida asistencial para ofertar intervencionismo de rescate en los casos incluidos en el protocolo que se definió en su día. Por lo tanto, ante la falta de oferta de angioplastia primaria en nuestra área, el tratamiento de elección en todos los casos que debutaron con elevación del segmento ST, en ausencia de contraindicaciones, fue la trombolisis. En esta serie, este subgrupo de pacientes se benefició de tratamiento trombolítico en el 81,0% de los casos, dato algo mayor (73,0%) al descrito para pacientes menores de 45 años con infarto de miocardio en nuestra área geográfica [12].

La baja mortalidad intrahospitalaria observada en nuestra serie de pacientes jóvenes ingresados por infarto agudo de miocardio (Tabla 4.4, 2,1%) es similar a la reflejada en estudios previos (3,5%) [12]. También la incidencia de exitus de causa trombótica durante el seguimiento ($30,7 \pm 24,3$ meses) fue baja (2,9%), muy probablemente por la juventud de los pacientes incluidos y por la baja prevalencia de depresión moderada-severa de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (13,6% en esta tesis).

Finalmente, es llamativa la falta de asociación significativa entre reconocidas variables clínicas desfavorables y el desarrollo de eventos (Tabla 4.5). Así, sólo la presencia de mala fracción de eyección del ventrículo izquierdo se asoció con el exitus trombótico ($p=0,001$), probablemente por la dificultad para desligar el evento trombótico causante del infarto agudo de miocardio inicial de la insuficiencia

cardiaca por el deterioro de función sistólica ocasionada por él (recordemos que de los 6 exitus por síndrome coronario agudo 5 de ellos sucedieron durante el ingreso inicial). Por otra parte, la presencia de diabetes mellitus mostró una tendencia próxima a la significación estadística al ser analizada en relación al exitus trombótico ($p=0,101$) y al evento combinado ($p=0,088$). Aunque 30,7 meses de seguimiento medio es una cifra aceptable, quizás un mayor periodo de seguimiento o un mayor tamaño muestral podría distinguir alguna de estas variables como marcadora de eventos en la evolución. En este trabajo de tesis doctoral no se encontraron diferencias en el desarrollo de eventos en la evolución cuando se tuvo en cuenta el sexo, a diferencia de lo observado por otros autores de nuestro entorno, que encontraron una mayor mortalidad en mujeres con infarto agudo de miocardio manifestado con elevación del segmento ST [326] o con onda Q [327]. Estas divergencias subyacen, probablemente, en las diferencias de los grupos clínicos estudiados (en la presente tesis doctoral limitado a la población joven), situación que también restringe de forma considerable el número de mujeres participantes en este estudio.

5.2. PARÁMETROS DE LA FIBRINOLISIS Y DE LA COAGULACIÓN

5.2.1. MARCADORES DE RIESGO DE INFARTO DE MIOCARDIO A EDAD PRECOZ

5.2.1.1. SISTEMA FIBRINOLÍTICO: INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1, INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA Y OTROS

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

El análisis de los genotipos y de la presencia del alelo 4G demostró que esta característica genética se encuentra diferentemente representada en los dos grupos clínicos estudiados. Así, se observó una mayor presencia del alelo 4G en pacientes que en controles, con una OR de 2,0 en el análisis no ajustado y ajustado, siempre con significación estadística (Tabla 4.6). Interesa destacar que esta característica genética no es modificable y, por tanto, nunca puede ser considerada efecto de la cardiopatía isquémica, a pesar de tratarse de un estudio de casos y controles. No obstante, esta asociación debe tomarse con precaución a la luz de los resultados negativos de un trabajo desarrollado en Italia con potencia estadística superior a la de la presente tesis doctoral en este apartado (90% frente a 70%), que incluyó 1210 pacientes con infarto de miocardio a edad inferior a 45 años y 1210 controles [328]. Parte de las discrepancias observadas podrían deberse a que en el estudio italiano los pacientes se incluyeron tiempo después del infarto (no se detalla con cuánto decalaje) de forma que no se puede excluir que los que fallecieron precozmente pudieran haber tenido un perfil genético más desfavorable. Esta limitación no es aplicable a la presente tesis doctoral, pues el estudio genético se realizó en las primeras 48 horas de estancia hospitalaria tras el infarto de miocardio y, de los 5 fallecidos intrahospitalariamente, de los cuales 4 (80%) presentaban el alelo 4G (N=4). Finalmente, la comprobación de que el polimorfismo 4G/5G del PAI-1 se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg aportó evidencia en contra de la existencia de estratificación en la población estudiada o de errores en el genotipado.

También los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc fueron mayores en el grupo de pacientes que en el de controles (Tabla 4.7 y 4.8). Teniendo en cuenta que los niveles de PAI-1 se han visto asociados a los componentes del síndrome metabólico (donde forman parte de la constelación sindrómica la obesidad, la hipertensión arterial y la hipertrigliceridemia, entre otros) [99], los resultados se ajustaron para la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, dislipemia y obesidad). Las diferencias observadas se mantuvieron estadísticamente significativas en el análisis multivariante en lo que al PAI-1ag respecta (Tabla 4.7 y 4.8), apuntando un posible efecto deletéreo añadido de este parámetro no mediado exclusivamente por su asociación con el síndrome metabólico. El aumento progresivo de las ORs para los diferentes cuartiles de PAI-1ag se perdió, no obstante, al ajustar los resultados iniciales con el modelo 1 y 2, probablemente por la presencia de una distribución desigual de factores de riesgo en los distintos cuartiles de PAI-1 (mayor porcentaje de pacientes hipertensos, dislipémicos y obesos en el 4º cuartil que en el resto: 48,0% de hipertensos en el 4º cuartil versus 25,0% proximadamente en el resto, 74,5% de dislipémicos en el 4º cuartil versus 60,0% en el resto y 38,8% de obesos en el 4º cuartil versus 16,0% en el resto).

En un intento por comparar el peso relativo que juegan los niveles elevados de PAI-1ag (cuartil 3º versus 1º, y 4º versus 1º) en el riesgo de padecer un infarto de miocardio a edad precoz, es destacable señalar que sus ORs ajustadas para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.8, OR 4,9 IC 95% 1,8-12,8 y 4,0 IC 95% 1,6-10,0, respectivamente) fueron equiparables a las de la diabetes mellitus (OR 4,9 IC 95% 1,6-15,6) y superiores a las de la dislipemia y la obesidad (OR 3,7 IC 95% 2,1-6,6 y OR 2,8, IC 95% 1,2-6,5, respectivamente) en el modelo ajustado para el resto de factores de riesgo (Tabla 4.1). Igualmente, el peso relativo ajustado de la presencia del alelo 4G fue algo menor del que supone la obesidad (Tabla 4.6, OR 2,2 IC 95% 1,2-4,1 y Tabla 4.1, OR 2,8, IC 95% 1,2-6,5, respectivamente).

Dada la posibilidad de síntesis de PAI-1 por parte del endotelio lesionado, su grado de implicación (como causa y/o como efecto) en la cardiopatía isquémica ha sido discutido desde hace años. En virtud de su diseño de casos y controles, el presente trabajo no permite discernir si un nivel elevado de PAI-1 es una causa del infarto de miocardio, un efecto de aquél o si se comporta simultáneamente como ambos, causa y efecto. Lo que sí permite afirmar es que:

Como se ha indicado previamente, los pacientes presentaron una mayor prevalencia del alelo 4G (Figura 4.2, $p=0,001$; Tabla 4.6).

- En el grupo de controles (grupo más “puro”) la presencia del alelo 4G se asoció a niveles más altos de PAI-1ag (Tabla 4.9, $p=0,010$).

- Esta relación no se cumple en los pacientes (Tabla 4.9, $p=0,775$), probablemente porque, en ellos, la síntesis de PAI-1 está incrementada o su metabolismo reducido por mecanismos 4G-independientes. En este sentido, la contribución del síndrome metabólico justificaría parcialmente la presencia de niveles mayores de PAI-1ag en el grupo de pacientes (se produce una reducción del 30% en la OR ajustada con el modelo 1 y se observan reducciones similares en el análisis por cuartiles, Tabla 4.7 y Tabla 4.8).

En definitiva, en el grupo de pacientes existe un sustrato genético que favorece la presencia de niveles incrementados de PAI-1 ya antes del desarrollo de cardiopatía isquémica clínica. Además, las variaciones circadianas de los niveles de PAI-1ag y PAI-1fc (máximas a primeras horas de la mañana) condicionarían un nivel de fibrinólisis endógena mínimo a estas horas [329] [330] que coinciden con el pico de máxima incidencia del infarto de miocardio [331]. Tras el debut de la cardiopatía isquémica, los factores de riesgo cardiovascular (entre los que se incluyen varios aspectos del síndrome metabólico) explican sólo parcialmente la presencia de unos niveles de PAI-1 aumentados en los pacientes, pues las diferencias con los controles siguen siendo estadísticamente significativas aún tras ajustar los resultados a la presencia de los factores de riesgo cardiovascular clásicos.

Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

De acuerdo con Morange PE y col [149], en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas en la distribución del polimorfismo C1040T del TAFI en los grupos de pacientes y controles (por genotipos en la Figura 4.3, $p=0,384$; por la presencia o ausencia del alelo T en la Figura 4.4, $p=0,920$; Tabla 4.10). De nuevo, la comprobación de que el polimorfismo C1040T del TAFI se

encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg aportó evidencia en contra de la existencia de estratificación en la población estudiada o de errores en el genotipado.

Independientemente del grupo clínico, la mayor presencia del alelo T se asoció con niveles menores de TAFIag (Tabla 4.13, $p < 0,001$). Estos hallazgos podrían deberse a la presencia de diferencias reales en la concentración de TAFIag o bien a una desigual reactividad de cada variante con los anticuerpos utilizados durante su cuantificación con técnica de ELISA [141]. Sea cual sea la causa de estas diferencias, en general se encontraron niveles mayores de TAFIag en los pacientes para cualquier genotipo (CC, CT o TT), aunque sin diferencias significativas (Tabla 4.13).

Se han publicado resultados contradictorios sobre el papel del TAFI en la cardiopatía isquémica. Por un lado, es razonable desde el punto de vista fisiopatológico que Silveira A y col [136] encontraran niveles aumentados de TAFIfc en los pacientes (estudio de casos y controles) y que Morange PE y col [148] observaran una mayor concentración de TAFIag en los sujetos que desarrollaban cardiopatía isquémica en el seguimiento (estudio de cohortes). Pero, sin embargo, también se han publicado datos discordantes [147] que otorgan a los niveles de TAFIag un papel protector frente al desarrollo de cardiopatía isquémica (estudio de casos y controles). En el presente trabajo de tesis doctoral no se observaron diferencias significativas en relación a los niveles de TAFIag (Tabla 4.11, $p = 0,811$) y los niveles de TAFIfc resultaron significativamente mayores en los pacientes en comparación con los controles (Tabla 4.11, $p < 0,001$), diferencias también significativas cuando estos niveles se normalizaron para la concentración de TAFIag en cada sujeto (Tabla 4.11, cociente TAFIfc/TAFIag, $p < 0,001$) y cuando estos resultados se ajustaron para los factores de riesgo cardiovascular y para la presencia del alelo T .

En un intento por comparar la contribución de los niveles elevados de TAFIfc (cuartil 3º versus 1º, y 4º versus 1º) en el riesgo de padecer un infarto de miocardio a edad precoz, es destacable señalar que sus ORs ajustadas para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.12, OR 4,1 IC 95% 1,5-38,0 y 6,6 IC 95% 1,8-24,2, respectivamente) fueron equiparables a las de otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión arterial (OR 5,5 IC 95% 2,3-13,1) y la diabetes mellitus (OR 4,9 IC 95% 1,6-15,6) y superiores a las de la dislipemia (OR 3,7 IC 95% 2,1-6,6) y

la obesidad (OR 2,8, IC 95% 1,2-6,5) en el modelo ajustado para el resto de factores de riesgo (Tabla 4.1).

Se sabe que la variante Ile/Ile correspondiente al genotipo TT del polimorfismo C1040T del gen del TAFI presenta una mayor estabilidad y capacidad hipofibrinolítica aún cuando se asocia con niveles menores de TAFIag [129, 130] y que parecen ser secundarias, en parte, a una diferente sensibilidad a la degradación habitual del TAFIa por la plasmina [117]. Por ello, el hallazgo de unos niveles aumentados de TAFIfc en los pacientes en comparación con los controles en el presente estudio podría haber sido ocasionada por una mayor representación del genotipo TT en los pacientes. Sin embargo, gracias al estudio simultáneo del polimorfismo C1040T se pudo comprobar que ésta no era la causa de las diferencias observadas en la concentración de TAFIfc (Figura 4.3, Figura 4.4 y Tabla 4.10).

La inquietud por buscar otras causas para el aumento de TAFIfc en pacientes condujo al análisis del papel del PCI, por su capacidad para frenar la producción de APC a partir de proteína C en presencia de concentraciones altas de trombomodulina (a) o para frenar la producción de TAFIa a partir de TAFI en presencia de concentraciones bajas de trombomodulina (b) (Figura 1.13). La concentración de trombomodulina no se puede cuantificar (por tratarse de un receptor de membrana endotelial, cuya parte soluble en sangre periférica puede no reflejar fielmente los niveles en el endotelio de arterias enfermas) pero se sabe que en arterias ateroscleróticas está disminuida. Por este motivo, para justificar los resultados comentados en el grupo de pacientes en la segunda situación planteada (concentraciones bajas de trombomodulina, b), deberían encontrarse niveles disminuidos de PCI inversamente proporcionales a los de TAFIa. Sin embargo, los niveles del PCI fueron mayores en el grupo de pacientes que en el de controles (Tabla 4.18, $p < 0,001$) y en el primer grupo no se observó una correlación negativa con los niveles de TAFIfc ($r = 0,066$ $p = 0,346$) ni tampoco una correlación positiva entre los niveles de APC y los niveles de TAFIfc ($r = 0,034$ $p = 0,650$). Todos estos datos sugieren que este mecanismo no debe haber jugado un papel importante en el incremento de los niveles de TAFIfc en los pacientes, si bien la técnica empleada para cuantificar el TAFIfc se basa en la activación *in vitro* del TAFI gracias a la adición de trombina y trombomodulina en exceso (donde la concentración de trombomodulina y de PCI del sujeto carecen de toda importancia) y no permite medir el TAFIa circulante *in vivo*. El desarrollo de prometedoras técnicas de ELISA destinadas a cuantificar el TAFIa o

el péptido liberado durante su activación (con mayor estabilidad) permitirán solventar estas limitaciones^{VII}. Finalmente, el hallazgo de unos niveles reducidos de APC en los pacientes podría justificar, en cierta medida, que la activación del TAFI *in vivo* estuviera favorecida por disponer de mayor generación de trombina, el mayor activador del TAFI.

Aunque desde el descubrimiento del TAFI no han faltado artículos explorando su papel en distintas patologías con desequilibrio hemostático, hasta 2003 ninguno de ellos se centró en el estudio simultáneo de los niveles de TAFIag y de TAFIfc, de los genotipos del polimorfismo C1040T y otros parámetros relacionados. En ese año, la publicación de resultados parciales de esta tesis [332] lanzó la hipótesis de que, en situaciones de hipofunción fibrinolítica, el TAFI una vez activado a TAFIa goza de una mayor vida media (porque disminuye su degradación habitual vía plasmina) que refuerza más el ambiente hipofibrinolítico inicial. Siguiendo esta línea, poco después Leurs J y col [333] apoyaron este concepto argumentando que el TAFIa es capaz de inhibir la fibrinólisis siempre y cuando supere una concentración umbral tPA-dependiente. Así, con concentraciones menores de tPA (hipofibrinólisis) el umbral de TAFIa necesario para que éste pueda exhibir su función antifibrinolítica será más bajo [333]. La presente tesis doctoral muestra una correlación positiva, aunque modesta, entre el TAFIfc y el TLE ($r=0,206$ $p=0,004$) y entre el TAFIfc y el PAI-1ag ($r=0,162$ $p=0,020$) que traduce la presencia de mayores niveles de TAFIfc en ambientes hipofibrinolíticos (con escasa generación de plasmina). Esta hipofibrinólisis se refleja en TLE alargados y podría estar mediada por diversos mecanismos [como por ejemplo, aumento de PAI-1 o de Lp(a), entre otros]. En estas circunstancias se justifica una menor degradación del TAFIa por parte de su principal inactivador, la plasmina [117] y, secundariamente, se potencia el círculo de retroalimentación positiva (pues los niveles aumentados de TAFIfc disminuyen todavía más la generación de plasmina y ocasionan una mayor hipofibrinólisis). Finalmente, el hallazgo simultáneo de una menor concentración de APC en pacientes (Tabla 4.16, $p<0,001$), uno de los inhibidores de la coagulación más importantes *in vivo*, sugiere que en ellos existe, asimismo, un estado procoagulante con mayor generación de trombina, el principal activador del TAFI, que podría favorecer su activación a TAFIa.

^{VII} El subcomité del Comité científico de estandarización 2003-2004 de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (<http://www.med.unc.edu/isth/SSC/04sscminutes/04fibrinolysis.html>), consciente de ello está trabajando en el tema.

Otros parámetros fibrinolíticos

De la comparación realizada entre pacientes y controles se desprende que en los primeros existe una hipofunción del sistema fibrinolítico que queda reflejada en un alargamiento significativo del TLE ($p < 0,001$), incluso tras ajustar estos resultados para los factores que se correlacionan con el TLE en el grupo de controles (el “más sano”) ($p = 0,029$). A este ambiente hipofibrinolítico observado en pacientes contribuye significativamente el aumento de los niveles funcionales de dos importantes inhibidores de la fibrinólisis, el PAI-1 y el TAFI (Figura 4.5), entre otros. El hecho de que el TLE no se correlacione con el TAFI en controles pero sí en pacientes sugiere que, sólo en estos últimos, algún factor diferente al TAFI [como por ejemplo, aumento de PAI-1 o de Lp(a), entre otros] provoca una hipofibrinólisis que alarga el TLE y, secundariamente, incrementa los niveles de TAFI (por disminución de su degradación habitual por plasmina).

De nuevo los niveles de fibrinógeno resultaron significativamente mayores en los pacientes que en los controles ($p < 0,001$), incluso tras ajustar estos resultados para los factores de riesgo cardiovascular que se correlacionaron con ellos en el grupo de controles (tabaquismo e hipertensión arterial) ($p = 0,003$). El fibrinógeno presenta indudable actividad proaterogénica por un lado [292, 293, 296, 297] y, por otro, se expresa como un reactante de fase aguda y marcador de un sustrato inflamatorio crónico, la aterotrombosis [294]. Por este motivo, a la presencia de unos niveles elevados de fibrinógeno en los pacientes se le puede otorgar un papel simultáneo como causa y como efecto de la cardiopatía isquémica.

En los grupos clínicos estudiados en esta tesis doctoral no hubo diferencias significativas en los valores de tPAag (Figura 4.5, $p = 0,315$). Estos resultados discrepan de los publicados por Ridker PM y col, quienes encontraron una asociación significativa entre unos niveles aumentados de tPAag y el desarrollo de infarto de miocardio en un estudio prospectivo [334]. La causa de este desacuerdo podría encontrarse en diferencias epidemiológicas de los sujetos estudiados y en las diferencias en el tratamiento de los sujetos enrolados (aparentemente libres de enfermedad cardiovascular clínicamente manifiesta y enrolados antes de 1993 en el estudio de Ridker y con infarto de miocardio incluidos posteriormente a septiembre de 2000 en la presente tesis doctoral). Así, puesto que en este trabajo los sujetos estudiados fueron más jóvenes (menores de 51 años frente a la edad más avanzada

del estudio citado, 40-84 años) y el uso de estatinas y antiagregantes entre los pacientes estuvo muy extendido (71,2% y 89,2% respectivamente, en esta tesis), es razonable suponer que la función endotelial en los pacientes de esta tesis doctoral podría estar más preservada, hecho que justificaría una menor expresión de tPAag [335].

Finalmente, se han descrito modificaciones del sistema hemostático secundarias a cambios en los hábitos de vida (tabaquismo, índice de masa corporal y actividad física, entre otros) [336]. Si bien es cierto que esos cambios de hábitos de vida podrían haber modificado el perfil hemostático de nuestros pacientes tras la aparición de un primer infarto de miocardio, los habrían cambiado, en su caso, para mejor. Por ejemplo, aunque el tabaquismo aumenta los niveles de PAI-1fc, de fibrinógeno y de tPAag, habitualmente los sujetos que tienen un infarto o bien siguen fumando en la evolución o abandonan este hábito y, lo que no es habitual, es que un no fumador cambie de estatus tras un infarto de miocardio. Así, las diferencias encontradas en estas variables podrían incluso haber sido mayores en caso de haberse determinado antes del desarrollo del infarto de miocardio. Una circunstancia similar es la relativa al aumento de peso reflejado en un mayor índice de masa corporal, pues se sabe que se asocia a incrementos tanto en el PAI-1 como en el fibrinógeno [337], no mediados por cambios en la actividad física diaria. Si el desarrollo de un primer infarto de miocardio llevara consigo cambios dietéticos que ocasionaran un incremento de índice de masa corporal, se justificaría parcialmente el aumento de estos parámetros en el grupo de pacientes estudiados. Pero, de nuevo, no parece lógico que los sujetos que desarrollan un infarto de miocardio aumenten de peso por una vía no relacionada con la actividad física, pues precisamente suelen mejorar sus hábitos dietéticos tras el evento. Así, las diferencias encontradas en el PAI-1fc y el fibrinógeno podrían incluso haber sido mayores en caso de haberse determinado antes del desarrollo del infarto de miocardio.

5.2.1.2. LIPOPROTEÍNA (a)

La isoforma de apo(a) de bajo peso molecular fue significativamente más prevalente en el grupo de pacientes que en el de controles (Figura 4.6, $p < 0,001$) y supuso una OR de 2,4 (Tabla 4.14), apoyando los hallazgos de Rifai N y col en relación al desarrollo de angina pectoris [186]. En virtud de su carácter genéticamente determinado y no modificable, estos resultados permiten otorgarle un papel causal en el desarrollo de cardiopatía isquémica a edad precoz, probablemente por su mayor potencial hipofibrinolítico a igualdad de niveles de Lp(a) [172] y a su asociación con niveles elevados de Lp(a) [155, 158, 159].

Los niveles de Lp(a), ya sean analizados como variable continua o como variable dicotómica, se asociaron a la presencia de infarto de miocardio a edad precoz, incluso cuando estos resultados se ajustaron para los factores de riesgo cardiovascular y para la isoforma de apo(a) mayoritaria (Tabla 4.15). En el primer caso la OR se incrementó alrededor de un 60% por cada aumento de 10,8 mg/dl (1 desvío estándar en controles) en la concentración de Lp(a) y en el segundo las ORs fueron de 4,6, 3,8 y 3,1 según los análisis no ajustado, ajustado con el modelo 1 y ajustado con el modelo 2 (Tabla 4.15). Además, al analizar comparativamente el peso relativo de los niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl con o sin la presencia de la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular (Tabla 4.16), se confirmó que los niveles de Lp(a) influyen más en el riesgo de presentar infarto de miocardio a edad precoz que la isoforma mayoritaria de apo(a). Estos resultados, no obstante, discrepan de los que otorgan un papel preponderante a las isoformas de apo(a) de bajo peso molecular en la cardiopatía isquémica [186].

A la hora de comparar el peso relativo de los niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl en el riesgo de padecer un infarto de miocardio a edad precoz, es destacable señalar que su OR ajustada para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.15, OR 3,5, IC 95% 1,7-7,5) fue equiparable a la de la dislipemia (OR 3,7, IC 95% 2,1-6,6) y superior a la de la obesidad (OR 2,8, IC 95% 1,2-6,5) en el modelo ajustado para el resto de factores de riesgo (Tabla 4.1).

Aunque, en general, se acepta que los niveles de Lp(a) están genéticamente determinados, algunas publicaciones han sugerido modestas disminuciones de Lp(a)

con determinados fármacos, como son la aspirina [201], el tratamiento hormonal sustitutivo en mujeres menopáusicas [202], la niacina [203], la L-carnitina [204] o el ácido ascórbico con L-lisina [205]. Las estatinas, por otra parte, han tenido efectos contradictorios en los niveles de Lp(a), aumentándolos en unos estudios [206] o disminuyéndolos en otros [207]. En el presente trabajo ningún participante llevaba tratamiento hormonal sustitutivo, niacina, L-carnitina o ácido ascórbico con L-lisina. Sin embargo, la gran mayoría de los pacientes tomaba estatinas (71,2%) y aspirina (89,2%). Con todas las limitaciones que supone el hecho de no tratarse de un estudio de intervención farmacológica que analice cada sujeto antes y después de tomar un medicamento, comparamos los niveles de Lp(a) en los diferentes subgrupos de pacientes según tomaran o no estos fármacos. Sólo se encontraron diferencias significativas en cuanto al tratamiento con aspirina, siendo los niveles de Lp(a) menores en aquellos pacientes que tomaban este fármaco ($p=0,042$). Si realmente el tratamiento con aspirina fue la causa de esas diferencias o no, es una pregunta abierta. De cualquier manera, dado que este fármaco tiene un uso tan extendido entre los pacientes y no entre los controles, en caso de haber rebajado los niveles de Lp(a) no habría hecho sino suavizar unas diferencias, ya estadísticamente significativas, a favor de mayores niveles de Lp(a) en el grupo de pacientes, reforzando todavía más las observaciones de la presente tesis doctoral.

De nuevo, al tratarse de un diseño de casos y controles, merece la pena cuestionarse el grado de implicación de los niveles de Lp(a) en la cardiopatía isquémica, causa o efecto. Los datos de la literatura apoyan que están genéticamente determinados por el tamaño de la isoforma de apo(a), en particular por el número de kringles tipo IV [155, 158, 159], por lo que difícilmente podrían haber aumentado significativamente tras un infarto de miocardio. Si bien es cierto que en ocasiones se ha sugerido que la Lp(a) puede expresarse en cierto modo como un reactante de fase aguda [188, 189], al haber asegurado un período mínimo de estabilidad clínica de 3 meses antes de la extracción de sangre en la que se cuantificaron sus niveles, se evitó razonablemente que este efecto pudiera jugar un papel relevante.

5.2.1.3. SISTEMA DE LA COAGULACIÓN: PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE, FACTOR V LEIDEN Y MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA

Proteína C activada circulante

Los pacientes presentaron niveles de APC significativamente menores que los controles (Figura 4.8, $p < 0,001$) [338]. Estas diferencias supusieron un incremento de la OR del 60% por cada disminución de APC de 0,43 ng/ml, que se suavizó al 30% cuando se ajustó para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.17) y al 20% cuando se incorporaron en el modelo determinadas variables que, al menos fisiopatológicamente, podrían influir en la asociación entre APC y el infarto de miocardio (fibrinógeno, proteína C reactiva, fragmento 1+2 de la protrombina, proteína C antigénica y presencia de defectos trombofílicos). El análisis de las diferencias entre pacientes y controles tomando la APC como variable discreta (cuartiles) confirmó estos resultados, con una OR de 3,6 para los sujetos localizados en el cuartil inferior (1º) en comparación con el 4º cuartil (situación de menor riesgo). Esta OR se redujo ligeramente manteniendo las diferencias estadísticamente significativas al ser ajustada para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.17). Los cuartiles 2º y 3º presentaron, asimismo, un riesgo incrementado con respecto al 4º cuartil, con una p para la tendencia entre cuartiles de 0,005. La pérdida de significación estadística en los modelos ajustados (tanto para la APC como variable continua como para los cuartiles de APC) podría deberse, al menos en parte, a la fragmentación del tamaño muestral que supone introducir tantas variables en los modelos multivariantes.

En un intento por comparar el peso relativo de la APC en el riesgo de padecer un infarto de miocardio a edad precoz, es destacable señalar que la OR derivada de la comparación del 1º y el 4º cuartil de APC ajustada para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.17, OR 2,2, IC 95% 1,1-4,2) fue similar a la de la obesidad (OR 2,8, IC 95% 1,2-6,5) en el modelo ajustado para el resto de factores de riesgo (Tabla 4.1).

La proteína C es un zimógeno que necesita ser activado para poder exhibir su acción anticoagulante, profibrinolítica, antiinflamatoria y antiapoptótica. Este proceso de activación tiene lugar en la superficie de las células endoteliales, cuando la trombina, la proteína C y sus respectivos receptores celulares, la trombomodulina y el EPCR, se ensamblan en un complejo macromolecular que genera eficientemente la enzima activa, la APC [339]. La correlación negativa observada entre los niveles de proteína C reactiva y los niveles de APC en el grupo de controles ($r = -0,269$, $p < 0.001$) sugiere que la presencia de unos niveles reducidos de APC pueden inducir el inicio o favorecer la perpetuación de un estado proinflamatorio basal en situaciones preclínicas, efecto fundamentalmente debido a la pérdida de su acción antiinflamatoria natural (Figura 5.1). La correlación inversamente proporcional observada en controles se pierde en pacientes ($p = 0,192$) porque en ellos, probablemente, intervienen otros muchos factores que potencian el nivel inflamatorio dado por la enfermedad aterotrombótica ya clínicamente manifiesta. La íntima relación entre niveles bajos de APC, inflamación y aterotrombosis es especialmente atractiva porque se potencian dentro de un círculo vicioso que genera niveles reducidos de APC y favorece los fenómenos inflamatorio y aterotrombótico (Figura 5.1). Parte de esta interrelación se explica porque en las arterias enfermas se expresa menos EPCR y trombomodulina por la presencia de placas de ateroma [341] y por la acción combinada de unos niveles altos de colesterol LDL y bajos de colesterol HDL [342], entre otros. A pesar de todas estas observaciones, el mecanismo exacto por el que la APC ejerce su actividad antiinflamatoria no ha sido esclarecido totalmente, si bien esta actividad parece estar parcialmente mediada por el factor nuclear $\kappa\beta$ [239, 240] y generalizada en cualquier parte del organismo reduciendo, por ejemplo, la inflamación miocárdica secundaria a cirugía cardíaca [340].

Por otro lado, la inflamación en sí misma también puede disminuir la acción antitrombótica de la APC, en particular, a través de dos mecanismos (Figura 5.1): el aumento de la concentración del fragmento C4b-BP (que, entre otras acciones, secuestra proteína S, cofactor de la APC y le impide ejercer su actividad antitrombótica [216, 217]) y el aumento de los niveles de fibrinógeno como marcador de inflamación (recientes estudios *in vitro* y en sujetos sanos han demostrado que los niveles elevados de fibrinógeno compiten con la trombomodulina por ensamblarse con la trombina por el mismo sitio de unión

(región exosite I), resultando en una menor disponibilidad de los complejos trombina:trombomodulina para la generación de APC [343]). Este último mecanismo podría explicar, al menos parcialmente, el conocido riesgo de trombosis arterial asociado a niveles elevados de fibrinógeno, efecto ratificado en los resultados de esta tesis (Figura 4.5), pues los niveles de fibrinógeno resultaron significativamente mayores en el grupo de pacientes que en el de controles ($p < 0,001$), incluso en el análisis multivariante ($p = 0,003$).

La mayoría de los pacientes tomaban aspirina y estatinas, tal y como se ha comentado en el apartado dedicado a la Lp(a), y ambos fármacos pueden influir en el estado inflamatorio y hemostático de los sujetos en tratamiento. En particular, la modulación de los niveles de APC por las estatinas se basa en un aumento en la expresión de trombomodulina [344, 345] y en una mayor velocidad de inactivación del factor Va por parte de la APC [346]. Sin embargo, puesto que los niveles de APC fueron similares en los pacientes, independientemente del tratamiento con estos dos fármacos ($p = 0,561$ y $p = 0,765$, respectivamente), con las limitaciones que puede tener este tipo de análisis, estos resultados sugieren que las diferencias observadas entre pacientes y controles no se deben al efecto de las estatinas y la aspirina. Es más, el efecto antiinflamatorio de estos fármacos podría, incluso, haber aumentado los niveles de la APC en el grupo de pacientes, por lo que las diferencias observadas podrían incluso haber sido mayores en caso de haberse podido cuantificar sin efecto farmacológico.

A continuación, la Figura 5.1 muestra un esquema con la relación causa-efecto bidireccional entre inflamación y niveles bajos de APC y cómo se desencadenan modificaciones en cadena en la coagulación, la fibrinólisis y la apoptosis que pueden potenciar la retroalimentación positiva de esta cascada de acontecimientos.

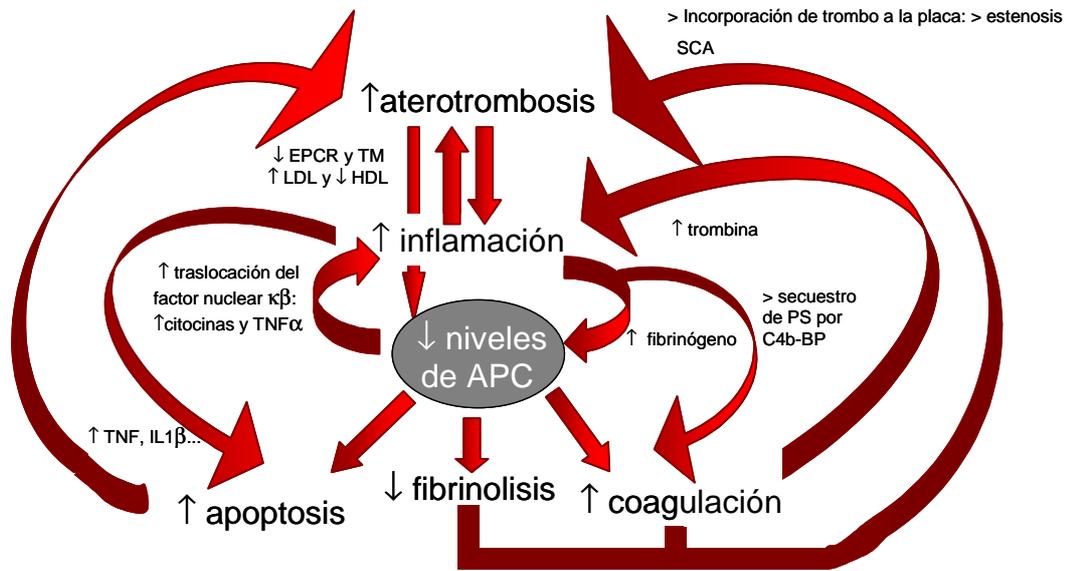


Figura 5.1. Efectos encadenados entre inflamación, coagulación, fibrinólisis y apoptosis. Papel central de unos niveles bajos de APC. La presencia de unos niveles bajos de APC puede ser responsable un bajo grado de inflamación persistente que induzca el desarrollo de aterosclerosis precoz. A continuación, las relaciones de retroalimentación positiva se encargarían de magnificar el efecto. Aún en el caso de que los bajos niveles de APC fueran consecuencia (y no causa) de un cierto grado de aterosclerosis, colaborarían a exacerbar la cascada de acontecimientos. APC: proteína C activada circulante; TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina; EPCR: receptor endotelial de la proteína C; SCA: síndrome coronario agudo.

El hallazgo de unos niveles disminuidos de APC da paso al análisis de su causa: a) una mayor inhibición de la APC o b) una menor generación de APC. Varios hechos sugieren que la concentración reducida de APC en los pacientes se debe a una disminución en su generación, más que a un aumento en su inhibición secundaria al aumento de la concentración de los inhibidores de la APC. Por una parte, no se observó una correlación negativa significativa entre los niveles de estos inhibidores y los de APC, sino al contrario, una correlación positiva, estadísticamente significativa en el caso del PCI (correlación de Spearman APC y PCI, $r=0,138$ $p=0,037$ y APC y α_1 -antitripsina, $r=0,019$ $p=0,776$). Y, por otra parte, la concentración de sus formas acomplejadas (APC:PCI y APC: α_1 -antitripsina) fueron menores en los pacientes que en los controles ($p=0,005$ y $p=0,006$, respectivamente). Así pues, deben buscarse otros mecanismos diferentes a un aumento en su inactivación para explicar la presencia de unos niveles de

APC disminuidos entre los pacientes. Por ejemplo, disfunciones cuantitativas o cualitativas de algunas de las proteínas implicadas en el proceso de activación de la proteína C podrían suponer una reducción en la generación final de APC. En este trabajo, no obstante, se descartó una disminución en la generación de APC ocasionada por deficiencias de trombina, pues los niveles del fragmento 1+2 de la protrombina, marcador de la generación de trombina, fueron incluso mayores en el grupo de pacientes que en el de controles ($p=0,024$). Por otra parte, tampoco se observaron diferencias en la concentración de proteína C antigénica al comparar ambos grupos ($p=0,261$) ni diferencias significativas en el número de casos de deficiencias de proteína C (Tabla 4.18, $p=1,000$), por lo que la descripción de varios casos de trombosis arterial [255] y, en particular coronaria [256], en pacientes con deficiencia hereditaria de proteína C no parece jugar un papel relevante en los resultados del presente trabajo de tesis doctoral. En la línea de trabajos publicados previamente [224, 308] los niveles de APC en los controles fueron proporcionales a los de la proteína C antigénica de forma significativa ($r=0,224$, $p<0,001$). La falta de correlación entre los niveles de APC y de proteína C antigénica en el grupo de pacientes sugiere que en ellos deben existir otros mecanismos que podrían modificar a la baja la relación natural entre zimógeno y enzima, quizás relacionados con otras de las proteínas necesarias o con el mecanismo íntimo de activación de la proteína C a APC. De ser así, se reforzarían las observaciones de algunos autores que han descrito algunas mutaciones en el gen de la trombomodulina [260] y en el gen del EPCR [261] asociadas a trombosis arterial. En este sentido, el grupo de trabajo en el que colabora la doctoranda ha abierto una nueva línea de investigación centrada en el descubrimiento de polimorfismos del EPCR que pudieran reducir la función de este receptor y, por tanto, disminuir la velocidad de activación de la proteína C a APC, con el consiguiente incremento de riesgo trombótico. Finalmente, otros factores no estrictamente genéticos también podrían modular la velocidad de generación de APC, dato apoyado por la reciente descripción de autoanticuerpos contra el EPCR asociados a infarto de miocardio en mujeres jóvenes [347].

Factor V Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina

Estos reconocidos factores de riesgo de trombosis venosa [265, 266] estuvieron representados por igual en el grupo de pacientes con infarto de miocardio a edad precoz y en el grupo de controles (Figuras 4.9 y 4.10, $p=1,000$ y $p=0,801$, respectivamente) con cifras dentro de las esperables en nuestra área geográfica [262]. Estos resultados son concordantes con algunos trabajos que previamente cuestionaron su implicación en la cardiopatía isquémica [267-270] a pesar de ocasionar hipercoagulabilidad y brindar protección inicial trombo formado promocionando la inhibición de la fibrinólisis (vía TAFI) [264, 273].

En el presente trabajo de tesis doctoral no se registró a ningún portador simultáneo de estas dos mutaciones, situación con riesgo incrementado de infarto de miocardio [13] en virtud de una interacción gen-gen, por la que los portadores de dos mutaciones experimentan un incremento del riesgo superior a la que supondrían cada una de ellas por separado [303].

5.2.2. MARCADORES DE EXTENSIÓN Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD CORONARIA Y/O DEL DESARROLLO DE EVENTOS EN LA EVOLUCIÓN.

5.2.2.1. SISTEMA FIBRINOLÍTICO: INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1 E INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVABLE POR TROMBINA

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1

A la luz de los resultados mostrados, ni el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1 (Figura 4.11, $p>0,05$ para todos los scores analizados) ni los niveles de PAI-1ag o de PAI-1fc (Figura 4.12, $p>0,05$ para todos los scores analizados) guardaron relación con la presencia de lesiones, con el número de vasos afectados o con la extensión-severidad de la aterosclerosis coronaria, si bien se observó una tendencia no significativa entre los niveles altos de PAI-1fc y la presencia de lesiones coronarias (Figura 4.12, $p=0,093$).

Aunque la asociación del alelo 4G con el desarrollo de eventos trombóticos en el seguimiento no fue significativa, se observó una tendencia entre la presencia de este alelo y el reingreso ($p=0,126$) o el evento combinado ($p=0,103$) (Figura 4.13). Finalmente, también se detectó una tendencia no estadísticamente significativa entre los niveles elevados de PAI-1ag y los reingresos y los eventos combinados ($p=0,154$ y $p=0,169$) (Figura 4.13).

Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina

Ni el polimorfismo C1040T del gen del TAFI (Figura 4.14) ni los niveles de TAFI (antigénico o funcional) (Figura 4.15) se correlacionaron con los perfiles angiográficos de afectación coronaria. Estos datos son coincidentes con los de Schroeder V y col, quienes no encontraron correlación entre los niveles de TAFIag (intracoronarios y venosos) y tres evaluaciones coronariográficas, la presencia de lesiones angiográficas (definiendo presencia como estenosis $\geq 20\%$), el número de vasos afectados (0-3 vasos) y el número de placas de ateroma identificadas (agrupadas en 4 categorías) [348].

La única referencia disponible en cuanto a la evolución clínica, es la que relaciona la refractariedad al tratamiento médico con la presencia de niveles elevados de TAFIag en pacientes con enfermedad coronaria [150]. En esta tesis doctoral no se encontraron asociaciones significativas entre la presencia del alelo T o los niveles elevados de TAFI con una mayor tasa de eventos en el seguimiento.

5.2.2.2. LIPOPROTEÍNA (a)

La isoforma de apo(a) de bajo peso molecular no se relacionó con los diferentes patrones de afectación coronaria (Figura 4.16). Estos resultados discrepan de las observaciones de otros autores que encontraron asociaciones significativas entre la isoforma de apo(a) de bajo peso molecular y los patrones de afectación coronaria [196, 197].

Sin embargo, los niveles de Lp(a) ≥ 30 mg/dl sí mostraron una clara y significativa asociación con la presencia de lesiones coronarias ($p=0,007$), con el número de vasos afectados ($p=0,009$) y con la severidad-extensión de la aterosclerosis coronaria ($p=0,002$), asociación verificada al tratar la Lp(a) como variable continua en este último score ($p=0,030$) (Figura 4.17). Estos resultados se mantuvieron aún cuando se estudiaron sólo aquellos pacientes con intervalos de tiempo inferiores a 6 meses entre la determinación plasmática y el estudio coronariográfico (Figura 4.18) y han sido recientemente aceptados para su publicación [349].

Si, como se vio previamente, las isoformas de apo(a) de bajo peso molecular se asocian significativamente con niveles de Lp(a) elevados (Figura 4.7), es llamativa, al menos inicialmente, la discrepancia observada en la relación de dicha isoforma o los niveles elevados de Lp(a) con la afectación coronariográfica (sin asociación en el primer caso, con asociación en el segundo caso). Una explicación podría radicar en el porcentaje de sujetos que simultáneamente expresan isoformas de apo(a) de alto y bajo peso molecular, que al tener una banda predominante de bajo peso molecular son catalogados como apo(a) de bajo peso molecular. Estos individuos mostrarían niveles de Lp(a) menores que los de aquellos sujetos que exclusivamente expresaran isoformas de apo(a) de bajo peso molecular. Si precisamente esos individuos con mezcla de isoformas de alto y bajo peso molecular no presentaran patrones coronarios tan desfavorables como aquellos que sólo expresan isoformas de bajo peso molecular podrían ensombrecer la asociación de las isoformas de apo(a) de bajo peso molecular y los patrones coronariográficos más desfavorables. Para verificar esta hipótesis se excluyó del análisis a los sujetos con isoformas de alto y bajo peso molecular ($N=26$) y se encontró una asociación significativa entre la presencia de isoformas de bajo peso molecular y la presencia de lesiones angiográficas ($p=0,049$), aunque la asociación con las otras dos valoraciones angiográficas no fue tan evidente (Figura 4.16).

Analizando detenidamente la relación de la Lp(a) con los patrones más desfavorables de afectación coronaria (presencia de lesiones, enfermedad de tres vasos y aterosclerosis grave), se comprobó una asociación significativa con la aterosclerosis grave (Tabla 4.20, $p=0,001$, OR 1,4 IC 95% 1,2-1,8 para cada incremento de 11,8 mg/dl en su concentración), que resultó inalterada cuando se ajustó para los factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.20). Este mismo análisis tomando la Lp(a) como variable dicotómica mostró una asociación significativa de la Lp(a) ≥ 30 mg/dl con la presencia de lesiones coronarias y con la presencia de aterosclerosis grave (Tabla 4.20,

OR 9,9 IC 95% 1,3-75,6 y OR 3,2 IC 95% 1,4-7,3, respectivamente) que se suavizó ligeramente al ajustar para los factores de riesgo cardiovascular aunque sin perder la significación estadística (Tabla 4.20). Por tanto, a la luz de estos resultados y de las curvas ROC mostradas en la Figura 4.19, los niveles de Lp(a) parecen reflejar el grado de afectación anatómica y ser mejor marcador de aterosclerosis coronaria grave (ABC=0,651, p=0,010) que de lesiones coronarias (ABC=0,586 p=0,173) o de enfermedad de tres vasos (ABC=0,554 p=0,346).

A pesar de las divergencias respecto a la asociación de la Lp(a) con el patrón de aterosclerosis coronaria [191, 198], los resultados de esta tesis demuestran su asociación significativa en fase clínica estable con los resultados de la coronariografía en pacientes jóvenes con infarto de miocardio.

La Tabla 4.21 permite concretar la aplicación práctica de estos resultados:

- Alto valor predictivo positivo del punto de corte de 30 mg/dl para la detección de lesiones coronarias angiográficamente significativas (98%):
 - Ciñéndonos al diseño del estudio, se puede afirmar que si un paciente de nuestro entorno con infarto de miocardio y menor de 51 años presenta niveles de Lp(a) superiores a 30 mg/dl tendrá una probabilidad del 98% de presentar lesiones coronarias. Si se opta por el manejo de estratificación de riesgo postinfarto y no por un manejo agresivo de entrada, sería información que podría decantar la opinión del clínico hacia la realización de una coronariografía en aquellos pacientes jóvenes con algún resultado dudoso (test de esfuerzo no concluyente o fracción de eyección del ventrículo izquierdo en el límite bajo de la normalidad, por ejemplo). Este subgrupo de pacientes podría beneficiarse de una visión directa de su patrón de árbol coronario para valorar las opciones reales de revascularización coronaria sobre las lesiones persistentes tras el tratamiento trombolítico. Sin embargo, dado que en este diseño los niveles de Lp(a) se cuantificaron en fase clínica estable (al menos 3 meses tras el evento agudo) habría que tomar con precaución una $Lp(a) \geq 30$ mg/dl determinada durante la fase aguda del infarto, puesto que, al tener un cierto comportamiento como reactante de fase aguda, podría ser mayor de la habitual del paciente.

- Por otra parte, dada la alta tasa de predeterminación genética de sus niveles en fase estable, es presumible que esta concentración de Lp(a) en fase estable sea similar a la que ese mismo sujeto tenía antes del debut de la cardiopatía isquémica. Extrapolando estos comentarios a los sujetos remitidos para estudio ambulatorio, este alto valor predictivo positivo para la identificación de lesiones coronarias podría ser considerado un dato más a tener en cuenta en la valoración de dolores torácicos no concluyentes. En ellos, una $Lp(a) \geq 30$ mg/dl podrían ser una luz de alarma para poner en marcha pruebas específicas más dirigidas al diagnóstico y estratificación de riesgo de la isquemia miocárdica. En caso de que el estudio no invasivo resultara normal, la detección de una $Lp(a) \geq 30$ mg/dl también podría ser útil en el seguimiento posterior, para controlar más estrechamente los factores de riesgo cardiovascular modificables.
- Alto valor predictivo negativo para la identificación de enfermedad de tres vasos (85%) y de aterosclerosis coronaria grave (89%):
- Ciñéndonos al diseño del estudio, sería información poco útil para decantar la opinión del clínico hacia la no realización de una coronariografía, puesto que si la estratificación de riesgo ha resultado positiva, el hallazgo de una $Lp(a) < 30$ mg/dl no debería modificar aisladamente la decisión clínica de realizar una coronariografía. Esto es así a pesar de que, según estos resultados, exista una probabilidad del 85% de no tener enfermedad de tres vasos y un 89% de probabilidades de no tener aterosclerosis grave, pues el objetivo no es diagnosticar y tratar las lesiones anatómicas sino funcionalmente en riesgo de complicarse, independientemente del número de vasos afectados y/o de la extensión de la aterosclerosis coronaria. Valga a modo de ejemplo la enfermedad de tronco común, con clara indicación de revascularización dada la localización estratégica de la placa de ateroma, y no de la extensión de la enfermedad coronaria. Así, podría darse el caso de sujetos con este patrón y con $Lp(a) < 30$ mg/dl correctamente identificados sin enfermedad de tres vasos y sin aterosclerosis grave a la vez que otros, con enfermedad de tres vasos (por ejemplo con lesiones en una arteria diagonal, una segunda marginal y la interventricular posterior) pero sin afectación proximal de las arterias coronarias principales, son catalogados con patrón desfavorable (enfermedad de tres vasos y aterosclerosis coronaria grave) por tener niveles de $Lp(a) \geq 30$ mg/dl. Este ejemplo ilustra la ausencia de justificación para dejar de hacer una coronariografía a los primeros.

Finalmente, la falta de asociación significativa entre los niveles de Lp(a) y los eventos trombóticos en la evolución (Figura 4.20) sugiere que, a 30,7 meses de seguimiento medio, el papel deletéreo (proaterogénico e hipofibrinolítico) de la Lp(a) no tiene entidad suficiente para marcar la evolución de los pacientes jóvenes con infarto, buena en general.

5.2.2.3. SISTEMA DE LA COAGULACIÓN: PROTEÍNA C ACTIVADA CIRCULANTE, FACTOR V LEIDEN, MUTACIÓN G20210A DE LA PROTROMBINA

Proteína C activada circulante

Además de haber demostrado que la APC es un buen marcador de riesgo de infarto de miocardio a edad joven, la presencia de unos niveles disminuidos de APC también se correlacionó significativamente con los distintos patrones coronariográficos en el grupo de pacientes, según los tres scores utilizados para cuantificarlos (Figura 4.21) y estos resultados se mantuvieron aún cuando se estudiaron sólo aquellos pacientes con retrasos inferiores a 6 meses entre la determinación plasmática y el estudio coronariográfico (Figura 4.22). De esta manera, en presencia de menores niveles de APC se documentó mayor afectación coronaria [338]. Esta información, totalmente inédita en la literatura, refuerza todavía más la teoría que apoya el papel protector de la APC debido a su actividad anticoagulante, antiinflamatoria y antiapoptótica.

Tanto los niveles de APC [224] como la concentración de los complejos APC:PCI y APC: α_1 antitripsina [350] presentan una alta tasa de heredabilidad. Basándonos en estas observaciones, los valores de APC previos al desarrollo del infarto se deben suponer similares a los cuantificados en este estudio. En este sentido, los valores de APC podrían servir como información añadida de interés especialmente en prevención primaria con el fin de controlar más estrechamente a aquellos sujetos con factores de riesgo modificables y niveles bajos de APC.

Factor V Leiden y mutación G20210A del gen de la protrombina

La falta de asociación de estas características genéticas con el patrón de enfermedad coronaria o con el desarrollo de eventos trombóticos en la evolución concuerda con los resultados negativos comentados como marcadores de infarto de miocardio a edad precoz. Con las limitaciones derivadas del escaso número de pacientes con estas mutaciones, estos resultados sugieren que el factor V Leiden y la mutación G20210A del gen de la protrombina no están implicados en el inicio y progresión del fenómeno aterotrombótico.

5.3. DISCUSIÓN FINAL

Esta tesis doctoral documenta diferencias significativas en algunos aspectos genéticos relacionados con las variables seleccionadas, pues tanto la presencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 como la presencia de isoformas de apo(a) de bajo peso molecular fueron significativamente más prevalentes en los pacientes que en los controles. Esta circunstancia apoya la idea de que un sustrato genético desfavorable desde el punto de vista coronario podría favorecer ambos componentes de la aterotrombosis (el aterosclerótico y el trombótico asociado) bien de forma independiente o modulando el efecto de los reconocidos factores de riesgo cardiovascular (interacción gen-medio ambiente) (Figura 5.2, A). El papel de estos últimos, sin embargo, es fundamental en el inicio y desarrollo de esta enfermedad (Figura 5.2, B).

Asimismo, la presente tesis doctoral constata diferencias significativas en el equilibrio hemostático plasmático de pacientes jóvenes con infarto de miocardio y de sujetos controles, pues los primeros presentan menor potencial fibrinolítico [niveles incrementados de PAI-1, TAFI y L(a)] y anticoagulante (menores niveles de APC). Además, la participación de distintos factores implicados en la actividad antiinflamatoria (APC) y proaterogénica [Lp(a)] de cada individuo justificaría aún más su efecto deletéreo para el desarrollo de un infarto de miocardio (Figura 5.2, C), evento agudo donde subyace un desequilibrio manifiesto entre coagulación y fibrinólisis sobre una placa complicada. Con estos resultados puede intuirse un papel causal de los niveles plasmáticos de estos factores en la fisiopatología del infarto de miocardio puesto que las variables genéticas propiamente dichas [polimorfismo 4G/5G del PAI-1 y apo(a)] y aquellas determinadas desde el punto de vista genético [niveles de Lp(a), niveles de TAFI, niveles de APC] habrían sido similares en los pacientes antes del debut de la cardiopatía isquémica.

Finalmente, dos de estos factores plasmáticos analizados [los niveles incrementados de Lp(a) y disminuidos de APC] están significativamente asociados con la extensión y severidad de las lesiones coronarias evaluadas en la coronariografía (Figura 5.2, D). La explicación fisiopatológica de estas asociaciones estadísticas puede asentar en su potencial proaterogénico y la pérdida de actividad antiinflamatoria, que en ambos casos favorecería el fenómeno aterosclerótico

propriadamente dicho de la aterotrombosis, así como en su efecto neto favorecedor de la trombosis (mayor actividad antifibrinolítica y menor acción anticoagulante) que podría favorecer la incorporación de trombos suboclusivos a las placas (Figura 5.2, D).

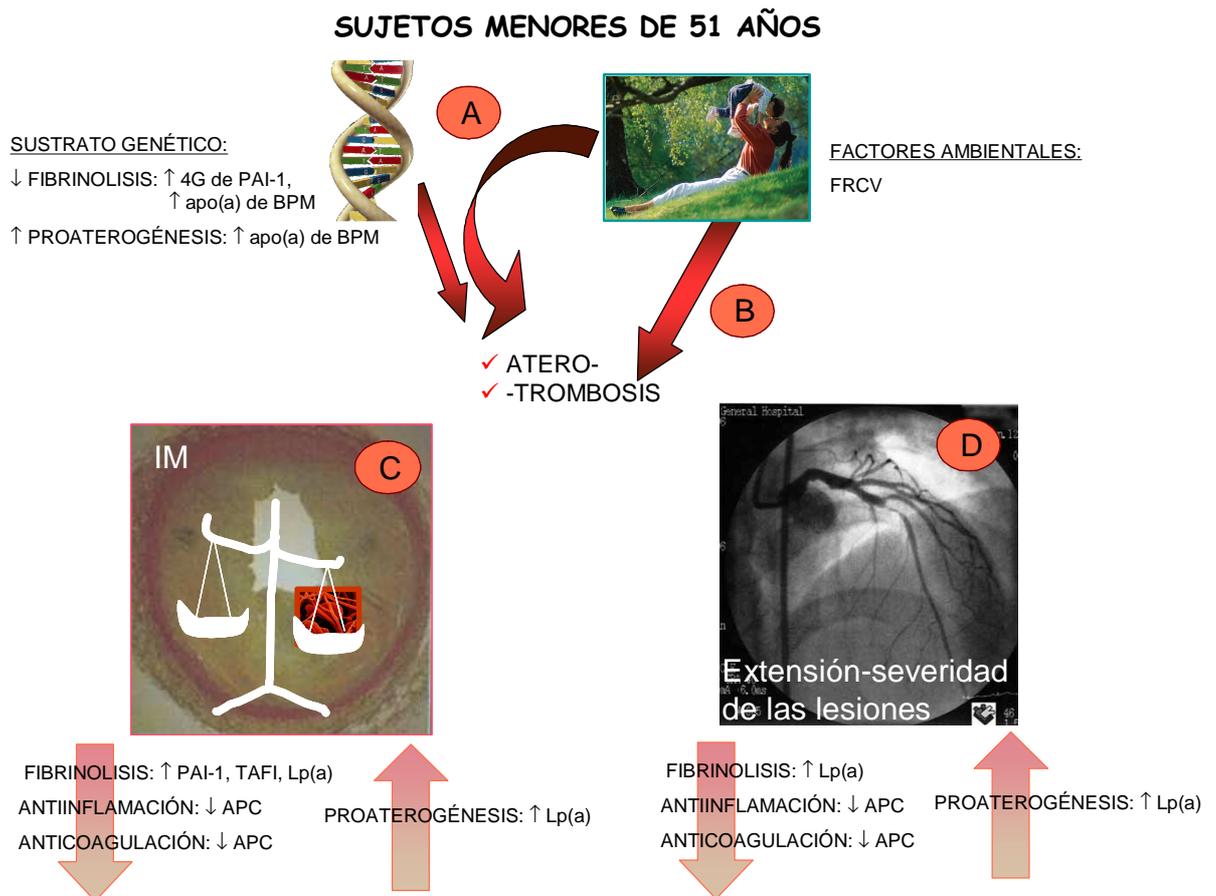


Figura 5.2. Resultados positivos documentados en la presente tesis doctoral. Véase explicación en el texto. 4G: alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del PAI-1; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; apo(a): apolipoproteína (a); BPM: bajo peso molecular; FRCV: factores de riesgo cardiovascular; IM: infarto de miocardio; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina; APC: proteína C activada circulante.

El valor pronóstico de algunas variables clínicas [287, 351-353] y bioquímicas [287] ha sido bien documentado en estudios previos en población general sin límite de edad en presencia de un síndrome coronario agudo. La existencia de una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, entre algunas de las variables analizadas en la presente tesis doctoral [presencia del alelo 4G, niveles elevados de PAI-ag y Lp(a)] y el desarrollo de eventos en el seguimiento sugiere que, quizás, si estos pacientes jóvenes presentaran más complicaciones trombóticas en la evolución estas asociaciones habrían resultado estadísticamente significativas. Esta limitación puede superarse con la continuidad de este trabajo de investigación, pues se van a seguir incorporando sujetos al estudio y se va a prolongar el tiempo de seguimiento.

Desgraciadamente, hoy en día no existen mecanismos directos de actuación terapéutica sobre las características genéticas ni los niveles plasmáticos de los factores documentados en la Figura 5.2. Sin embargo, su determinación podría mejorar estrategias de prevención primaria y prevención secundaria al suscitar la necesidad de actuar más eficazmente sobre los factores de riesgo modificables y matizar el resultado de las exploraciones complementarias realizadas, en particular aquellas no claramente diagnósticas o excluyentes. La experimentación *in vitro* y en animales han avalado el resultado de la trombolisis con inhibidores del TAFI administrados de forma concomitante [119, 354]. Estos hallazgos apoyan la esperanza de que, en el futuro, el desarrollo de tratamientos dirigidos a corregir los desequilibrios en la cascada de la coagulación y la fibrinólisis optimizarían el tratamiento de estos pacientes.

6.- CONCLUSIONES

1. La población joven con infarto de miocardio de nuestro entorno está formada prioritariamente por hombres, el factor clásico de riesgo cardiovascular más prevalente es el tabaquismo seguido de la dislipemia, y los antecedentes clínicos de aterotrombosis en cualquier localización o de cardiopatía isquémica precoz no superan el 15%.
2. La manifestación electrocardiográfica inicial más frecuente del infarto agudo de miocardio en esta población es el ascenso del segmento ST (en torno al 75%) y la fibrinólisis es el tratamiento administrado en la mayoría de los casos (80%). Con la disponibilidad de Hemodinámica acorde con las fechas en las que se incluyeron los pacientes, se realizó coronariografía en la gran mayoría de los pacientes del estudio (86,5%) y se revascularizaron algo más del 50%.
3. Existe un perfil genético desfavorable (hipofibrinolítico y proaterogénico) en pacientes en comparación con los controles debido a una mayor presencia del alelo 4G del polimorfismo 4G/5G del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y de isoformas de apo(a) de bajo peso molecular de la lipoproteína (a) [Lp(a)].
4. El hallazgo de unos niveles aumentados de PAI-1, del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina funcional (TAFIfc) y de Lp(a) en los pacientes en comparación con los controles inducen la existencia de un ambiente hipofibrinolítico en los primeros. Por otra parte, la concentración aumentada de Lp(a) y los niveles disminuidos de proteína C activada circulante (APC) generan un estado proaterogénico y protrombótico. Todo lo cual favorece la presencia de un desequilibrio hemostático a favor de la trombosis, subyacente en la gran mayoría de casos de infarto de miocardio.
5. El aumento de los niveles de PAI-1 en pacientes es atribuible, sólo en parte, a la presencia de los factores de riesgo cardiovascular (donde se incluyen componentes del síndrome metabólico), así como a una mayor presencia del alelo 4G y/o a otros mecanismos 4G-independientes.
6. El aumento de niveles de TAFIfc en pacientes no se debe a una mayor presencia del genotipo TT (isoforma Ile/Ile) en este grupo, en comparación con los controles. Más bien podrían atribuirse a la presencia de un ambiente hipofibrinolítico generalizado que induciría una menor degradación del TAFI en pacientes, condición que reforzaría, aún más, la situación de hipofibrinólisis previa.

7. La disminución de los niveles de APC en pacientes parece ser consecuencia de una menor generación más que de una mayor inhibición de APC. Diversas alteraciones cuantitativas o cualitativas de alguno/s de los integrantes de su complejo de activación podrían estar implicados.
8. Tanto los niveles incrementados de Lp(a) como los niveles disminuidos de APC se correlacionan con la extensión y la severidad de la aterosclerosis coronaria en el grupo de pacientes.
9. Aunque se observó una tendencia a la asociación del desarrollo de eventos trombóticos en la evolución con la presencia del alelo 4G, los niveles incrementados de PAI-1ag y los de Lp(a), en ningún caso la asociación fue significativa.
10. Nuestros resultados sugieren que en los sujetos jóvenes con infarto de miocardio, y probablemente también en población general, la constatación de un desequilibrio hemostático primordialmente determinado por la carga genética, podría aconsejar un control más estricto de los factores de riesgo cardiovascular y matizar los resultados derivados de la cadena de exploraciones diagnósticas optimizando, en definitiva, las estrategias de prevención primaria y secundaria.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Villar Álvarez F, Banegas Banegas JR, De Mata Donado Campos J, Rodríguez Artelejo F. Morbilidad y mortalidad cardiovascular. En: España FAZ, ed. *Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2003*. Madrid: Fundación Astra Zeneca. España. 2003: 17-34.
2. Villar F, Banegas JR. Reducir las enfermedades cardiovasculares. En: Álvarez Dardet C, Peiró S, eds. *La Salud Pública ante los desafíos de un nuevo siglo. Informe SESPAS 2000*. Granada: Escuela Andaluza de Salud Pública, monografías EASP. 2000: 30.
3. Waller BF. Non atherosclerotic coronary heart disease. En: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, eds. *Hurst's. The Heart*. Nueva York: Mc Graw Hill. 1998: 1197-240.
4. Núñez J, Fácila L, Sanchís J, Bodí V, Llácer A, Martínez A, Bertomeu V, Chorro J. Valsalva sinus pseudoaneurysm causes acute myocardial infarction and stroke simultaneously. *Int J Cardiol* 2004;**97**: 331-2.
5. González-Amieva A, López-Miranda J, Marín C, Pérez-Martínez P, Gómez P, Paz-Rojas E, Arizon JM, Jiménez-Perepérez JA, Concha M, Pérez-Jiménez F. The apo A-I gene promoter region polymorphism determines the severity of hyperlipidemia after heart transplantation. *Clin Transplant* 2003;**17**: 56-62.
6. Zambrana JL, López-Miranda J, Blanco A, Arizon JM, Jansen S, Paniagua JA, Jiménez-Perepérez JA, Concha M, Pérez-Jiménez F. Bezafibrate and lovastatin decrease the oxidizability of low-density lipoproteins in heart transplant recipients with hyperlipidemia. *J Heart Lung Transplant* 1998;**17**: 1213-9.
7. Almenar L, Martí S, Palencia M, Flores A, Bretó M, Díez JL, Algarra F. Cambios en la concentración de lipoproteína(a) después de un trasplante cardiaco. *Rev Esp Cardiol* 1995;**48**: 594-9.
8. Valantine H, Pinto FJ, St Goar FG, Alderman EL, Popp RL. Intracoronary ultrasound imaging in heart transplant recipients: the Stanford experience. *J Heart Lung Transplant* 1992;**11**: S60-4.
9. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961;**55**: 33-50.
10. Navarro-López F. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;**55**: 413-31.
11. Moreno C, Turumbay J, García V, Ezpeleta I, De Los Arcos E, Manrique A, Alegría E. El infarto de miocardio en la población de 25-74 años de Navarra. Incidencia, letalidad y tratamiento en el periodo 1997-98. Estudio IBERICA. *An Sist Sanit Navar* 2002;**25**: 155-66.
12. Morillas PJ, Cabadés A, Bertomeu V, Echanove I, Colomina F, Cebrián J, Pérez G, Mota A, Sánchez FJ, Sanz JC. Infarto agudo de miocardio en pacientes menores de 45 años. *Rev Esp Cardiol* 2002;**55**: 1124-31.
13. Roldán V, González-Conejero R, Marín F, Pineda J, Vicente V, Corral J. Five prothrombotic polymorphisms and the prevalence of premature myocardial infarction. *Haematologica* 2005;**90**: 421-3.

14. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Jr., Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;**100**: 1481-92.
15. Fuster V, Fayad ZA, Badimón JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999;**353 Supl 2**: SII5-9.
16. Miranda-Guardiola F, Bosch X. Papel de la inflamación en la patogenia y el pronóstico de la angina inestable. *Rev Esp Cardiol* 1999;**52 Supl 1**: 13-22.
17. Badimón L. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Papel de la rotura de la placa arteriosclerótica. *Rev Esp Cardiol* 2001;**Supl 1**: 2B-13B.
18. Bruschke AV, Kramer JR, Jr., Bal ET, Haque IU, Detrano RC, Goormastic M. The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. *Am Heart J* 1989;**117**: 296-305.
19. Little WC, Constantinescu M, Applegate RJ, Kutcher MA, Burrows MT, Kahl FR, Santamore WP. Can coronary angiography predict the site of a subsequent myocardial infarction in patients with mild-to-moderate coronary artery disease? *Circulation* 1988;**78**: 1157-66.
20. Fernández Ortiz A. Fisiopatología de la angina inestable. Papel de la rotura y la trombosis de la placa aterosclerótica. *Rev Esp Cardiol* 1999;**52 Supl 1**: 3-12.
21. Hamsten A. The hemostatic system and coronary heart disease. *Thromb Res* 1993;**70**: 1-38.
22. Fuster V, Badimón L, Badimón JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;**326**: 242-50.
23. Fuster V, Badimón L, Badimón JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;**326**: 310-8.
24. Walsh PN. Platelet coagulation-protein interactions. *Semin Thromb Hemost* 2004;**30**: 461-71.
25. Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem, Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Frankfurt am Main: *Meidinger Sohn and Company*, 1956.
26. Stern DM, Esposito C, Gerlach H, Gerlach M, Ryan J, Handley D, Nawroth P. Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care* 1991;**14**: 160-6.
27. Alabadi JA, Miranda FJ, Llorens S, Centeno JM, Marrachelli VG, Alborch E. Mechanisms underlying diabetes enhancement of endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Eur J Pharmacol* 2004;**486**: 289-96.
28. España F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estellés A, Aznar J. The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005;**3**: 119-31.
29. Sitges M, Roque M, Solanes N, Rigol M, Heras M, Roig E, Luis Pomar J, Jiménez W, Sanz G. El estradiol potencia la vasodilatación dependiente del endotelio a través del óxido nítrico. *Rev Esp Cardiol* 2001;**54**: 990-6.

30. Sitges M, Leivas A, Heras M, Ferrer E, Roque M, Viles D, Roig E, Rivera F, Sanz G. Short-term transdermal estradiol enhances nitric oxide synthase III and estrogen receptor mRNA expression in arteries of women with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2005;**105**: 74-9.
31. Sitges M, Roig E, Morales M, Azqueta M, Pérez Villa F, Pare C, Orus J, Heras M, Sanz G. La disfunción endotelial periférica en la miocardiopatía dilatada idiopática se asocia con mayor disfunción ventricular y concentraciones plasmáticas elevadas de factor de necrosis tumoral. *Rev Esp Cardiol* 2005;**58**: 477-83.
32. Aldasoro M, Medina P, Vila JM, Otero E, Martínez-Leon JB, Lluch S. Endothelium-dependent relaxation of human saphenous veins in response to vasopressin and desmopressin. *J Vasc Surg* 1997;**25**: 696-703.
33. Miranda FJ, Alabadi JA, Llorens S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. *Life Sci* 2000;**66**: 2071-80.
34. Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol* 2000;**89**: 160-7.
35. Fuster V, Jang IK. Role of Platelet-Inhibitor Agents in Coronary Artery Disease. En: Topol EJ, ed. *Textbook of International Cardiology 2nd ed.* Philadelphia: Saunders. 1994: 3-22.
36. Savage B, Cattaneo M, Ruggeri ZM. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol* 2001;**8**: 270-6.
37. Amado Senars JA, García-Conde Bru J, Merino Sanchez J, Benet Monforte I. Mecanismos patogénicos de la hiperagregabilidad plaquetaria en diabéticos. *Sangre (Barc)* 1981;**26**: 409-16.
38. Martínez C, Rivera J, Loyau S, Corral J, González-Conejero R, Lozano ML, Vicente V, Anglés-Cano E. Binding of recombinant apolipoprotein(a) to human platelets and effect on platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2001;**85**: 686-93.
39. Mann KG, Butenas S, Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**: 17-25.
40. Díaz Concepción A, Almagro Vázquez D. Estado actual del mecanismo de la coagulación sanguínea. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2001;**17**: 77-89.
41. Carrell RW, Pemberton PA, Boswell DR. The serpins: evolution and adaptation in a family of protease inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1987;**52**: 527-35.
42. Carrell RW. Coagulation, anticoagulation and thrombosis: molecular mechanisms. *Haematologica* 2004;**89 Supl 1**: 100-4.
43. Dastre A. Fibrinolyse dans le sang. *Arch Norm Pathol* 1893;**5**: 661-73.
44. Gilabert-Estellés J, Castelló R, Gilabert J, Ramón LA, España F, Romeu A, Estellés A. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in endometriosis. *Front Biosci* 2005;**10**: 1162-76.

45. Gilabert-Estellés J, Estellés A, Gilabert J, Castelló R, España F, Falcó C, Romeu A, Chirivella M, Zorio E, Aznar J. Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Hum Reprod* 2003;**18**: 1516-22.
46. Ny T, Peng XR, Ohlsson M. Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb Res* 1993;**71**: 1-45.
47. Castelló R, Estellés A, Vázquez C, Falcó C, España F, Almenar SM, Fuster C, Aznar J. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1, and tissue metalloproteinase inhibitor type 1 gene expressions in primary breast cancer. *Clin Chem* 2002;**48**: 1288-95.
48. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991;**78**: 3114-24.
49. Lijnen HR, Collen D. Molecular interactions between tissue-type plasminogen activator and plasminogen. *Methods Enzymol* 1993;**223**: 197-206.
50. Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis* 1991;**5**: 197-206.
51. Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995;**86**: 4007-24.
52. Kruithof EK, Vassalli JD, Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* 1986;**261**: 11207-13.
53. Grancha S, Estellés A, Gilabert J, Chirivella M, España F, Aznar J. Decreased expression of PAI-2 mRNA and protein in pregnancies complicated with intrauterine fetal growth retardation. *Thromb Haemost* 1996;**76**: 761-7.
54. Heeb MJ, España F, Geiger M, Collen D, Stump DC, Griffin JH. Immunological identity of heparin-dependent plasma and urinary protein C inhibitor and plasminogen activator inhibitor-3. *J Biol Chem* 1987;**262**: 15813-6.
55. España F, Estellés A, Gilabert J, Andrés C, Aznar J. Inhibidores de la proteína C. *Rev Iber Tromb Hemostasia* 1989;**2**: 29-32.
56. Stump DC, Lijnen HR, Collen D. Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1986;**261**: 17120-6.
57. Stump DC, Thienpont M, Collen D. Purification and characterization of a novel inhibitor of urokinase from human urine. Quantitation and preliminary characterization in plasma. *J Biol Chem* 1986;**261**: 12759-66.
58. España F, Estellés A, Fernández PJ, Gilabert J, Sánchez-Cuenca J, Griffin JH. Evidence for the regulation of urokinase and tissue type plasminogen activators by the serpin, protein C inhibitor, in semen and blood plasma. *Thromb Haemost* 1993;**70**: 989-94.
59. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;**270**: 14477-84.

60. Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: Regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Moscow)* 2002;**67**: 99-101.
61. Juhan-Vague I, Alessi MC. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 1997;**78**: 656-60.
62. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* 1994;**269**: 21191-7.
63. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein(a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989;**339**: 303-5.
64. Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor. En: B. C, ed. *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. Philadelphia: PA, WB, Saunders Co. 1988: 87-115.
65. 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.
66. Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ. Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest* 1984;**74**: 1465-72.
67. Sprengers ED, Akkerman JW, Jansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor: two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood. *Thromb Haemost* 1986;**55**: 325-9.
68. Tucker HM, Mottonen J, Goldsmith EJ, Gerard RD. Engineering of plasminogen activator inhibitor-1 to reduce the rate of latency transition. *Nat Struct Biol* 1995;**2**: 442-5.
69. Juhan-Vague I, Valadier J, Alessi MC, Aillaud MF, Ansaldi J, Philip-Joet C, Holvoet P, Serradimigni A, Collen D. Deficient t-PA release and elevated PA inhibitor levels in patients with spontaneous or recurrent deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1987;**57**: 67-72.
70. Kruithof EK, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, Welti H, Bachmann F. Fibrinolysis in pregnancy: a study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987;**69**: 460-6.
71. Estellés A, Aznar J, Tormo G, Sapena P, Tormo V, España F. Influence of a rehabilitation sports programme on the fibrinolytic activity of patients after myocardial infarction. *Thromb Res* 1989;**55**: 203-12.
72. Estellés A, Gilabert J, Andrés C, España F, Aznar J. Plasminogen activator inhibitors type 1 and type 2 and plasminogen activators in amniotic fluid during pregnancy. *Thromb Haemost* 1990;**64**: 281-5.
73. Estellés A, Gilabert J, Keeton M, Eguchi Y, Aznar J, Grancha S, España F, Loskutoff DJ, Schleef RR. Altered expression of plasminogen activator inhibitor type 1 in placentas from pregnant women with preeclampsia and/or intrauterine fetal growth retardation. *Blood* 1994;**84**: 143-50.

74. Estellés A, Gilabert J, Aznar J, Loskutoff DJ, Schleef RR. Changes in the plasma levels of type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors in normal pregnancy and in patients with severe preeclampsia. *Blood* 1989;**74**: 1332-8.
75. Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Galbis M. Fibrinolytic parameters in normotensive pregnancy with intrauterine fetal growth retardation and in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1991;**165**: 138-42.
76. Estellés A, Gilabert J, España F, Aznar J, Gómez-Lechón MJ. Fibrinolysis in preeclampsia. *Fibrinolysis* 1987;**1**: 209-14.
77. Gilabert J, Estellés A, Grancha S, España F, Aznar J. Fibrinolytic system and reproductive process with special reference to fibrinolytic failure in pre-eclampsia. *Hum Reprod* 1995;**10 Supl 2**: 121-31.
78. Gilabert J, Estellés A, Cano A, España F, Barrachina R, Grancha S, Aznar J, Tortajada M. The effect of estrogen replacement therapy with or without progestogen on the fibrinolytic system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995;**173**: 1849-54.
79. 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.
80. Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**: 1444-55.
81. Robbie LA, Booth NA, Brown AJ, Bennett B. Inhibitors of fibrinolysis are elevated in atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;**16**: 539-45.
82. Grancha S, Estellés A, Falcó C, Chirivella M, España F, Aznar J. Detailed localization of type 1 plasminogen inhibitor mRNA expression and antigen in atherosclerotic plaque on human coronary artery. *Fibrinol Proteol* 1998;**12**: 53-61.
83. Almer L, Ohlin H. Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (tPA) in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1987;**47**: 335-9.
84. Estellés A, Tormo G, Aznar J, España F, Tormo V. Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise. *Thromb Res* 1985;**40**: 373-83.
85. 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.
86. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;**342**: 1792-801.
87. Aznar J, Estellés A. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the pathogenesis of coronary artery disease. *Haemostasis* 1994;**24**: 243-51.
88. Aznar J, Estellés A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, España F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Brit Heart J* 1988;**59**: 535-41.
89. Chandler WL, Stratton JR. Laboratory evaluation of fibrinolysis in patients with a history of myocardial infarction. *Am J Clin Pathol* 1994;**102**: 248-52.

90. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. 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.
91. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;**2**: 3-9.
92. Held C, Hjemdahl P, Rehnqvist N, Wallen NH, Bjorkander I, Eriksson SV, Forslund L, Wiman B. Fibrinolytic variables and cardiovascular prognosis in patients with stable angina pectoris treated with verapamil or metoprolol. Results from the Angina Prognosis study in Stockholm. *Circulation* 1997;**95**: 2380-6.
93. Malmberg K, Bavenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol* 1994;**24**: 592-9.
94. Cortellaro M, Cofrancesco E, Boschetti C, Mussoni L, Donati MB, Cardillo M, Catalano M, Gabrielli L, Lombardi B, Specchia G, et al. Increased fibrin turnover and high PAI-1 activity as predictors of ischemic events in atherosclerotic patients. A case-control study. The PLAT Group. *Arterioscler Thromb* 1993;**13**: 1412-7.
95. Sargento L, Saldanha C, Monteiro J, Perdigao C, Martins e Silva J. Evidence of prolonged disturbances in the haemostatic, hemorheologic and inflammatory profiles in transmural myocardial infarction survivors. *Thromb Haemost* 2003;**89**: 892-903.
96. Strauss BH, Lau HK, Bowman KA, Sparkes J, Chisholm RJ, Garvey MB, Fenkell LL, Natarajan MK, Singh I, Teitel JM. Plasma urokinase antigen and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels predict angiographic coronary restenosis. *Circulation* 1999;**100**: 1616-22.
97. Rifón J, Páramo JA, Panizo C, Montes R, Rocha E. The increase of plasminogen activator inhibitor activity is associated with graft occlusion in patients undergoing aorto-coronary bypass surgery. *Br J Haematol* 1997;**99**: 262-7.
98. 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.
99. 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.
100. Eren M, Painter CA, Atkinson JB, Declerck PJ, Vaughan DE. Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 2002;**106**: 491-6.
101. 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.

102. 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.
103. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999;**82**: 1121-6.
104. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. 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.
105. 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.
106. Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, Humphries SE, Evans A, Luc G, Cambou JP, 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.
107. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 1991;**11**: 183-90.
108. Grancha S, Estellés A, Tormo G, Falcó C, Gilabert J, España F, Cano A, Seguí R, Aznar J. 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.
109. Roncal C, Orbe J, Rodríguez JA, Belzunce M, Beloqui O, Díez J, Páramo JA. Influence of the 4G/5G PAI-1 genotype on angiotensin II-stimulated human endothelial cells and in patients with hypertension. *Cardiovasc Res* 2004;**63**: 176-85.
110. Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991;**324**: 1098-104.
111. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002;**137**: 25-33.
112. Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Mizuno K, Fujita T, Tsukamoto K, Watanabe T. Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**258**: 431-5.
113. Brown NJ, Agirbasli M, Vaughan DE. Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. *Hypertension* 1999;**34**: 285-90.

114. Salomaa V, Stinson V, Kark JD, Folsom AR, Davis CE, Wu KK. Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1995;**91**: 284-90.
115. ECAT angina pectoris study: baseline associations of haemostatic factors with extent of coronary arteriosclerosis and other coronary risk factors in 3000 patients with angina pectoris undergoing coronary angiography. *Eur Heart J* 1993;**14**: 8-17.
116. Bouma BN, Marx PF, Mosnier LO, Meijers JC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *Thromb Res* 2001;**101**: 329-54.
117. Marx PF, Dawson PE, Bouma BN, Meijers JC. Plasmin-mediated activation and inactivation of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Biochemistry* 2002;**41**: 6688-96.
118. Bouma BN, Meijers JC. New insights into factors affecting clot stability: A role for thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI; plasma procarboxypeptidase B, plasma procarboxypeptidase U, procarboxypeptidase R). *Semin Hematol* 2004;**41**: 13-9.
119. Guimarães AH, Rijken DC. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) affects fibrinolysis in a plasminogen activator concentration-dependent manner. Study of seven plasminogen activators in an internal clot lysis model. *Thromb Haemost* 2004;**91**: 473-9.
120. Klement P, Liao P, Bajzar L. A novel approach to arterial thrombolysis. *Blood* 1999;**94**: 2735-43.
121. Nagashima M, Werner M, Wang M, Zhao L, Light DR, Pagila R, Morser J, Verhallen P. An inhibitor of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor potentiates tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis in a rabbit jugular vein thrombolysis model. *Thromb Res* 2000;**98**: 333-42.
122. Barbosa Pereira PJ, Segura-Martín S, Oliva B, Ferrer-Orta C, Avilés FX, Coll M, Gomis-Ruth FX, Vendrell J. Human procarboxypeptidase B: three-dimensional structure and implications for thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). *J Mol Biol* 2002;**321**: 537-47.
123. Wang W, Boffa MB, Bajzar L, Walker JB, Nesheim ME. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1998;**273**: 27176-81.
124. Bajzar L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and an antifibrinolytic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**: 2511-8.
125. Mosnier LO, Elisen MG, Bouma BN, Meijers JC. Protein C inhibitor regulates the thrombin-thrombomodulin complex in the up- and down regulation of TAFI activation. *Thromb Haemost* 2001;**86**: 1057-64.
126. Vanhoof G, Wauters J, Schatteman K, Hendriks D, Goossens F, Bossuyt P, Scharpe S. The gene for human carboxypeptidase U (CPU)--a proposed novel regulator of plasminogen activation--maps to 13q14.11. *Genomics* 1996;**38**: 454-5.

127. Franco RF, Fagundes MG, Meijers JC, Reitsma PH, Lourenco D, Morelli V, Maffei FH, Ferrari IC, Piccinato CE, Silva WA, Jr., Zago MA. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. *Haematologica* 2001;**86**: 510-7.
128. Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, Juhan-Vague I. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood* 2001;**97**: 2053-8.
129. Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, Bulk S, Schneider M, Boffa M, Koschinsky M, van Tilburg NH, Nesheim ME, Bertina RM, Gómez García EB. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood* 2001;**98**: 1992-3.
130. Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem* 2002;**277**: 1021-30.
131. Juhan-Vague I, Renucci JF, Grimaux M, Morange PE, Gouvernet J, Gourmelin Y, Alessi MC. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**: 2156-61.
132. Chetaille P, Alessi MC, Kouassi D, Morange PE, Juhan-Vague I. Plasma TAFI antigen variations in healthy subjects. *Thromb Haemost* 2000;**83**: 902-5.
133. Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, Pearl RG, Leung LL. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *J Biol Chem* 2003;**278**: 51059-67.
134. Wang W, Nagashima M, Schneider M, Morser J, Nesheim M. Elements of the primary structure of thrombomodulin required for efficient thrombin-activable fibrinolysis inhibitor activation. *J Biol Chem* 2000;**275**: 22942-7.
135. Nesheim M. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 2003;**124**: 33S-9S.
136. Silveira A, Schatteman K, Goossens F, Moor E, Scharpe S, Stromqvist M, Hendriks D, Hamsten A. Plasma procarboxypeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2000;**84**: 364-8.
137. Hryszko T, Malyszko J, Malyszko JS, Brzósko S, Mysliwiec M. Patients on peritoneal dialysis but not on hemodialysis have elevated concentration and activity of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Thromb Res* 2001;**104**: 233-8.
138. Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Mysliwiec M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and markers of endothelial cell injury in dialyzed patients with diabetic nephropathy. *Thromb Haemost* 2004;**91**: 480-6.
139. Hori Y, Gabazza EC, Yano Y, Katsuki A, Suzuki K, Adachi Y, Sumida Y. Insulin resistance is associated with increased circulating level of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**: 660-5.

140. Yano Y, Kitagawa N, Gabazza EC, Morioka K, Urakawa H, Tanaka T, Katsuki A, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Taguchi O, Sumida Y, Adachi Y. Increased plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels in normotensive type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**: 736-41.
141. Gils A, Alessi MC, Brouwers E, Peeters M, Marx P, Leurs J, Bouma B, Hendriks D, Juhan-Vague I, Declerck PJ. Development of a genotype 325-specific proCPU/TAFI ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**: 1122-7.
142. van Tilburg NH, Rosendaal FR, Bertina RM. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. *Blood* 2000;**95**: 2855-9.
143. Watanabe R, Wada H, Watanabe Y, Sakakura M, Nakasaki T, Mori Y, Nishikawa M, Gabazza EC, Nobori T, Shiku H. Activity and antigen levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2001;**104**: 1-6.
144. Broze GJ, Jr., Higuchi DA. Coagulation-dependent inhibition of fibrinolysis: role of carboxypeptidase-U and the premature lysis of clots from hemophilic plasma. *Blood* 1996;**88**: 3815-23.
145. Mosnier LO, Lisman T, van den Berg HM, Nieuwenhuis HK, Meijers JC, Bouma BN. The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration. *Thromb Haemost* 2001;**86**: 1035-9.
146. Santamaría A, Borrell M, Oliver A, Ortín R, Forner R, Coll I, Mateo J, Souto JC, Fontcuberta J. Association of functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) with conventional cardiovascular risk factors and its correlation with other hemostatic factors in a Spanish population. *Am J Hematol* 2004;**76**: 348-52.
147. Juhan-Vague I, Morange PE, Aubert H, Henry M, Aillaud MF, Alessi MC, Samnegard A, Hawe E, Yudkin J, Margaglione M, Di Minno G, Hamsten A, Humphries SE. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the north and south of Europe. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**: 867-73.
148. Morange PE, Juhan-Vague I, Scarabin PY, Alessi MC, Luc G, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, Evans A, Ducimetiere P. Association between TAFI antigen and Ala147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. The PRIME Study (Prospective Epidemiological Study of MI). *Thromb Haemost* 2003;**89**: 554-60.
149. Morange PE, Henry M, Frere C, Juhan-Vague I. Thr325Ile polymorphism of the TAFI gene does not influence the risk of myocardial infarction. *Blood* 2002;**99**: 1878-9.
150. Brouwers GJ, Leebeek FW, Tanck MW, Wouter Jukema J, Kluit C, de Maat MP. Association between thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and clinical outcome in patients with unstable angina pectoris. *Thromb Haemost* 2003;**90**: 92-100.
151. Mutch NJ, Moore NR, Wang E, Booth NA. Thrombus lysis by uPA, scuPA and tPA is regulated by plasma TAFI. *J Thromb Haemost* 2003;**1**: 2000-7.

152. Gils A, Ceresa E, Macovei AM, Marx PF, Peeters M, Compernelle G, Declerck PJ. Modulation of TAFI function through different pathways-implications for the development of TAFIinhibitors. *J Thromb Haemost* 2005;**3**: 2745-53.
153. Berg K. A New Serum Type System in Man--the Lp System. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963;**59**: 369-82.
154. Lindahl G, Gersdorf E, Menzel HJ, Duba C, Cleve H, Humphries S, Utermann G. The gene for the Lp(a)-specific glycoprotein is closely linked to the gene for plasminogen on chromosome 6. *Hum Genet* 1989;**81**: 149-52.
155. Utermann G, Duba C, Menzel HJ. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II. Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. *Hum Genet* 1988;**78**: 47-50.
156. Berglund L, Ramakrishnan R. Lipoprotein(a): an elusive cardiovascular risk factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**: 2219-26.
157. Rouy D, Koschinsky ML, Fleury V, Chapman J, Anglés-Cano E. Apolipoprotein(a) and plasminogen interactions with fibrin: a study with recombinant apolipoprotein(a) and isolated plasminogen fragments. *Biochemistry* 1992;**31**: 6333-9.
158. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 1987;**80**: 458-65.
159. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, Hobbs HH. Apolipoprotein(a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein(a) concentrations. *J Clin Invest* 1992;**90**: 52-60.
160. Mooser V, Scheer D, Marcovina SM, Wang J, Guerra R, Cohen J, Hobbs HH. The Apo(a) gene is the major determinant of variation in plasma Lp(a) levels in African Americans. *Am J Hum Genet* 1997;**61**: 402-17.
161. Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 1999;**100**: 1154-60.
162. Aras D, Geyik B, Topaloglu S, Ergun K, Ayaz S, Maden O, Yildiz A, Balci M, Ozeke O, Korkmaz S. Serum level of lipoprotein (a) is inversely associated with the development of coronary collateral circulation. *Coron Artery Dis* 2006;**17**: 159-63.
163. Morita Y, Himeno H, Yakuwa H, Usui T. Serum lipoprotein(a) level and clinical coronary stenosis progression in patients with myocardial infarction: re-vascularization rate is high in patients with high-Lp(a). *Circ J* 2006;**70**: 156-62.
164. Palabrica TM, Liu AC, Aronovitz MJ, Furie B, Lawn RM, Furie BC. Antifibrinolytic activity of apolipoprotein(a) in vivo: human apolipoprotein(a) transgenic mice are resistant to tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis. *Nat Med* 1995;**1**: 256-9.
165. Etingin OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. A potential mechanism in thrombogenesis. *J Biol Chem* 1991;**266**: 2459-65.

166. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;**330**: 132-7.
167. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* 1990;**10**: 240-5.
168. Edelberg JM, González-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein(a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb Res* 1990;**57**: 155-62.
169. Rouy D, Grailhe P, Nigon F, Chapman J, Anglés-Cano E. Lipoprotein(a) impairs generation of plasmin by fibrin-bound tissue-type plasminogen activator. In vitro studies in a plasma milieu. *Arterioscler Thromb* 1991;**11**: 629-38.
170. Aznar J, Estellés A, Bretó M, España F, Alós T. Euglobulin clot lysis induced by tissue-type plasminogen activator is reduced in subjects with increased levels of lipoprotein(a). *Thromb Res* 1992;**66**: 569-82.
171. Stegnar M, Ambrozic J, Berger B, Keber I. In vitro plasma and euglobulin clot lysis in subjects with elevated lipoprotein(a). *Fibrinolysis* 1995;**9**: 304-8.
172. Hervio L, Girard-Globa A, Durlach V, Anglés-Cano E. The antifibrinolytic effect of lipoprotein(a) in heterozygous subjects is modulated by the relative concentration of each of the apolipoprotein(a) isoforms and their affinity for fibrin. *Eur J Clin Invest* 1996;**26**: 411-7.
173. Falcó C, Estellés A, Dalmau J, España F, Aznar J. Influence of lipoprotein (a) levels and isoforms on fibrinolytic activity--study in families with high lipoprotein (a) levels. *Thromb Haemost* 1998;**79**: 818-23.
174. Estellés A, Cano A, Falcó C, España F, Gilabert J, Grancha S, Aznar J. Lipoprotein(a) levels and isoforms and fibrinolytic activity in postmenopause--influence of hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 1999;**81**: 104-10.
175. Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM, Jr. Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986;**74**: 758-65.
176. Holmer SR, Hengstenberg C, Kraft HG, Mayer B, Poll M, Kurzinger S, Fischer M, Lowel H, Klein G, Riegger GA, Schunkert H. Association of polymorphisms of the apolipoprotein(a) gene with lipoprotein(a) levels and myocardial infarction. *Circulation* 2003;**107**: 696-701.
177. Hervio L, Durlach V, Girard-Globa A, Anglés-Cano E. Multiple binding with identical linkage: a mechanism that explains the effect of lipoprotein(a) on fibrinolysis. *Biochemistry* 1995;**34**: 13353-8.
178. Paultre F, Tuck CH, Boden-Albala B, Kargman DE, Todd E, Jones J, Paik MC, Sacco RL, Berglund L. Relation of Apo(a) size to carotid atherosclerosis in an elderly multiethnic population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;**22**: 141-6.
179. Peltier M, Iannetta Peltier MC, Sarano ME, Lesbre JP, Colas JL, Tribouilloy CM. Elevated serum lipoprotein(a) level is an independent marker of severity of thoracic aortic atherosclerosis. *Chest* 2002;**121**: 1589-94.

180. Bottalico LA, Keesler GA, Fless GM, Tabas I. Cholesterol loading of macrophages leads to marked enhancement of native lipoprotein(a) and apoprotein(a) internalization and degradation. *J Biol Chem* 1993;**268**: 8569-73.
181. Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* 1993;**260**: 1655-8.
182. Beisiegel U, Niendorf A, Wolf K, Reblin T, Rath M. Lipoprotein(a) in the arterial wall. *Eur Heart J* 1990;**11 Supl E**: 174-83.
183. Scanu AM. Lp(a) lipoprotein-coping with heterogeneity. *N Engl J Med* 2003;**349**: 2089-90.
184. Buechler C, Ullrich H, Aslanidis C, Bared SM, Lingenhel A, Ritter M, Schmitz G. Lipoprotein (a) downregulates lysosomal acid lipase and induces interleukin-6 in human blood monocytes. *Biochim Biophys Acta* 2003;**1642**: 25-31.
185. Danesh J, Collins R, Peto R. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000;**102**: 1082-5.
186. Rifai N, Ma J, Sacks FM, Ridker PM, Hernandez WJ, Stampfer MJ, Marcovina SM. Apolipoprotein(a) size and lipoprotein(a) concentration and future risk of angina pectoris with evidence of severe coronary atherosclerosis in men: The Physicians' Health Study. *Clin Chem* 2004;**50**: 1364-71.
187. Anglés-Cano E. High antifibrinolytic activity of lipoprotein(a) containing small apolipoprotein(a) isoforms. *Circulation* 2000;**102**: e184.
188. Brunelli C, Spallarossa P, Bertolini S, Balbi M, Barbara C, Masturzo P, Lantieri PB, Pastorini C, Caponnetto S. Lipoprotein (a) is increased in acute coronary syndromes (unstable angina pectoris and myocardial infarction), but it is not predictive of the severity of coronary lesions. *Clin Cardiol* 1995;**18**: 526-9.
189. Dangas G, Ambrose JA, D'Agate DJ, Shao JH, Chockalingham S, Levine D, Smith DA. Correlation of serum lipoprotein(a) with the angiographic and clinical presentation of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1999;**83**: 583-5, A7.
190. Min WK, Lee JO, Huh JW. Relation between lipoprotein(a) concentrations in patients with acute-phase response and risk analysis for coronary heart disease. *Clin Chem* 1997;**43**: 1891-5.
191. Batalla A, Rodríguez JJ, Iglesias G, Hevia S, Braga S, Fernández E, Cortina A. La lipoproteína (a) es predictora de severidad angiográfica en varones menores de 50 años con inicio clínico de enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2000;**53**: 1047-51.
192. Wilson SH, Celermajer DS, Nakagomi A, Wyndham RN, Janu MR, Ben Freedman S. Vascular risk factors correlate to the extent as well as the severity of coronary atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 1999;**10**: 449-53.
193. Budde T, Fechrup C, Bosenberg E, Vielhauer C, Enbergs A, Schulte H, Assmann G, Breithardt G. Plasma Lp(a) levels correlate with number, severity, and length-extension of coronary lesions in male patients undergoing coronary arteriography for clinically suspected coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1994;**14**: 1730-6.

194. Schwartzman RA, Cox ID, Poloniecki J, Crook R, Seymour CA, Kaski JC. Elevated plasma lipoprotein(a) is associated with coronary artery disease in patients with chronic stable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 1998;**31**: 1260-6.
195. Imhof A, Rothenbacher D, Khuseynova N, Hoffmeister A, Maerz W, Nauck M, Scharnagl H, Koenig W, Brenner H. Plasma lipoprotein Lp(a), markers of haemostasis and inflammation, and risk and severity of coronary heart disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2003;**10**: 362-70.
196. Gazzaruso C, Garzaniti A, Buscaglia P, Bonetti G, Falcone C, Fratino P, Finardi G, Geroldi D. Apolipoprotein(a) phenotypes and their predictive value for coronary heart disease: identification of an operative cut-off of apolipoprotein(a) polymorphism. *J Cardiovasc Risk* 1998;**5**: 37-42.
197. Ducas J, Silversides C, Dembinski TC, Chan MC, Tate R, Dick A, Nixon P, Ren S, Shen GX. Apolipoprotein(a) phenotypes predict the severity of coronary artery stenosis. *Clin Invest Med* 2002;**25**: 74-82.
198. Rainwater DL, McMahan CA, Malcom GT, Scheer WD, Roheim PS, McGill HC, Jr., Strong JP. Lipid and apolipoprotein predictors of atherosclerosis in youth: apolipoprotein concentrations do not materially improve prediction of arterial lesions in PDAY subjects. The PDAY Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**: 753-61.
199. Armstrong VW, Schleef J, Thiery J, Muche R, Schuff-Werner P, Eisenhauer T, Seidel D. Effect of HELP-LDL-apheresis on serum concentrations of human lipoprotein(a): kinetic analysis of the post-treatment return to baseline levels. *Eur J Clin Invest* 1989;**19**: 235-40.
200. Kagawa A, Azuma H, Akaike M, Kanagawa Y, Matsumoto T. Aspirin reduces apolipoprotein(a) (apo(a)) production in human hepatocytes by suppression of apo(a) gene transcription. *J Biol Chem* 1999;**274**: 34111-5.
201. Akaike M, Azuma H, Kagawa A, Matsumoto K, Hayashi I, Tamura K, Nishiuchi T, Iuchi T, Takamori N, Aihara K, Yoshida T, Kanagawa Y, Matsumoto T. Effect of aspirin treatment on serum concentrations of lipoprotein(a) in patients with atherosclerotic diseases. *Clin Chem* 2002;**48**: 1454-9.
202. Falcó C, Tormo G, Estellés A, España F, Tormo E, Gilabert J, Velasco JA, Aznar J. Fibrinolysis and lipoprotein(a) in women with coronary artery disease. Influence of hormone replacement therapy. *Haematologica* 2001;**86**: 92-8.
203. Crouse JR, 3rd. New developments in the use of niacin for treatment of hyperlipidemia: new considerations in the use of an old drug. *Coron Artery Dis* 1996;**7**: 321-6.
204. Sirtori CR, Calabresi L, Ferrara S, Pazzucconi F, Bondioli A, Baldassarre D, Birreci A, Koverech A. L-carnitine reduces plasma lipoprotein(a) levels in patients with hyper Lp(a). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;**10**: 247-51.
205. Dalessandri KM. Reduction of lipoprotein(a) in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2001;**161**: 772-3.
206. Dujovne CA, Harris WS, Altman R, Overhiser RW, Black DM. Effect of atorvastatin on hemorheologic-hemostatic parameters and serum fibrinogen levels in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol* 2000;**85**: 350-3.

207. Gonbert S, Malinsky S, Sposito AC, Laouenan H, Doucet C, Chapman MJ, Thillet J. Atorvastatin lowers lipoprotein(a) but not apolipoprotein(a) fragment levels in hypercholesterolemic subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2002;**164**: 305-11.
208. Esmon CT. Protein-C: biochemistry, physiology, and clinical implications. *Blood* 1983;**62**: 1155-8.
209. Taylor FB, Jr., Peer GT, Lockhart MS, Ferrell G, Esmon CT. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood* 2001;**97**: 1685-8.
210. 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.
211. Heeb MJ, España F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989;**73**: 446-54.
212. Rezaie AR, Cooper ST, Church FC, Esmon CT. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem* 1995;**270**: 25336-9.
213. Carroll VA, Griffiths MR, Geiger M, Merlo C, Furlan M, Lammle B, Binder BR. Plasma protein C inhibitor is elevated in survivors of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**: 114-8.
214. Dahlbäck B, Stenflo J. High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;**78**: 2512-6.
215. Dahlbäck B. Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J Biol Chem* 1986;**261**: 12022-7.
216. Boeger LM, Morris PC, Thurnau GR, Esmon CT, Comp PC. Oral contraceptives and gender affect protein S status. *Blood* 1987;**69**: 692-4.
217. Gilabert J, Fernández JA, España F, Aznar J, Estellés A. Physiological coagulation inhibitors (protein S, protein C and antithrombin III) in severe preeclamptic states and in users of oral contraceptives. *Thromb Res* 1988;**49**: 319-29.
218. van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bayston TA, Chowdhury V, Bauer KA, Scharrer I, Conard J, Lane DA. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* 1996;**75**: 417-21.
219. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 1993;**342**: 1503-6.
220. Koeleman BPC, Reitsma PH, Allaart CF, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C-deficient families. *Blood* 1994;**84**: 1031-5.
221. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**: 1004-8.

222. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;**369**: 64-7.
223. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood* 1993;**82**: 1989-93.
224. España F, Vayá A, Mira Y, Medina P, Estellés A, Villa P, Falcó C, Aznar J. Low level of circulating activated protein C is a risk factor for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2001;**86**: 1368-73.
225. Navarro S, Ricart JM, Medina P, Vayá A, Villa P, Todolí J, Estellés A, Micó ML, Aznar J, España F. Activated protein C levels in Behcet's disease and risk of venous thrombosis. *Br J Haematol* 2004;**126**: 550-6.
226. Mezzano D, España F, Panes O, Medina P, Pais E, Marshall G, Tagle R, Downey P, Cáceres S, González F, Quiroga T, Pereira J. 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.
227. Varadi K, Philapitsch A, Santa T, Schwarz HP. Activation and inactivation of human protein C by plasmin. *Thromb Haemost* 1994;**71**: 615-21.
228. Sakata Y, Curriden S, Lawrence D, Griffin JH, Loskutoff DJ. Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;**82**: 1121-5.
229. van Hinsbergh VW, Bertina RM, van Wijngaarden A, van Tilburg NH, Emeis JJ, Haverkate F. Activated protein C decreases plasminogen activator-inhibitor activity in endothelial cell-conditioned medium. *Blood* 1985;**65**: 444-51.
230. Taylor FB, Jr., Lockhart MS. A new function for activated protein C: activated protein C prevents inhibition of plasminogen activators by releasate from mononuclear leukocytes--platelet suspensions stimulated by phorbol diester. *Thromb Res* 1985;**37**: 155-64.
231. Comp PC, Esmon CT. Generation of fibrinolytic activity by infusion of activated protein C into dogs. *J Clin Invest* 1981;**68**: 1221-8.
232. Strukova SM. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc)* 2001;**66**: 8-18.
233. Taylor FB, Jr., Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987;**79**: 918-25.
234. Taylor FB, Jr., Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Ferrell G, Chang AC, Laszik Z, Kosanke S, Peer G, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000;**95**: 1680-6.
235. Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Mol Cell Biol* 1988;**8**: 5588-92.
236. 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.

237. Bizios R, Lai L, Fenton JW, 2nd, Malik AB. Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986;**128**: 485-90.
238. Drake WT, Lopes NN, Fenton JW, 2nd, Issekutz AC. Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Invest* 1992;**67**: 617-27.
239. Joyce DE, Grinnell BW. Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 2002;**30**: S288-93.
240. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 2002;**88**: 267-73.
241. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;**344**: 699-709.
242. España F, Medina P, Navarro S, Estellés A, Zorio E, Cubillo P, Aznar J. Inflamación y enfermedad cardiovascular. *Haematologica* 2005;**90 Supl 1**: 298-308.
243. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernández JA, Castellino F, Rosen ED, Fukudome K, Zlokovic BV. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med* 2003;**9**: 338-42.
244. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernández JA, Griffin JH, Zlokovic BV. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004;**41**: 563-72.
245. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000;**95**: 3781-7.
246. Griffin JH, Zlokovic B, Fernández JA. Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke. *Semin Hematol* 2002;**39**: 197-205.
247. Okajima K. Prevention of endothelial cell injury by activated protein C: the molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Curr Vasc Pharmacol* 2004;**2**: 125-33.
248. Snow TR, Deal MT, Dickey DT, Esmon CT. Protein C activation following coronary artery occlusion in the in situ porcine heart. *Circulation* 1991;**84**: 293-9.
249. Hahn RA, MacDonald BR, Chastain M, Grinnell BW, Simpson PJ. Evaluation of activated protein C on canine infarct size in a nonthrombotic model of myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**276**: 1104-10.
250. Arnaud E, Lafay M, Gaussem P, Picard V, Jandrot-Perrus M, Aiach M, Rendu F. An autoantibody directed against human thrombin anion-binding exosite in a patient with arterial thrombosis: effects on platelets, endothelial cells, and protein C activation. *Blood* 1994;**84**: 1843-50.

251. Zivelin A, Gitel S, Griffin JH, Xu X, Fernandez JA, Martinowitz U, Cohen Y, Halkin H, Seligsohn U, Inbal A. Extensive venous and arterial thrombosis associated with an inhibitor to activated protein C. *Blood* 1999;**94**: 895-901.
252. Kiechl S, Muigg A, Santer P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J. Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Circulation* 1999;**99**: 614-9.
253. Sargento L, Do Rosario HS, Perdigao C, Monteiro J, Saldanha C, Martins e Silva J. Long-term prognostic value of the hemorheological profile in transmural myocardial infarction survivors: 60-month clinical follow-up. *Rev Port Cardiol* 2002;**21**: 1263-75.
254. Bux-Gewehr I, Nacke A, Feurle GE. Recurring myocardial infarction in a 35 year old woman. *Heart* 1999;**81**: 316-7.
255. Sakata T, Kario K, Katayama Y, Matsuyama T, Kato H, Miyata T. Analysis of 45 episodes of arterial occlusive disease in Japanese patients with congenital protein C deficiency. *Thromb Res* 1999;**94**: 69-78.
256. Tiong IY, Alkotob ML, Ghaffari S. Protein C deficiency manifesting as an acute myocardial infarction and ischaemic stroke. *Heart* 2003;**89**: E7.
257. Sakamoto T, Ogawa H, Yasue H, Oda Y, Kitajima S, Tsumoto K, Mizokami H. Prevention of arterial reocclusion after thrombolysis with activated protein C. Comparison with heparin in a canine model of coronary artery thrombosis. *Circulation* 1994;**90**: 427-32.
258. Takazoe K, Ogawa H, Yasue H, Sakamoto T, Oshima S, Arai H, Moriyama Y, Shimomura H, Hirai N, Kaikita K, Soejima H, Misumi K, Hosoda K. Association of plasma levels of activated protein C with recanalization of the infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy in acute myocardial infarction. *Thromb Res* 1999;**95**: 37-47.
259. Strandberg K, Astermark J, Bjorgell O, Becker C, Nilsson PE, Stenflo J. Complexes between activated protein C and protein C inhibitor measured with a new method: comparison of performance with other markers of hypercoagulability in the diagnosis of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 2001;**86**: 1400-8.
260. Ireland H, Kunz G, Kyriakoulis K, Stubbs PJ, Lane DA. Thrombomodulin gene mutations associated with myocardial infarction. *Circulation* 1997;**96**: 15-8.
261. Biguzzi E, Merati G, Liaw PC, Bucciarelli P, Oganessian N, Qu D, Gu JM, Fève R, Esmon CT, Mannucci PM, Faioni EM. A 23bp insertion in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene impairs EPCR function. *Thromb Haemost* 2001;**86**: 945-8.
262. Aznar J, Vayá A, Estellés A, Mira Y, Seguí R, Villa P, Ferrando F, Falcó C, Corella D, España F. Risk of venous thrombosis in carriers of the prothrombin G20210A variant and factor V Leiden and their interaction with oral contraceptives. *Haematologica* 2000;**85**: 1271-6.
263. Altes A, Souto JC, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta J. Activated protein C resistance assay when applied in the general population. *Am J Obstet Gynecol* 1997;**176**: 358-9.

264. Parker AC, Mundada LV, Schmaier AH, Fay WP. Factor V Leiden inhibits fibrinolysis in vivo. *Circulation* 2004;**110**: 3594-8.
265. Souto JC, Coll I, Llobet D, del Río E, Oliver A, Mateo J, Borrell M, Fontcuberta J. The prothrombin 20210A allele is the most prevalent genetic risk factor for venous thromboembolism in the Spanish population. *Thromb Haemost* 1998;**80**: 366-9.
266. Seligsohn U, Lubetsky A. Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;**344**: 1222-31.
267. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fève R, Tagliabue L, Tubaro M, Galvani M, Ottani F, Ferrario M, Corral J, Margaglione M. Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood* 1999;**94**: 46-51.
268. 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.
269. Amowitz LL, Komaroff AL, Miletich JP, Ridker PM. Factor V Leiden is not a risk factor for myocardial infarction among young women. *Blood* 1999;**93**: 1432-3.
270. Jeffery S, Leatham E, Zhang Y, Carter J, Pratel P, Kaski JC. Factor V Leiden polymorphism (FV Q506) in patients with ischaemic heart disease, and in different populations groups. *J Hum Hypertens* 1996;**10**: 433-4.
271. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998;**97**: 1037-41.
272. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;**88**: 3698-703.
273. Colucci M, Binetti BM, Tripodi A, Chantarangkul V, Semeraro N. Hyperprothrombinemia associated with prothrombin G20210A mutation inhibits plasma fibrinolysis through a TAFI-mediated mechanism. *Blood* 2004;**103**: 2157-61.
274. Vicente V, González-Conejero R, Rivera J, Corral J. The prothrombin gene variant 20210A in venous and arterial thromboembolism. *Haematologica* 1999;**84**: 356-62.
275. Corral J, González-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I, Vicente V. The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of the prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Br J Haematol* 1997;**99**: 304-7.
276. Russo C, Girelli D, Olivieri O, Guarini P, Manzato F, Pizzolo F, Zaia B, Mazzucco A, Corrocher R. G20210A prothrombin gene polymorphism and prothrombin activity in subjects with or without angiographically documented coronary artery disease. *Circulation* 2001;**103**: 2436-40.

277. Ridker PM, Hennekens CH, Miletich JP. G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation* 1999;**99**: 999-1004.
278. Donmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K, Demir M, Demirtas M, Cayli M, Alhan C, Baslamisli F. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *Jpn Heart J* 2004;**45**: 505-12.
279. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 2003;**108**: 1930-2.
280. Song CJ, Nakagomi A, Chandar S, Cai H, Lim IGS, McNeil HP, Freedman SB, Geczy CL. C-reactive protein contributes to the hypercoagulable state in coronary artery disease. *J Throm Haemost* 2006;**4**: 98-106.
281. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002;**347**: 1557-65.
282. Sanjuán R, Blasco M, Muñoz J, Gimeno C, Savall F, Ferreres J, Bodí V, Samper J, Morell S, López V. Respuesta inflamatoria en el infarto agudo de miocardio. Valores predictivos. *Rev Esp Cardiol* 1997;**50**: 561-6.
283. Keskin O, Ulusoy RE, Kalemoglu M, Us MH, Yildirim I, Tarcin O, Pohan S, Ardic N. White blood cell count and C-reactive protein predict short-term prognosis in acute myocardial infarction. *J Int Med Res* 2004;**32**: 646-54.
284. Zairis MN, Manousakis SJ, Stefanidis AS, Papadaki OA, Andrikopoulos GK, Olympios CD, Hadjissavas JJ, Argyrakis SK, Foussas SG. C-reactive protein levels on admission are associated with response to thrombolysis and prognosis after ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2002;**144**: 782-9.
285. Sanchís J, Bodí V, Llácer A, Núñez J, Fácila L, Ruiz V, Blasco M, Sanjuán R, Chorro FJ. Usefulness of C-reactive protein and left ventricular function for risk assessment in survivors of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;**94**: 766-9.
286. Bodí V, Sanchís J, Llácer A, Fácila L, Núñez J, Pellicer M, Bertomeu V, Ruiz V, García D, Chorro FJ. Valor independiente de la proteína C reactiva para predecir acontecimientos mayores al primer mes y al año en los síndromes coronarios agudos sin elevación del ST. *Med Clin (Barc)* 2004;**122**: 248-52.
287. Bodí V, Sanchís J, Llácer A, Fácila L, Núñez J, Pellicer M, Bertomeu V, Ruiz V, Chorro FJ. Indicadores pronósticos del síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. *Rev Esp Cardiol* 2003;**56**: 857-64.
288. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, 3rd, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Jr., Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;**107**: 499-511.

289. Vayá A, Falcó C, Réganon E, Vila V, Martínez-Sales V, Corella D, Contreras MT, Aznar J. Influence of plasma and erythrocyte factors on red blood cell aggregation in survivors of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2004;**91**: 354-9.
290. Weng X, Cloutier G, Genest J, Jr. Contribution of the -455G/A polymorphism at the beta-fibrinogen gene to erythrocyte aggregation in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999;**82**: 1406-11.
291. Vayá A, Brena S, Réganon E, Vila V, Martínez-Sales V, Contreras MT, Zorio E, Corella D, Aznar J. Erythrocyte aggregation and -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene in survivors of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2004;**92**: 223-4.
292. Thompson WD, Smith EB. Atherosclerosis and the coagulation system. *J Pathol* 1989;**159**: 97-106.
293. Smith EB, Keen GA, Grant A, Stirk C. Fate of fibrinogen in human arterial intima. *Arteriosclerosis* 1990;**10**: 263-75.
294. Birch HE, Schreiber G. Transcriptional regulation of plasma protein synthesis during inflammation. *J Biol Chem* 1986;**261**: 8077-80.
295. Réganon E, Vila V, Martínez-Sales V, Vayá A, Lago A, Alonso P, Aznar J. Association between inflammation and hemostatic markers in atherothrombotic stroke. *Thromb Res* 2003;**112**: 217-21.
296. Ernst E, Resch KL. Therapeutic interventions to lower plasma fibrinogen concentration. *Eur Heart J* 1995;**16 Supl A**: 47-52; discussion 52-3.
297. 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.
298. Levenson J, Giral P, Razavian M, Garipey J, Simon A. Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**: 1263-8.
299. Sanchís J, Bodí V, Navarro A, Llácer A, Blasco M, Mainar L, Monmeneu JV, Insa L, Ferrero JA, Chorro FJ, Sanjuán R. Factores pronósticos en la angina inestable con cambios dinámicos del electrocardiograma. Valor del fibrinógeno. *Rev Esp Cardiol* 2002;**55**: 921-7.
300. Arnau MA, Rueda J, Martínez Dolz L, Osa A, Almenar L, Morillas P, Osca J, Quesada A, Sanjuán R, Palencia MA. Prognostic Value of Fibrinogen in Patients Admitted with Suspected Unstable Angina and Non-Q-Wave Myocardial Infarction. *Rev Esp Cardiol* 2002;**55**: 622-30.
301. Réganon E, Martínez-Sales V, Vila V, Vayá A, Martínez M, Palencia MA, Aznar J. Relationship between fibrinogen protein and fibrinogen function in postmyocardial infarction patients. *Thromb Res* 2001;**104**: 413-9.
302. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *Jama* 2001;**285**: 2481-5.
303. Roldán V, Marín F, Corral J, González-Conejero R, Vicente V. Influencia de los factores ambientales y genéticos en la trombosis arterial. *Haematologica* 2005;**90 Supl 1**: 294-8.

304. Marín F, González-Conejero R, Lee KW, Corral J, Roldán V, López F, Sogorb F, Caturla J, Lip GY, Vicente V. A pharmacogenetic effect of factor XIII valine 34 leucine polymorphism on fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;**45**: 25-9.
305. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;**36**: 959-69.
306. Sullivan DR, Marwick TH, Freedman SB. A new method of scoring coronary angiograms to reflect extent of coronary atherosclerosis and improve correlation with major risk factors. *Am Heart J* 1990;**119**: 1262-7.
307. Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke BA. Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein (a). *Am J Hum Genet* 1991;**49**: 1063-74.
308. 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.
309. España F, Hendl S, Gilabert J, Estellés A, Aznar J. Evaluation of two functional assays for protein C inhibitor/plasminogen activator inhibitor-3 activity. *Thromb Res* 1993;**70**: 375-84.
310. Hendl S, España F, Aznar J, Estellés A, Gilabert J. Functional and immunological determination of protein C by immunosorbent assays. *Rev Iberoamer Tromb Haemost* 1991;**4**: 16-20.
311. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;**16**: 1215.
312. Izquierdo M. Técnicas bioquímicas básicas para el análisis genético a nivel molecular. Ingeniería Genética. Madrid: Ediciones Pirámide S.A. 1993: 71-72.
313. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;**230**: 1350-4.
314. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;**51 Pt 1**: 263-73.
315. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;**155**: 335-50.
316. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;**239**: 487-91.
317. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976;**127**: 1550-7.
318. Margaglione M, Grandone E, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, d'Addeda M, Di Minno G. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb Haemost* 1997;**77**: 605-6.

319. Doughty M, Mehta R, Bruckman D, Das S, Karavite D, Tsai T, Eagle K. Acute myocardial infarction in the young-The University of Michigan experience. *Am Heart J* 2002;**143**: 56-62.
320. Rumbolat Z, Rumbolat M, Presenti S, Polic S, Miric D. Peculiarities of myocardial infarction at young age in Southern Croatia. *Cardiologia* 1995;**40**: 407-11.
321. Sytkowski PA, D'Agostino RB, Belanger A, Kannel WB. Sex and time trends in cardiovascular disease incidence and mortality: the Framingham Heart Study, 1950-1989. *Am J Epidemiol* 1996;**143**: 338-50.
322. Gil VF, Rubio C, Belda J, Pascual R, Pérez Barba C, Merino J. Validación de la determinación separada del colesterol total en la prevención primaria del riesgo coronario. *Med Clin (Barc)* 1995;**104**: 612-6.
323. Gil VF, Buhigues F, Pedrera V, Medina E, Tevar A, Quirce F, Orozco D, Merino J. Importancia de la determinación del colesterol HDL en la evaluación del riesgo coronario en la práctica clínica. *Aten Primaria* 1995;**16**: 254-60.
324. Rogers WJ, Bowlby LJ, Chandra NC, French WJ, Gore JM, Lambrew CT, Rubison RM, Tiefenbrunn AJ, Weaver WD. Treatment of myocardial infarction in the United States (1990 to 1993). Observations from the National Registry of Myocardial Infarction. *Circulation* 1994;**90**: 2103-14.
325. Valls Serral A, Bodí Peris V, Sanchís Forés J, Insa Pérez L, Gómez-Aldaraví Gutiérrez R, Llácer Escorihuela A, López Merino V. Factores pronósticos tras el infarto agudo de miocardio tratado con fibrinolíticos. *Rev Esp Cardiol* 1999;**52**: 95-102.
326. Bodí V, Sanchís J, Llácer A, Núñez J, Fácila L, Pellicer M, Bertomeu V, Bosch MJ, García D, Chorro FJ. Diferencias entre sexos en la mortalidad a un mes y a un año tras un síndrome coronario agudo. *Med Clin (Barc)* 2004;**122**: 566-9.
327. Marrugat J, García M, Elosúa R, Aldasoro E, Tormo MJ, Zurriaga O, Aros F, Masiá R, Sanz G, Valle V, Lopez De Sá E, Sala J, Segura A, Rubert C, Moreno C, Cabades A, Molina L, López-Sendón JL, Gil M. Short-term (28 days) prognosis between genders according to the type of coronary event (Q-wave versus non-Q-wave acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris). *Am J Cardiol* 2004;**94**: 1161-5.
328. No evidence of association between prothrombotic gene polymorphisms and the development of acute myocardial infarction at a young age. *Circulation* 2003;**107**: 1117-22.
329. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, Khan MI, De Bart AC, Aber VR, Maseri A, Kluff C. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988;**62**: 635-7.
330. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989;**79**: 101-6.
331. Muller JE, Tofler GH, Stone PH. Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* 1989;**79**: 733-43.

332. Zorio E, Castelló R, Falcó C, España F, Osa A, Almenar L, Aznar J, Estellés A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. *Br J Haematol* 2003;**122**: 958-65.
333. Leurs J, Nerme V, Sim Y, Hendriks D. Carboxypeptidase U (TAFIa) prevents lysis from proceeding into the propagation phase through a threshold-dependent mechanism. *J Thromb Haemost* 2004;**2**: 416-23.
334. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet* 1993;**341**: 1165-8.
335. Krakoff J, Funahashi T, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Tanaka S, Matsuzawa Y, Kobes S, Tataranni PA, Hanson RL, Knowler WC, Lindsay RS. Inflammatory markers, adiponectin, and risk of type 2 diabetes in the Pima Indian. *Diabetes Care* 2003;**26**: 1745-51.
336. Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle and hemostatic risk factors for ischemic heart disease: the Caerphilly Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**: 271-9.
337. Rosito GA, D'Agostino RB, Massaro J, Lipinska I, Mittleman MA, Sutherland P, Wilson PW, Levy D, Muller JE, Tofler GH. Association between obesity and a prothrombotic state: the Framingham Offspring Study. *Thromb Haemost* 2004;**91**: 683-9.
338. Navarro S, Zorio E, Medina P, Estellés A, Osa A, Palencia M, Almenar L, Aznar J, España F. Los valores reducidos de proteína C activada están asociados con infarto de miocardio a edad temprana y son un marcador de enfermedad coronaria difusa. *Haematologica (ed. esp.)* 2004;**89** **extraordin. 2**: 18.
339. Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost* 2000;**83**: 639-43.
340. Petaja J, Pesonen E, Fernández JA, Griffin JH, Repo H, Jansson SE, Vento AE, Ramo OJ. Activated protein C and inflammation in human myocardium after heart surgery. *Am J Hematol* 2001;**67**: 210-2.
341. Laszik ZG, Zhou XJ, Ferrell GL, Silva FG, Esmon CT. Down-regulation of endothelial expression of endothelial cell protein C receptor and thrombomodulin in coronary atherosclerosis. *Am J Pathol* 2001;**159**: 797-802.
342. 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.
343. Díez N, Montes R, Alonso A, Medina P, Navarro S, España F, Hermida J. Association of increased fibrinogen concentration with impaired activation of anticoagulant protein C. *J Thromb Haemost* 2006;**4**: 398-402.
344. Masamura K, Oida K, Kanehara H, Suzuki J, Horie S, Ishii H, Miyamori I. Pitavastatin-induced thrombomodulin expression by endothelial cells acts via inhibition of small G proteins of the Rho family. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;**23**: 512-7.

345. Shi J, Wang J, Zheng H, Ling W, Joseph J, Li D, Mehta JL, Ponnappan U, Lin P, Fink LM, Hauer-Jensen M. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;**14**: 575-85.
346. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001;**103**: 2248-53.
347. Montes R, Hurtado V, Alonso A, Foco L, Zonzin P, Mannucci PM, Hermida J. Autoantibodies against the endothelial receptor of protein C are associated with acute myocardial infarction in young women. *J Thromb Haemost* 2005;**3**: 1454-8.
348. Schroeder V, Chatterjee T, Metha H, Windecker S, Pham T, Devantay N, Meier B, Kholer HP. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thromb Haemost* 2002;**88**: 1020-5.
349. Zorio E, Falcó C, Arnau MA, España F, Osa A, Ramón LA, Castelló R, Almenar L, Palencia MA, Estellés A. Lipoprotein (a) in young individuals is a marker of the presence of ischemic heart disease and the severity of the coronary lesions. *Haematologica* 2006;**91**: (en prensa).
350. Vossen CY, Hasstedt SJ, Rosendaal FR, Callas PW, Bauer KA, Broze GJ, Hoogendoorn H, Long GL, Scott BT, Bovill EG. Heritability of plasma concentrations of clotting factors and measures of a prethrombotic state in a protein C-deficient family. *J Thromb Haemost* 2004;**2**: 242-7.
351. Monmeneu JV, Chorro FJ, Bodí V, Sanchís J, Llácer A, García-Civera R, Ruiz R, Sanjuán R, Burguera M, López-Merino V. Relationships between heart rate variability, functional capacity, and left ventricular function following myocardial infarction: an evaluation after one week and six months. *Clin Cardiol* 2001;**24**: 313-20.
352. García-Rubira JC, Molano F, Espina A, Calvo R, González-Valday M, García-Martínez JT, Cruz JM. Abnormal filling pattern of the left ventricle and outcome in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1997;**61**: 143-9.
353. García-Rubira JC, Pérez-Leal I, García-Martínez JT, Molano F, Hidalgo R, Gómez-Barrado JJ, Cruz JM. The initial electrocardiogram pattern is a strong predictor of outcome in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 1995;**51**: 301-5.
354. Bjorkman JA, Abrahamsson TI, Nerme VK, Mattsson CJ. Inhibition of carboxypeptidase U (TAFIa) activity improves rt-PA induced thrombolysis in a dog model of coronary artery thrombosis. *Thromb Res* 2005;**116**: 519-24.