



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**ACULTAD**

**TITULO:**

**VALORACIÓN DE LOS SISTEMA HEMOSTÁTICO-FIBRINOLITICO Y DE LA FUNCIÓN  
ENDOTELIAL EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:**

**ROGELIO IVÁN SILVA RUEDA**

**TUTORES**

**Dr. En C. JOSÉ RAMÓN PANIAGUA SIERRA**

**Dra. En C. IRMA ISORDIA SALAS**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.**

**CIUDAD DE MEXICO**

**MAYO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Investigación en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional No.1 “Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro” del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. en C. Irma Isordia Salas.

El proyecto fue financiado por el apoyo económico del Fondo de Investigación en Salud IMSS (FIS/IMSS/PROT/541) (FIS/IMSS/PROT/G10/838)



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Autorizado**

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3609

FECHA 25/06/2008

**Estimado Irma Isordia Salas**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

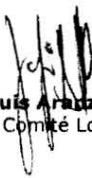
**VALORACION DE LOS SISTEMAS HEMOSTATICO-FIBRINOLITICO Y DE LA FUNCION ENDOTELIAL EN PACIENTES CON SINDROME METABOLICO**

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de: **A U T O R I Z A D O**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional

No. de Registro
R-2008-3609-16

Atentamente

  
**Dr(a). José Luis Aranza Aguilar**  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 3609

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

**FIRMAS AUTORIZACION DE PROYECTO DE TESIS**

**RESPONSABLE DE LA SEDE ACADEMICA**  
**CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

---

**DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ**

**TUTOR**

---

**D. EN C. JOSE RAMON PANIAGUA SIERRA.**

**TUTOR**

---

**D. EN C. IRMA ISORDIA SALAS**

## INDICE

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Justificación	20
Planteamiento del problema	21
Preguntas de investigación	21
Hipótesis	21
Objetivos	22
Sujetos, Material y métodos	22
· Lugar donde se realizó el estudio	22
· Diseño del estudio	22
· Diseño de la muestra	23
· Criterios de inclusión	23
· Criterios de exclusión	23
· Variables	24
Aspectos éticos	25
Recursos, financiamiento y factibilidad	26
Análisis estadístico	26
Resultados	28
Discusión	34
Conclusiones	41
Referencias bibliográficas	43
Anexos	56

## RESUMEN

**Antecedentes.** Factores metabólicos y genéticos que inducen la sobre expresión del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1); Los niveles más altos de PAI-1 disminuyen la fibrinólisis y promueven la aterotrombosis. **Objetivo.** Determinar si existe asociación de los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1(PAI-1) y del R353Q del FVII con el Síndrome Metabólico (SM) en la población mexicana y su correlación con la concentración de ambas proteínas expresadas por dichos genes. **Métodos.** Se realizó un ensayo observacional y transversal de 2012 a 2014. Se determinaron los polimorfismos 4G/5G y R353Q por PCR-RFLP. La concentración plasmática de PAI-1 fue determinada por técnica de ELISA y el FVII por método coagulométrico. **Resultados.** Se estudiaron 250 pacientes con SM y de 250 sujetos sin SM. La edad con los pacientes con SM fue de  $52.7 \pm 8.1$  vs.  $49.1 \pm 6.2$  en el grupo control con predominio de sexo femenino en ambos grupos (62.4% vs 63.2%, respectivamente). En relación a los factores de riesgo, mostraron diferencias: IMC ( $p < 0.01$ ), Triglicéridos ( $p < 0.01$ ), Hipertensión ( $p = < 0.001$ ), Antecedentes Heredofamiliares para DM2 ( $p = 0.01$ ). La distribución genotípica del polimorfismos 4G/5G fue similar entre pacientes con SM y controles ( $p = 0.88$ ). La distribución alélica fue 4G 36.0% en los casos y 35.6% en los controles  $p = 0.89$ . Entre los pacientes, la frecuencia del alelo R fue de 89.3 vs 92.6% de los controles. No se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ( $p = 0.29$ ) y la frecuencia alélica ( $p = 0.30$ ) del polimorfismo R353Q entre ambos grupos. **Conclusión.** No existieron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en pacientes con SM respecto a los controles. Tampoco hubo diferencia en la distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo R353Q en pacientes con SM respecto a los controles. Sin embargo, pudimos identificar un incremento en la concentración plasmática de PAI-1 y FVII de la coagulación en los pacientes con síndrome metabólico en comparación con el grupo control, pero no estuvo relacionada con los polimorfismos 4G/5G o R353Q respectivamente.

**Palabras clave:** PAI-1, síndrome metabólico, Factor VII. Polimorfismo.

## ABSTRACT

**Background.** Genetic and metabolic factors can induce an increased Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). It has been demonstrated that increased levels of PAI-1 are associated with a hypofibrinolysis and atherothrombosis. **Objective.** To determine the association of 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene and the R353Q in the coagulation FVII and Metabolic Syndrome (MS) in Mexican population and their correlation with the expressed protein concentration of both genes. **Methods.** In a case control study carry on from 2012 to 2014 a total of 250 patients with MS and 250 individuals without MS were included. The 4G/5G and R353Q were determined by PCR-RFLP. PAI-1 plasma concentration was determined by ELISA technique and FVII by coagulometric assay. **Results.** A total of 250 patients with MS and 250 subjects without MS were included. The mean age of patients was  $52.7 \pm 8.1$  vs.  $49.1 \pm 6.2$  in the control group with higher percent of female in both groups (62.4% vs 63.2%, respectively). The risk factors associated with an increased risk were: Body mass index ( $p < 0.01$ ), Triglycerides ( $p < 0.01$ ), Hypertension ( $p < 0.001$ ), Family History of T2DM ( $p = 0.01$ ). The genotype distribution of 4G/5G polymorphism was similar between both groups patients and controls ( $p = 0.88$ ). The allelic distribution was 4G 36.0% in the group of patients and 35.6% in the control group  $p = 0.89$ . Patients with MS the frequency for the allele R was 89.3 vs 92.6% in controls. There was no statistical significant difference in the genotype distribution ( $p = 0.29$ ) or allelic frequency ( $p = 0.30$ ) of polymorphism R353Q polymorphism between both groups. **Conclusion.** There was no statistical significant differences in the genotype or allelic distribution 4G/5G polymorphism between patients and controls. Also, there was no difference in the genotype distribution or allelic frequency of R353Q polymorphism in both groups. However, we identified an increased plasma concentration of PAI-1 and coagulation FVII between patients and controls, but there was not influenced by the polymorphisms 4G/5G or R353Q respectively

**Key words:** PAI-1, metabolic syndrome, Factor VII. Polymorphism.

## INTRODUCCIÓN

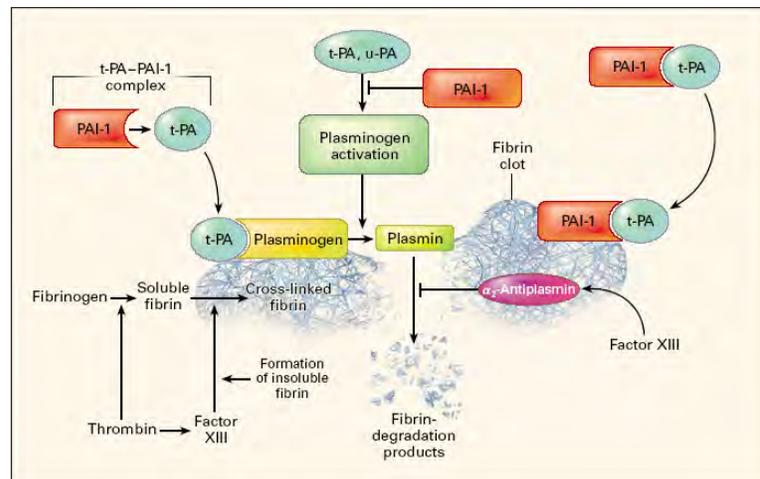
El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por un conjunto de factores, los cuales predisponen al individuo a desarrollar enfermedad aterosclerótica vascular<sup>1,2</sup>. El SM fue descrito por Raven en 1988, y puede estar conformado por dos o más componentes como la hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensión, obesidad abdominal e intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2 (no insulino-dependiente)<sup>3</sup>. Los individuos con SM tienen un incremento en el riesgo de desarrollar Diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. En 1999 la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>4</sup>, utiliza el nombre de Síndrome Metabólico para formalizar el conjunto de factores como una entidad clínica. El SM afecta aproximadamente un 25% del total de la población adulta de los Estados Unidos de Norteamérica, lo que representa más de 70 millones de residentes americanos<sup>5</sup>.

Es más frecuente en el género femenino en las poblaciones Africana-Americana, hindú, hispanos y del Sur de Asia. Diversos estudios han demostrado que existe una prevalencia similar entre las poblaciones a nivel mundial. La prevalencia del SM alrededor del mundo es similar<sup>5-13</sup>. En países como Finlandia y Suecia<sup>8</sup>, la presencia del SM es del 10 al 15% en mujeres y hombres. Se ha observado un incremento en el desarrollo del SM en las poblaciones como hispanos, árabes, chinos y del Sur de Asia<sup>14,15</sup> en las cuales existe un cambio de vida caracterizado por una disminución en la actividad física y un incremento en la ingesta de alimentos con alto contenido calórico. En nuestro país, un estudio multicéntrico identificó que la presencia de factores de riesgo cardiovascular como el sobrepeso y la hipertensión se encontraron en un 71.9% y un 26.5% en el total de la población estudiada, constituyendo dos posibles componentes del síndrome metabólico en los Mexicanos<sup>16</sup>. En el estudio CARMELA llevado a cabo en seis países latinoamericanos identificó que la prevalencia de hipertensión es similar entre los participantes, mientras que la hipercolesterolemia, fue el componente más frecuente entre los países participantes<sup>17</sup>. Una de las características principales del SM es la diabetes mellitus (DM), intolerancia a la glucosa, o resistencia a la insulina. Sin embargo, existen condiciones adicionales en este

síndrome, las cuales no son incluidas en la definición por la OMS como son: marcadores que caracterizan un estado de inflamación, anormalidades en la coagulación sanguínea como un incremento en el inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1), elevación de la concentración de fibrinógeno, incremento en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad y ácido úrico<sup>18</sup>.

### El Inhibidor del activador del Plasminógeno tipo-1 (PAI-1) como componente del Síndrome Metabólico.

El PAI-1 es una glicoproteína que está compuesta por 379aa., con un peso molecular de 50 kDa<sup>19</sup>, con actividad enzimática, el cual se une al tPA de una y dos cadenas, pero no reacciona con el uPA de cadena sencilla. De igual manera que otras serpinas, el PAI-1 lleva a cabo su acción inhibitoria sobre el t-PA mediante la formación de un complejo reversible estequiométrico 1:1<sup>20</sup> (Fig. 1). El PAI-1 es eliminado de la circulación por las células hepáticas<sup>21</sup>. El PAI-1 es sintetizado por diversos tipos celulares como son: las células endoteliales, plaquetas, placenta, hepatocitos, células del músculo liso vascular y monocitos/macrófagos<sup>22</sup>. El PAI-1 se almacena únicamente en la plaqueta, sin embargo, es secretado en forma rápida posterior a su síntesis. Se ha demostrado que exhibe un ritmo circadiano por lo que la concentración plasmática es mayor en la mañana y más baja durante la tarde o noche. PAI-1 circula en su forma activa formando un complejo con la glicoproteína vitronectina, la cual estabiliza su conformación activa e incrementa su vida media<sup>23</sup>.



**Figura 1.** Esquema de la activación e inhibición del sistema fibrinolítico. Normalmente el activador del plasminógeno tisular (t-PA) circula en el plasma como un complejo con el inhibidor del activador del plasminógeno tisular (PAI-1) en forma estequiométrica 1:1. Las reacciones son llevadas a cabo sobre la superficie del coagulo de fibrina. El plasminógeno es activado por el activador tipo tisular (t-PA) o tipo urinario (u-PA). El complejo plasminógeno, t-PA y fibrina promueven la formación de plasmina y la subsecuente lisis de la malla de fibrina en fragmentos de bajo peso molecular denominados productos de degradación de la fibrina. El PAI-1 también se une a la fibrina logrando retener su actividad inhibitoria sobre t-PA.

La concentración plasmática de PAI-1 esta incrementada en los pacientes con enfermedad arterial coronaria<sup>24-26</sup>, y es factor de riesgo para eventos coronarios en sujetos con angina<sup>27</sup> y para un segundo episodio de Infarto Miocárdico en sujetos quienes lo han presentado previamente<sup>28</sup>. Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 se correlaciona con componentes del síndrome de resistencia a la insulina como el Índice de Masa Corporal (IMC)<sup>29-32</sup>, presión arterial<sup>33</sup>, triglicéridos plasmáticos e insulina<sup>34-36</sup>. El incremento en los niveles de PAI-1 es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de diabetes tipo 2 en sujetos sanos como se demostró en el estudio IRAS, sugiriendo que podría considerarse como un marcador de riesgo temprano para el desarrollo de SM y diabetes tipo 2. El mecanismo por medio del cual PAI-1 se asocia con el desarrollo de SM fue descrito por primera vez en 1986 por un grupo de investigadores y en la actualidad está perfectamente establecido<sup>37-38</sup>. En los sujetos obesos existe un incremento de PAI-1 circulante, así como en los pacientes con Diabetes tipo 2. Entre más severo sea el SM, mayor es la concentración de PAI-1<sup>39</sup>. La concentración plasmática de PAI-1 disminuye cuando existe una mejoría en la respuesta a la insulina<sup>40</sup>. Además, se ha demostrado que los medicamentos hipoglucemiantes como la metformina disminuyen los niveles plasmáticos de PAI-1 en sujetos con diabetes tipo 2 y en sujetos obesos normales<sup>41-42</sup>. Por lo anterior se considera que el incremento en los niveles de PAI-1 es un componente fundamental en el desarrollo del SM<sup>43-44</sup>.

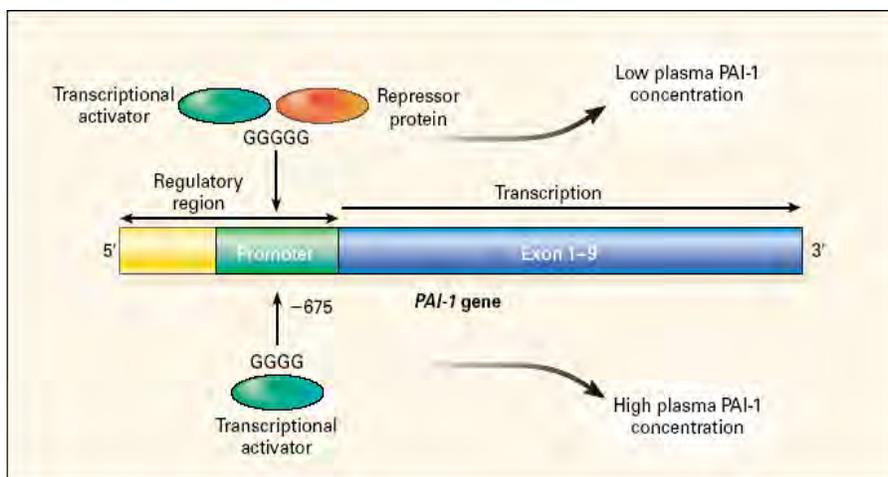
### **Posibles mecanismos que condiciones una sobreexpresión de PAI-1.**

El proceso por el cual se sobre-expresa PAI-1 es complejo e incluye diferentes factores inductores, los cuales estén involucrados al mismo tiempo y en diferentes sitios de la síntesis de la proteína, incluyendo la pared de los vasos sanguíneos<sup>45-</sup>

<sup>46</sup>. El incremento en la concentración de PAI-1 no está asociado a Interleucina 6 (IL-6), fibrinógeno o Proteína C reactiva (PCR), como se podría esperar debido a que se considera un reactante de fase aguda<sup>47-48</sup>, sino que está asociado al tejido adiposo y a depósitos de grasa ectópica como sitios moduladores de la sobreexpresión de PAI-1<sup>49-50</sup>. Diversos grupos de investigadores han identificado la habilidad de la célula adiposa para sintetizar PAI-1<sup>51-53</sup> en respuesta a un estímulo crónico al factor de necrosis tumoral (TNF), insulina y factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ )<sup>54</sup>.

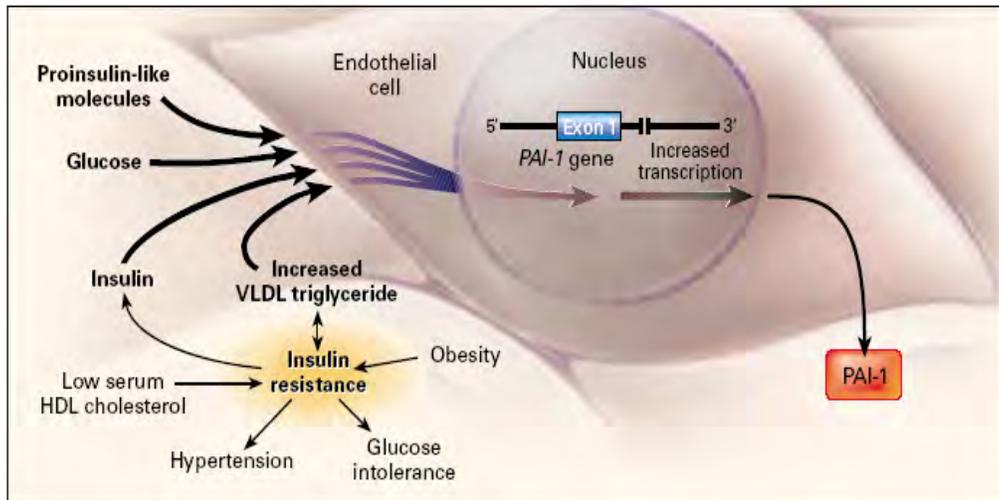
### **Asociación del polimorfismo 4G/5G en el gen del Inhibidor del Activador del Plasminógeno tipo-1 (PAI-1) y el Síndrome Metabólico.**

Estudios han identificado un polimorfismo en la región promotora del gen del PAI-1, el cual es asociado con un incremento en la concentración plasmática de PAI-1. En el humano el gen del PAI-1 está localizado en el cromosoma 7 y contiene 9 exones y 8 intrones. Se han descrito diversos polimorfismos en dicho gen. El polimorfismo más importante se encuentra localizado en la región promotora 675bp corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (4G/5G). El incremento en la transcripción genética del PAI-1 está asociado con 4 bases de guanina (el alelo 4G), lo cual da como resultado la unión a una proteína del activador de transcripción del PAI-1, mientras que el de 5 bases de guanina (el alelo 5 G), se une a una proteína receptora que disminuye la unión del activador (Fig. 2). Los individuos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G genotipo) tienen concentraciones 25% más altas de PAI-1 que los sujetos que son homocigotos para el alelo 5G (5G/5G genotipo). Los estudios llevados a cabo *in vitro*, han permitido identificar diferencias en la capacidad de unión a este sitio de las proteínas reguladoras de la transcripción.



**Figura 2.** Estructura del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el sitio del polimorfismo 4G/5G, localizado en la región del promotor. El polimorfismo 4G/5G localizado en la posición -675 incrementa la transcripción de PAI-1 y por lo tanto la concentración plasmática de PAI-1. Lo anterior es debido a que existe una diferencia en la capacidad de unión a proteínas reguladoras. La secuencia de 4 bases de guanina (alelo 4 G) se une a una proteína facilitadora y a una represora de la transcripción, por lo que se asocia con un incremento en la concentración plasmática de PAI-1, mientras que la secuencia de cinco bases de guanina (alelo 5G) solo se une a una proteína represora por lo que la concentración plasmática de PAI-1 es menor.

Además, se ha visto que el incremento en la concentración de PAI-1 es aún mayor en presencia de hipertrigliceridemia<sup>55-56</sup>. También se ha demostrado que las proteínas de muy baja densidad (VLDL) inducen un aumento en los niveles de la transcripción del promotor del PAI-1 a nivel de las células endoteliales, cuyo mecanismo se debe a la existencia de un elemento de respuesta de las VLDL denominado (VLDLRE), localizado en la región promotora del gen y su actividad se incrementa por la presencia del polimorfismo 4G/5G, debido a su localización en un sitio adyacente a la región corriente arriba del sitio de unión del factor de transcripción de inducción de las VLDL. Estos hallazgos dan una explicación molecular entre la asociación de las VLDL y el incremento en la actividad plasmática de PAI-1, así como para la interacción entre el polimorfismo 4G/5G y los niveles plasmáticos de triglicéridos<sup>57</sup> (Fig.3).



**Figura 3.** Relación entre la síntesis del inhibidor del plasminógeno tisular tipo1 (PAI-1) y el Síndrome Metabólico. La característica principal del dicho síndrome es la hiperinsulinemia, anomalías en el metabolismo de la glucosa, hipertrigliceridemia y baja concentración sérica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión y obesidad. La insulina, las moléculas tipo proinsulina, y las lipoproteínas de muy baja densidad, directamente estimulan la transcripción y secreción del PAI-1 por las células endoteliales

Existen diversos estudios que demuestran una asociación entre la presencia del polimorfismo 4G/5G y el incremento en la concentración de PAI-1 en pacientes con SM o alguna de sus complicaciones microvasculares. Funk y cols., demostraron en una cohorte de 147 pacientes con diabetes mellitus, un incremento en el riesgo para el desarrollo de retinopatía diabética en los sujetos portadores del alelo 4G<sup>58</sup>. Algunos estudios han demostrado un incremento en la concentración de PAI-1 en los sujetos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G) en comparación con los homocigotos para el alelo 5G (5G/5G)<sup>59-62</sup>. Algunos medicamento hipoglucemiantes producen una disminución en la expresión del PAI-1 en las células adiposas, protegiéndolas a la resistencia a la insulina promoviendo la diferenciación del adipocito mediante un decremento en la expresión del receptor gamma perioxosomal activado<sup>63</sup>. Algunos estudios han demostrado una fuerte asociación entre la concentración plasmática de PAI-1 y el ser portador del alelo homocigotos para el alelo.

### **Disfunción endotelial en el Síndrome Metabólico.**

El endotelio es considerado como el regulador más importante de la homeostasis manteniendo un balance entre vasodilatación y vasoconstricción, inhibición y estimulación del crecimiento y migración de las células musculares lisas y la trombogénesis y la fibrinólisis. Cuando este equilibrio se rompe, produce lo que se le denomina “Disfunción endotelial”, causando daño de la pared endotelial <sup>64,65</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1. Mantenimiento de la homeostasis por el endotelio vascular.**

- 
- Regulación de la permeabilidad vascular.
  - El mantenimiento del tono vascular y por lo tanto de la presión arterial, mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras.
  - La capacidad de expresar moléculas de adhesión, que a su vez controlan el reclutamiento de leucocitos al subendotelio, donde serán activados participando en el proceso inflamatorio.
  - La síntesis y liberación de sustancias reguladoras del crecimiento celular.
  - La creación de una superficie no trombogénica que impida la coagulación sanguínea en condiciones fisiológicas.

Entre los agentes vasodilatadores más importantes está el óxido nítrico (ON), prostaciclina, bradicinina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. También, existen sustancias vasoconstrictoras como que contribuyen a mantener el tono vascular como son anión superóxido, factor derivado del endotelio, tromboxano, angiotensina II. (Tabla 2) Estos agentes no solo han sido relacionados con el control de la regulación arterial, sino también se ha demostrado contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis <sup>66,67</sup>.

TABLA 2. SUBSTANCIAS DERIVADAS DEL ENDOTELIO.

**ATEROGENICAS**

**VASOCONSTRICTORES**

Endotelina, Angiotensina II,  
Factores constrictores derivados  
del endotelio, Superóxido,  
Tromboxano A<sub>2</sub>, Prostaglandina H<sub>2</sub>,  
Acetilcolina, Ácido Araquidónico.

**PROTROMBOTICOS**

Endotelina-1, Fibrinógeno,  
Factor Tisular, Tromboxano A<sub>2</sub>,  
Óxido Nítrico, Factor de von Willebrand,  
Activador del TAFI,  
Receptor de la trombina,  
Factor de activación plaquetaria,  
Sitios de unión para: fibrina, Factor IX, IXa,  
X, Xa, XII, precalicreína,  
Inhibidor del Activador del Plasminógeno  
tipo 1 y 2 (PAI-1 y PAI-2),

**PROINFLAMATORIOS**

CAMs (ELAMs, ICAMs, VCAMs),  
Quimocinas, Factor nuclear k-B,  
Proteína C Reactiva (PCR),  
Factor de Necrosis Tumoral Alfa,  
Interleucina 6 (IL-6).

**PROLIFERATIVOS**

ET-1, Angiotensina II, Radicales libres,  
Factor de crecimiento derivado de  
Plaquetas, Factor de crecimiento de  
Fibroblastos, Interleucinas,  
Factor de crecimiento tipo insulina.

**ANTI-ATEROGENICAS**

**VASODILATADORES**

Óxido Nítrico, Prostaciclina GI<sub>2</sub>,  
Histamina, Bradicnina, Serotonina  
y sustancia P.

**ANTI-TROMBOTICO**

Prostaciclina, Prostaglandina E<sub>2</sub>,  
Factor de von Willebrand,  
Activador del Plasminógeno Tisular,  
Sitios de unión a plasminógeno,  
Óxido Nítrico

**ANTI-INFLAMATORIOS**

Óxido Nítrico.

**ANTIPROLIFERATIVO**

Óxido Nítrico, Prostaciclina,  
Sulfato de Heparán.

**Tabla 2.** Substancias derivadas del endotelio, las cuales le permiten llevar a cabo sus funciones para mantener un balance vasomotor y la homeostasis entre el tejido vascular y el que lo rodea.

En la actualidad se conoce que la disfunción endotelial sea secundaria a la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, además de otros componentes del síndrome cardiometabólico<sup>66-68</sup>. Se han descrito algunos factores que favorecen el desarrollo de la disfunción endotelial como la hiperlipidemia, hiperglicemia, hipertensión y tabaquismo (Tabla 3).

-  
**Tabla 3.** Efecto de los factores de riesgo cardiovascular en el desarrollo de la trombosis arterial.  
-

#### **DIABETES MELLITUS:**

- Disfunción endotelial.
- Disminución del poder de vasodilatación vascular.
- Incremento de la adhesión y agregación plaquetaria.
- Incremento en la síntesis de tromboxano A2.
- Incremento en los niveles de fibrinógeno y Factor von Willebrand.
- Incremento en la actividad de PAI-1.
- Aumento de la actividad procoagulante de los monocitos.

#### **TABAQUISMO:**

- Incremento en la adhesión y agregación plaquetaria.
- Incremento en el nivel plasmático de fibrinógeno.

#### **DISLIPIDEMIA:**

- Incremento en la adhesión y agregación plaquetaria.
- Incremento en la síntesis y expresión del factor tisular.
- Favorece el desarrollo del trombo.

#### **HIPERTENSION ARTERIAL:**

- Incremento en el nivel de fibrinógeno.
  - Incremento en la actividad plaquetaria.
  - Lesión endotelial (incremento del factor de von Willebrand).
  - Incremento en la permeabilidad vascular.
  - Favorece proliferación de las células del músculo liso vascular.
-

La disfunción endotelial origina un desequilibrio en la producción endotelial de los factores que produce, como son: adhesión plaquetaria, agregación y trombogenicidad sanguínea. Por lo tanto la disfunción endotelial origina agregación plaquetaria en ciertas áreas, liberación de citocinas, factores de crecimiento iniciando una respuesta inflamatoria. Después, de la primera respuesta inflamatoria, se ha postulado que el colesterol de las LDL es más activo produciéndose un incremento en la oxidación del mismo lo que da origen a la formación de la placa. Además, las células musculares lisas participan en el proceso mediante la migración dentro de la íntima, proliferando e incrementando la producción de las proteínas de la matriz extracelular. La suma de estos procesos da origen a la formación de la placa aterosclerótica<sup>66,68</sup>. Algunos estudios han demostrado que existe una disminución de la función endotelial en los individuos con disminución en la tolerancia a la glucosa, diabetes o en sujetos con síndrome metabólico<sup>69</sup>.

### **El polimorfismo R353Q en el gen del factor VII de la coagulación.**

Como se mencionó anteriormente, el sistema hemostático participa en forma importante en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria, debido a su contribución en la formación de la placa y crecimiento de la misma<sup>70</sup>. En los síndromes coronarios, el evento precipitante es la ruptura de la placa aterosclerótica con la formación del trombo<sup>71</sup>. La activación de la vía extrínseca de la coagulación es iniciada por la unión del factor tisular y la formación del complejo con el factor VII de la coagulación (FVII), cuyo incremento en su concentración plasmática es considerado como factor de riesgo en los eventos coronarios en pacientes jóvenes<sup>72</sup>.

El FVII es una glicoproteína de 50kDa vitamina K dependiente, con actividad de serina proteasa sintetizada en el hígado<sup>73</sup>. En el estudio Northwick Park Heart (NPHS)<sup>74</sup>, se demostró una asociación entre la actividad procoagulante del FVII (FVII:c) y la enfermedad arterial coronaria, aunque esto no ha sido confirmado por otros<sup>75-77</sup>. Sin embargo, un análisis 16 años más tarde del estudio NPHS encontró

una significativa asociación entre los FVII y la incidencia de eventos cardiacos fatales<sup>78</sup>. Los resultados del estudio PROCAM corroboran estos hallazgos. Se ha demostrado un incremento en la concentración plasmática del FVII en sujetos con SM, en sujetos sanos<sup>79-81</sup> y en sujetos con diabetes tipo 2<sup>82</sup>. También, se ha demostrado un incremento en los familiares en primer grado de sujetos con diabetes tipo 2. La concentración plasmática del FVII se relaciona con los niveles de lípidos<sup>83</sup> específicamente con triglicéridos y proteínas de muy baja densidad<sup>84,85</sup>. Estudios han demostrado una disminución simultánea de las concentraciones de triglicéridos y FVII cuando los pacientes reciben tratamiento para la dislipidemia<sup>86</sup>. Se han descrito diferentes mecanismos para explicar la relación entre el FVII y los triglicéridos y VLDL. El FVII se une a los triglicéridos y a las partículas de VLDL, y un catabolismo postprandial de las lipoproteínas ricas en triglicéridos prolonga la vida media del FVII, por lo que incrementa su concentración plasmática<sup>87,88</sup>. Otro mecanismo es que las partículas lipídicas tienen un rol promoviendo la activación del factor VII<sup>89-90</sup>. La hiperlipidemia es asociada con activación del sistema prekalikreina-kalikreina en vivo<sup>91,92</sup> produciendo un incremento en los niveles del FVII por dicho sistema. Incremento en los niveles plasmáticos de las VLDL probablemente afecten FVII en forma directa mediante la generación kalikreína o proporcionando una superficie con carga negativa lo que produce un activación de la vía de la coagulación intrínseca<sup>93</sup>. En estudios recientes se demuestra una asociación en los niveles plasmáticos del FVII y la presencia del polimorfismo originado por la sustitución de una base de guanina por una de adenina en la posición 353 en el exón 8 resultando una sustitución del aminoácido de arginina por uno de glutamina (Arg/Gln) R353Q. La importancia de dicho polimorfismo es que en los sujetos que son portadores del alelo conteniendo en su secuencia el aminoácido de glutamina (Gln353), el nivel plasmático del FVII es menor que aquellos que son homocigotos para el alelo que contiene el a.a. de arginina (Arg353)<sup>94-96</sup>. Esto quizá produzca una disminución en la producción por el hepatocito o incremente su catabolismo, por lo tanto reduce su actividad circulante. La asociación entre colesterol, triglicéridos y FVII es más importante en individuos con el alelo Arg353<sup>97</sup>.

Posteriormente se ha demostrado una interacción entre el genotipo y la concentración plasmática de triglicéridos debido a que la concentración de estos últimos es mayor en los sujetos portadores del a.a. arginina en la molécula del FVII que en los portadores de la secuencia con glutamina.

## **JUSTIFICACION.**

El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por un conjunto de factores, los cuales predisponen al individuo a desarrollar enfermedad aterosclerótica vascular. Los individuos con diagnóstico de SM tienen un incremento en el riesgo de desarrollar Diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. El SM afecta aproximadamente un 25% del total de la población adulta de los Estados Unidos de Norteamérica, lo que representa más cerca de 70 millones de residentes americanos. En México en forma conjunta con la diabetes representa una de las primeras causas de morbi-mortalidad. Existen diversos estados que favorecen el desarrollo del SM entre ellos tenemos anormalidades en el sistema hemostático como el incremento en los factores de coagulación (FVII de la coagulación) y en el fibrinolítico como un incremento en la concentración plasmática del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1). Existen diversas variantes en los genes que codifican para dichas proteínas genotípicas que condicionan alteración de dichos elementos, los cuales no han sido estudiados en nuestra población como probables factores de riesgo para el desarrollo del SM, por lo que considero importante su estudio.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

### **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

#### **GENERAL.**

¿Existe asociación de los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1) y de R353Q en el FVII de la coagulación asociados con el SM en la población mexicana?

#### **ESPECÍFICA.**

1. ¿Cuáles es la concentración plasmática de PAI-1 en cada uno de los genotipos del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1?
2. ¿Cuáles es la concentración plasmática del FVII de la coagulación en cada uno de los genotipos del polimorfismo R353Q?

#### **HIPOTESIS.**

**Ho:** Los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1(PAI-1) y del R353Q del factor FVII de la coagulación no se asocian al Síndrome Metabólico en la población mexicana.

**Hi:** Los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1(PAI-1) y del R353Q del factor FVII de la coagulación se asocian al Síndrome Metabólico en la población Mexicana.

#### **ESPECÍFICO.**

1. La concentración plasmática de PAI-1 es mayor en los portadores del genotipo 4G/4G en comparación de los portadores de los genotipos 4G/5G y 5G/5G.
2. La concentración plasmática del FVII es mayor en los portadores del genotipo Q/Q en comparación de los portadores de los genotipos R/Q y RR

## **OBJETIVO.**

### **GENERAL.**

Determinar si existe asociación de los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1(PAI-1) y del polimorfismo R353Q del FVII con el desarrollo del Síndrome Metabólico en la población mexicana.

### **ESPECÍFICO.**

1. Determinar la concentración plasmática de PAI-1 en cada uno de los genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1.
2. Determinar la concentración plasmática del FVII en cada uno de los genotipos del polimorfismo R353Q en cada uno de los genotipos.

## **SUJETOS, MATERIAL Y METODOS.**

### **1.- LUGAR DONDE SE REALIZARA EL ESTUDIO.**

El estudio se llevara a cabo en el Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor Sánchez Navarro y en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis Hemostasia y Aterogénesis del H.G.R. No 1 Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro.

### **2.- DISEÑO DE LA INVESTIGACION.**

Transversal.

### **3.- DISEÑO DE LA MUESTRA.**

#### **3.1 UNIVERSO DE TRABAJO.**

A) Pacientes con diagnóstico de Síndrome Metabólico del Hospital Carlos MacGregor Sánchez Navarro del IMSS en el periodo comprendido de Enero de 2012 a Diciembre del 2014.

B) Individuos aparentemente sanos que acudan al Banco de Sangre del hospital Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro del IMSS.

#### **3.2. GRUPOS DE ESTUDIO.**

A) Pacientes con diagnóstico de síndrome Metabólico.

B) Controles sujetos sanos sin diagnóstico de síndrome Metabólico.

#### **3.3 CRITERIOS DE INCLUSION.**

1.- Pacientes de cualquier género.

2.- Mayores de 18 y menores de 60 años.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSION.**

1. Que decidan no ingresar al protocolo.

2. Que presenten enfermedades trombóticas previas

**Se diagnosticaron con Síndrome Metabólico los sujetos que tenían 3 de los 5 siguientes criterios.**

#### **CRITERIOS ACORDE A LA NCRP ATP III PARA EL**

#### **DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME METABÓLICO**

1. Incremento en el perímetro central (medida de la cintura) en hombres (>102 cm) y mujeres (>88 cm).

2. Incremento en la concentración de triglicéridos ( $\geq 150$ mg/dL).

3. Lipoproteínas de Alta Densidad (hombre <40 mg/dL y mujeres <50mg/dL).

4. Incremento de Presión Arterial ( $\geq 130/85$ mmHg).

5. Incremento del nivel de glucosa en ayunas ( $\geq 110$ mg/dL).

NCEP ATP III = National Cholesterol Education Programme's Adult Treatment Panel III. JAMA 2001; 285: 2486-97.

## **VARIABLES.**

### **INDEPENDIENTE.**

1. Presencia del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1
2. Concentración plasmática de PAI-1

### **DEPENDIENTES.**

Presencia de Síndrome Metabólico

### **Definición Conceptual.**

Polimorfismo. El termino Polimorfismo genético, se refiere a la presencia de múltiples alelos en un determinado locus en una frecuencia de 1% en una población determinada.

Síndrome Metabólico. Es caracterizado por la presencia de dos o más de los siguientes componentes como son: 1) Incremento en el perímetro central (medida de la cintura) en hombres (>102 cm) y mujeres (>88 cm). 2) Incremento en la concentración de triglicéridos ( $\geq 150$ mg/dL). 3) Lipoproteínas de Alta Densidad (hombre <40 mg/dL y mujeres <50mg/dL). 4) Incremento de Presión Arterial ( $\geq 130/85$  mmHg). 5) Incremento del nivel de glucosa en ayunas ( $\geq 110$ mg/dL).

## **VARIABLES CONFUSORAS.**

### **Tabaquismo.**

a) Definición Conceptual: consumo de tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante un año, o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menos un año.

b) Definición Operacional: es la presencia del antecedente de haber consumido tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante

un año, o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menor un año.

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: si/no

## **FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ETICOS.**

En el Instituto Mexicano del Seguro Social se cuenta con la infraestructura para llevar a cabo la colección de muestras de pacientes con diagnóstico de SM, así como para la realización de pruebas de biología molecular (véase infraestructura). Con relación a los aspectos éticos, a todos los pacientes se les dará hoja de consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los Principios Éticos para la Investigación Médica que involucra sujetos humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki Finlandia 1964, modificada en Tokio, Japón 1975.

### **1.- Riesgo de la investigación.**

Según la Ley general de Salud en materia de la investigación para la salud el presente estudio confiere un riesgo mínimo a los participantes (Artículo 17).

### **2.- Contribuciones y beneficios del estudio para los participantes y la sociedad en su conjunto.**

Los participantes se verán beneficiados por una detección y tratamiento temprano de Síndrome Metabólico. El incremento del conocimiento sobre los aspectos fisiopatológicos y la potencial contribución al determinar si existe asociación de los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1(PAI-1) y del polimorfismo R353Q con el desarrollo del Síndrome Metabólico en la población Mexicana permitirán nuevas herramientas pronósticas y terapéuticas que podrían reducir complicaciones y riesgos en el ámbito cardiovascular.

### **3.- Confidencialidad.**

Se otorgará la seguridad al participante de que no se identificarán sus datos personales en conferencias y estudios publicados, y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad (Artículo 21 Fracción VIII de la Ley General de Salud).

### **4.- Condiciones en las que se solicitará consentimiento informado.**

La carta de consentimiento informado se solicitará previo a la inclusión del participante al estudio, durante su captación en la valoración en la consulta externa del Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor. Será solicitado por el investigador principal y colaboradores. El participante tiene la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento de la investigación (Artículo 21, Fracciones I-VII de la Ley General de Salud).

### **5.- Forma de selección de participante.**

Se incluirán a los pacientes en la consulta externa del Hospital General Regional No. 1 Carlos MacGregor., que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión y autoricen su inclusión al estudio mediante la carta de consentimiento informado.

### **INFRAESTRUCTURA FISICA Y HUMANA DISPONIBLES.**

La Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA), cuenta con un laboratorio de Biología Molecular y con la infraestructura para poder desarrollar el protocolo de investigación.

### **ANALISIS ESTADISTICO.**

Los datos se presentaran con medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo a la distribución de los datos. Se calculara riesgo relativo con intervalos de Confianza (IC) al 95% para las variables independientes. Las variables categóricas se analizaran con la prueba de chi cuadrada. Para el análisis de variables continuas se usara la prueba de *t* de Student. Para determinar el

equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizara la prueba de chi cuadrada. La significancia estadística entre las medias de los niveles de las variables entre los genotipos será examinada mediante el análisis de ANOVA. Será considerado con significancia estadística un valor de  $p < 0.05$  (dos colas).

## **CRONOGRAMA**

	Junio 2008			Enero 2012 – Diciembre 2014.				Enero 2015
PROTOCOLO EN EVALUACIÓN POR EL COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN								
INCLUSIÓN DE PACIENTES AL PROTOCOLO								
GENOTIPIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PAI-1								
ANÁLISIS DE INFORMACION								
INTEGRACION FINAL Y CONCLUSIONES								

## RESULTADOS.

Se estudiaron 250 pacientes mexicanos, en donde el rango de edad se encontró con promedio 56 años de edad, con el diagnóstico de Síndrome Metabólico y 250 sin SM pertenecientes al grupo control.

Se muestra en la **Tabla 1.** las características clínicas y demográficas de ambos grupos. La edad media de los pacientes con SM fue de  $52.7 \pm 8.1$  vs.  $49.1 \pm 6.2$  en el grupo control con predominio de sexo femenino en ambos grupos (62.4% vs 63.2%, SM vs control respectivamente). En relación a los factores de riesgo, muestran diferencias significativas IMC ( $p < 0.01$ ), concentración de Triglicéridos ( $p < 0.01$ ), Hipertensión 158 (63.2%) vs. 35 (14.0%),  $p < 0.001$ , Antecedentes heredo familiares para DMT2 165 (66.0%) vs. 122 (48.8%),  $p = 0.01$ . Sin embargo, no identificamos diferencias estadísticamente significativas. En las variables de colesterol  $230.8 \pm 74.3$  vs.  $207.1 \pm 54.2$ ,  $p = 0.32$ , Antecedentes Heredo Familiar para Enfermedad Aterotrombótica 48 (19.2%) vs 32 (12.8%),  $p = 0.68$  y tabaquismo. La concentración plasmática de PAI-1 en el grupo de casos fue 61.7 y en el grupo control 51.5 con una  $p = 0.02$ . Mientras que la concentración del FVII de la coagulación fue en el grupo de pacientes con SM 225% y en el grupo control 180%,  $p = 0.01$ .

**Tabla 1. Características demográficas y clínicas en pacientes con Síndrome Metabólico y controles.**

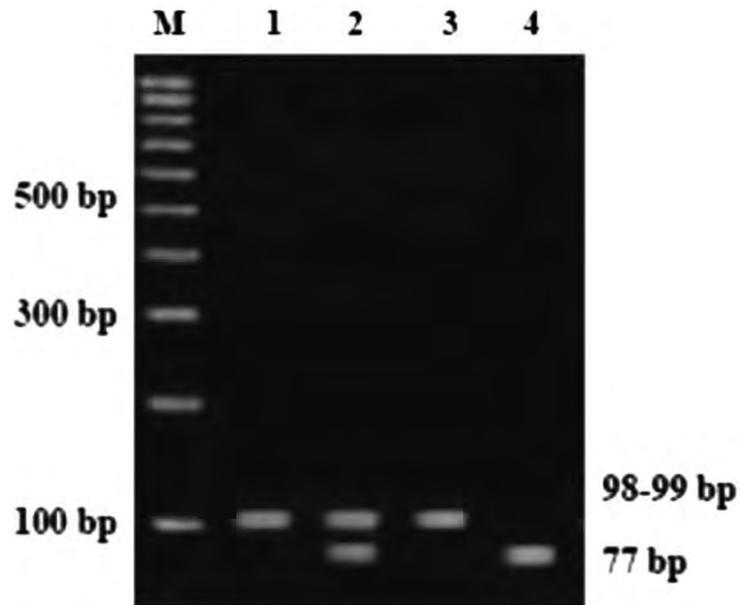
Variable	Paciente SM n=250	Control n=250	Valor p
Edad (años)	52.7± 8.1 156 (62.4)	49.1± 6.2 158 (63.2)	<0.001 0.33
Femenino (%)	31.4 ±5.4	27.4± 2.1	p =<0.01
IMC (kg/m <sup>2</sup> )			
HDLc mg/dL			
Hombre <50 n (%)	68 (25.2)	57 (22.4)	p =<0.01
Mujer <48 n (%)	151 (59.4)	140 (55.1)	
Triglicéridos (mg/dL) ≥ 150 mg/dl	237.4 ± 176.0	124.4 ± 109.7	p =<0.01
Colesterol	230.8 ± 74.3	207.1 ± 54.2	p =0.32
Hipertensión (%)	158 (63.2)	35 (14.0)	p <0.001
Tabaquismo	76 (30.4)	45 (18.0)	p=0.4
AHF para DMT2 n(%)	165 (66.0)	122 (48.8)	p=0.01
AHF de EAT n(%)	48 (19.2)	32 (12.8)	p= 0.68
PAI	61.7 (3.4)	51.5 (2.4)	p = 0.02
FVII %	225 %	180%	p = 0.01

ÍMC=índice de masa corporal; AHF de EAT=Antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica, AHF para DMT2 Antecedentes heredofamiliares para DMT2.

En la **Tabla 2.** Se muestra la distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en pacientes con SM vs. controles. El genotipo 4G/4G se encuentra en un 11.2% vs 9,2% en los controles , el 4G/5G 49.6% vs. 52.8% casos vs controles respectivamente y la distribución del genotipo 5G/5G fue similar en ambos grupo 39.2% en los casos y 38.0% en los controles. La distribución alélica fue 4G 36.0% en los casos y 35.6% en los controles p=0.89. (**Fig. 1**)

**Tabla 2. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en pacientes con *Síndrome Metabólico* y controles.**

	PACIENTES SM (n=250)	CONTROL (n= 250)	Valor de p
<b>Genotipo</b>			
4G/4G, n (%)	28 (11.2)	23 (9.2)	p= 0.88
4G/5G, n (%)	124 (49.6)	132 (52.8)	
5G/5G, n (%)	98 (39.2)	95 (38.0)	
4G/4G+4G/5G vs 5G/5G	152 (78.7) 98 (21.3)	155(62.0) 95 (38.0)	p =0.78
4G	180 (36.0)	178 (35.6%)	p =0.89
5G	320(64.0%)	322 (64.4%)	

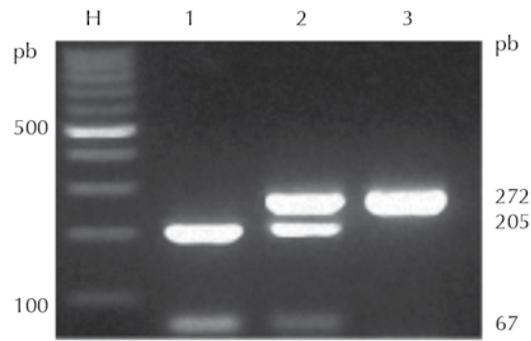


**Figura 1.** Análisis del gen 4G/5G del PAI-1. M representa el marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb); la línea 1 muestra los fragmentos del producto amplificado y restringido con la enzima *Bsl* I correspondiente al genotipo homocigoto 4G/5G (98-77pb); en la línea 2 se observan los fragmentos del producto amplificado y restringido correspondientes al genotipo heterocigoto 4G/5G (98-77pb), y la línea 3 muestra el fragmento correspondiente al genotipo homocigoto 5G/5G (77 pb).

En el **Tabla 3.** se observa la distribución genotípica y la frecuencia alélica de los polimorfismos R353Q en el gen del FVII de la coagulación. Entre los pacientes, la frecuencia del alelo R fue de 89.3 vs 92.6% de los controles. No se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ( $p = 0.29$ ) y la frecuencia alélica ( $p = 0.30$ ) del polimorfismo R353Q entre ambos grupos. **(Fig. 2)**

**Tabla 3. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo R353Q en pacientes con *Síndrome Metabólico* y controles.**

	PACIENTES SM (n=250)	CONTROL (n= 250)	Valor de <i>p</i>
<b>Genotipo</b>			
R/R, n (%)	204 (81.6)	215 (86.0)	p= 0.29
R/Q, n (%)	46 (18.4)	33 (13.2)	
Q/Q, n (%)	0 (0)	2 (0.8)	
R/Q+Q/Q	46 (18.4)	35(14.0)	p =0.18
Vs. R/R	204 (81.6)	215 (86.0)	
R (%)	454 (89.3)	463 (92.6%)	p =0.30
Q (%)	46 (10.7%)	37 (7.4%)	



**Figura 2.** Análisis del gen del FVII de la coagulación correspondiente a la región polimórfica R353Q. M representa el marcador de peso molecular 100 pares de bases (pb); la línea 1 muestra los fragmentos del producto amplificado y restringido con la enzima MspI correspondiente al genotipo homocigoto RR (205 pb y 67 pb); en la línea 2 se observan los fragmentos del producto amplificado y restringido correspondientes al genotipo heterocigoto RQ (272 pb, 205 pb y 67 pb), y la línea 3 muestra el fragmento correspondiente al genotipo homocigoto QQ (272 pb).

## DISCUSIÓN

El Síndrome Metabólico (SM) se caracteriza por un conjunto de factores, los cuales predisponen al individuo a desarrollar enfermedad aterosclerótica vascular<sup>1,2</sup>. Previamente hemos demostrado que los factores de riesgo modificables como hipertensión, diabetes, hipertrigliceridemia y obesidad confieren un incremento en el desarrollo de enfermedad isquémica cerebral e infarto agudo del miocardio<sup>98-100</sup>. En el presente estudio se analizaron 250 sujetos con SM de acuerdo a los criterios IDF sin manifestaciones clínicas de enfermedad aterotrombótica y se compararon con el grupo de referencia (n=250). El total de la muestra de sujetos con DM2 más síndrome metabólico tenía elevado la circunferencia abdominal de acuerdo a los parámetros de la población más alguno de los siguientes factores: HDL-c bajo (87.9%), hipertrigliceridemia (70%) e hipertensión (60%). Resultados similares fueron reportados de una sub-muestra representativa nacional seleccionada al azar en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de 2006 (ENSANUT 2006), con una prevalencia de 49.8% (IC del 95%, 47.5 a 52.1) casos con el Síndrome Metabólico usando la definición de IDF, independientemente de la región geográfica y la situación socioeconómica, predominantemente las mujeres (52,7%)<sup>101</sup>. La frecuencia de los factores metabólicos reportados por el estudio ENSANUT 2006 en una submuestra de sujetos con DM2 más el síndrome metabólico fueron: 83% (95% IC, 76.5 a 88) para HDL-c reducido, seguido del 65% (95% % IC, 56.5 a 72.6) para la hipertensión, y 46.7% (IC del 95%, 38.8 a 54.7) para los triglicéridos elevados<sup>101</sup>.

En el presente estudio no encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica ( $p=0.88$ ) o frecuencia alélica ( $p=0.89$ ) del polimorfismo 4G/5G entre pacientes con SM y controles.

En el presente estudio, el grupo de sujetos con Síndrome Metabólico mostró mayores niveles antígeno de PAI-1 ( $61.7 \pm 34$  ng / mL) en comparación con el grupo de referencia ( $51.5 \pm 24$  ng / mL) con una significancia estadística ( $p = 0.026$ ). Los pacientes con Síndrome Metabólico tenían niveles de antígeno PAI-1 por encima del corte considerado normal (Valor de referencia: 2 a 47 ng / ml)

incluso cuando algunos de ellos estaban bajo tratamiento farmacológico y mostraron FPG y niveles de HbA1c bajo rangos considerados adecuados. La frecuencia de factores metabólicos y las concentraciones plasmáticas de PAI-1 varían entre las poblaciones. PAI-1 fue dramáticamente mayor en sujetos caucásicos italianos con obesidad y síndrome metabólico por el Tercer Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol en Adultos Definición del Panel de Tratamiento (NCEP ATP-III) que se comparó con sujetos sanos sin obesidad ( $p < 0.0001$ )<sup>102</sup>. Un informe previo de la población europea basada en la muestra mostro una asociación positiva e independiente entre los niveles de antígeno PAI-1 y la presencia de síndrome metabólico según los criterios del NCEP ATP-III, reportan una media de 126 (81.4-194.2) ng/mL para aquellos sujetos con síndrome metabólico versus 57.3 (35.5-99.7) ng/mL sujetos sin síndrome metabólico ( $p < 0.001$ )<sup>103</sup>. Por el contrario, los datos de la encuesta de población transversal española reportan niveles más altos de PAI-1 en presencia de síndrome metabólico o diabetes mellitus en el análisis bivariado, pero sin significación estadística en el análisis multivariado<sup>104</sup>. En una muestra de sujetos malasio, no hubo diferencia en los niveles de antígeno PAI-1 cuando los sujetos diabéticos con el Síndrome Metabólico se compararon con los individuos con una mediana de 284 (26.5-30.5) ng/mL versus 30.2 (27.1-33.7) ng/mL, respectivamente<sup>105</sup>. La variabilidad de los niveles de antígenos PAI-1 entre poblaciones de sujetos con síndrome metabólico puede estar relacionado con diferencias en los criterios de selección para el síndrome metabólico (1), la prevalencia de componentes del síndrome metabólico en la población (2), el tamaño de la muestra (3), y la falta de análisis para el efecto de la terapia farmacológica en pacientes con dislipidemia, Hipertensión y DM2 (4). Los efectos pleiotrópicos de las estatinas en la reducción de eventos cardiovasculares más allá de la reducción del colesterol en la sangre incluyen una propiedad antitrombótica de la mayoría de las estatinas, excepto la pravastatina, que regula la expresión de PAI-1 a través de la inhibición de las proteínas de la familia Rho<sup>106</sup>. Además, los ensayos clínicos sugieren que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) pueden modificar favorablemente los

marcadores de hemostasia tales como como PAI-1, aunque los datos reportados por diferentes autores todavía no están claros<sup>107</sup>. Hay evidencia que algunas moléculas como la Angiotensina II pueden actuar como una potente molécula fibrogénica independiente de sus efectos sobre la presión sanguínea estimulando la síntesis de la matriz extracelular mediante la inducción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) la expresión y aumento de la transcripción de genes PAI-1<sup>108</sup>. En contraste, hay algunos medicamentos como la pioglitazona, que no sólo mejoran la sensibilidad a la insulina, sino también puede retardar la aterogénesis preclínica en pacientes con DM2, al menos en parte por una reducción en la expresión PAI-1<sup>109</sup>. A pesar de que en nuestra muestra algunos individuos estaban bajo tratamiento con fármacos antihipertensivos, medicación hipoglucémica o estatinas, presentaron niveles anormales de PAI-1 en comparación con el grupo de referencia, lo que puede contribuir a un aumento del riesgo de enfermedad aterotrombótica. Después de la inclusión de todas las variables explicativas correlacionadas con los niveles de antígeno PAI-1 en un sistema lineal multivariable modelo de regresión, encontramos que los factores metabólicos de mayor contribución en la variabilidad de los niveles de antígeno PAI-1 en pacientes con DM2 más síndrome metabólico fueron Hipertensión ( $\beta = 0.18$ ;  $p = 0.03$ ), NL HDL-c ( $\beta = -0.16$ ;  $p = 0.05$ ), y triglicéridos de NL ( $\beta = 0.15$ ;  $p = 0.05$ ). Niveles plasmáticos elevados de prorenina se encuentran comúnmente en pacientes diabéticos; y, además, se ha demostrado que la prorenina a alta concentración se une y activa el receptor prorenina / renina [(p) RR] en células de músculo liso vascular in vitro, dando lugar a una mayor expresión de PAI-1 a través de la angiotensina II-por mecanismos independientes y dependientes, lo que sugiere que los niveles elevados de prorenina en la diabetes pueden contribuir a la progresión de la enfermedad aterotrombótica<sup>110</sup>. La hipertensión podría tener un papel predominante en la formación de la placa de ateroma en lugar de ruptura. En un informe anterior de nuestro grupo, la hipertensión representaba el segundo factor de riesgo en pacientes con infarto agudo de miocardio.<sup>111</sup> Además, el tratamiento de la hipertensión sólo reduce el riesgo de cardiopatía coronaria (CHD) en un 25%; el tratamiento de la hipercolesterolemia en pacientes

hipertensos reduce el riesgo de cardiopatía coronaria más del 35%, sugiriendo una relación y un efecto sinérgico entre la dislipidemia y la hipertensión<sup>112</sup>. En una cohorte de Sueca de 410 pacientes, donde se analizó la asociación entre genotipo PAI-1 y el riesgo de hipertensión arterial. Los resultados obtenidos mostraron una presión arterial mayor en las mujeres portadoras del genotipo 4G/5G comparado con mujeres portadoras del genotipo 5G/5G ( $p=0.025$ ,  $p=0.002$ , y  $p=0.002$  para la presión sistólica, presión diastólica y la presión arterial media respectivamente). Dicha asociación permaneció después de ajustar a posibles variables confusoras relacionadas a hipertensión (IMC, LDL-c, HDL-c, filtrado glomerular, grosor de la íntima-media, diabetes y tabaquismo). Esta asociación no fue observada en hombres. Este resultado es similar al encontrado en nuestra población general<sup>113</sup>. McCormack L.J. reportó en una población de Indios Pima que la actividad de PAI-1 tuvo una correlación positiva al nivel de TG ( $r=0.12$ ,  $p=0.054$ ) un resultado similar al obtenido en nuestra población, así como una correlación en la actividad de PAI-1 con el nivel de insulina ( $r=0.38$ ,  $p<0.0001$ ) e IMC ( $r=0.24$ ,  $p<0.0001$ ) no analizados en nuestro estudio<sup>114</sup>. En una población malaya los sujetos con polimorfismo 4G/4G homocigotos mostraron una asociación con un incremento de los triglicéridos ( $p=0.007$ ), IMC ( $p=0.01$ ) presión arterial diastólica ( $p=0.03$ ). No encontrado en nuestra población. Además, la presión arterial diastólica, TG y el LDL-c fueron mayores en sujetos heterocigotos 4G/5G comparados con el genotipo 5G/5G ( $p=0.008$ ,  $0.047$ ,  $0.03$  respectivamente) estos mismos hallazgos encontrados también en nuestra población<sup>115</sup>. Ambos factores metabólicos, hipertensión y dislipidemia, representan un rasgo importante para el desarrollo de la aterotrombosis y podría contribuir a un mayor riesgo cardiovascular por mecanismos que incluyen un estado hipofibrinolítico. PAI-1 podría ser un nuevo marcador para la evaluación del riesgo cardiovascular para pacientes con hipertensión. Los niveles de antígeno PAI-1 deben ser monitoreados en pacientes hipertensos, y el tratamiento debe ser enfocado para prevenir un estado hipofibrinolítico. En sujetos con DM2 y síndrome metabólico, la distribución del genotipo fue del 11,6%, 48,4% y 40% para los alelos 4G / 4G, 4G / 5G y 5G/5G, respectivamente, con una frecuencia alélica del 35,8% para el alelo

de riesgo 4G, con una diferencia estadística con el grupo de referencia. Esos resultados son consistentes con un informe previo en sujetos sanos del oeste de México (con una frecuencia alélica del 34,1% para el alelo 4G), entre un grupo control de individuos jóvenes ( $\leq 45$  años) en una publicación anterior de nuestro grupo (con una frecuencia alélica de 28,4% para el alelo 4G), y en niños mexicanos con obesidad y sin ella (frecuencia alélica 4G alélica del 32,9% versus 26,4%)<sup>116-117</sup>. Jin-Ren Jeng, encontró en una muestra de 565 individuos chinos, que el genotipo 4G/4G se asoció con una actividad incrementada de PAI-1 con cifras más elevadas de TG. Esta asociación también fue encontrada en nuestra población<sup>118</sup>. En contraste se han reportado variaciones en la prevalencia del alelo 4G. El estudio Aterosclerosis Resistencia a la Insulina (IRAS) mostró una distribución diferente del genotipo de del polimorfismo 4G / 5G del gen PAI-1 entre los estadounidenses (28%), hispanos (38%) y blancos no hispanos (52%) para el alelo de riesgo<sup>119</sup>. En una muestra de tres diferentes grupos étnicos Sudafricanos, la frecuencia del alelo 4G fue menor en individuos africanos (0,13) que en el indio (0,54) o blanco (0,58)<sup>116</sup>. En nuestra muestra, sujetos homocigotos con DM2 más síndrome metabólico con el alelo 4G tenían niveles más altos de antígeno PAI-1 en comparación con Homocigoto 5G sin significancia estadística (56.7) (48.5-73.7) frente a 50.1 (39.1-63.3) ng / ml,  $p = 0.58$ ). En varios estudios epidemiológicos, clínicos y básicos, el alelo 4G ha sido asociado con el aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 y los efectos de los factores relacionados con el Síndrome Metabólico<sup>115, 120,121</sup>. Sin embargo, la contribución del polimorfismo 4G / 5G en PAI-1 la variabilidad parece ser menor. En una muestra de 1328 participantes blancos no relacionados del Estudio Framingham Heart, el polimorfismo 4G / 5G explicó sólo el 2,5% de la varianza residual de los niveles circulantes de PAI-1, con el alelo 4G asociados con una mayor concentración de PAI-1<sup>122</sup>. En una cohorte de 1032 sujetos blancos sin evidencia clínica de aterosclerosis del sur de Italia, la contribución del polimorfismo 4G/5G fue pequeño ( $\approx 1\%$ ) en comparación con el IMC y los triglicéridos (20%) en la variabilidad PAI-1<sup>123</sup>. Una muestra De 510 varones sobrevivientes de infarto de miocardio y 543 controles en el estudio HIFMECH reportó un porcentaje de

varianza explicada por el polimorfismo 4G/5G de 1,12% ( $p = 0,004$ )<sup>125</sup>. En nuestra muestra, el genotipo 4G/4G no correlaciona con los niveles plasmáticos de PAI-1, por lo que no fue incluido en el modelo. Diferencias en el trasfondo genético y la prevalencia de rasgos metabólicos entre las poblaciones son determinantes en la variabilidad de la expresión de PAI-1 y desarrollo de enfermedades cardiovasculares, limitando los resultados un grupo étnico específico. La asociación entre el infarto al miocardio y el polimorfismo R353Q del gen del FVII, el cual influye en las concentraciones del FVII, del FVIIa y del FVIIag estudiado en una población japonesa de 127 pacientes jóvenes con infarto de miocardio antes de los 45 años comparado con 150 controles. La distribución de los genotipos RR, RQ y QQ con respecto al polimorfismo fue 117, 10 y 0 en los pacientes y 131, 17 y 2 en los controles. El alelo Q se asoció negativamente con IM prematuro (OR = 0.41,  $p=0.038$ ). La concentración plasmática de FVIIa fue ligeramente mayor en pacientes ( $55.1\pm 40.9$  U/L) comparada a los controles ( $44.8\pm 20.2$  U/L), pero no significativa ( $p=0.078$ ); la concentración plasmática del FVIIag no difirió entre pacientes ( $88.7\pm 15.7\%$ ) y controles ( $87.0\pm 9.0\%$ ) ( $p=0.557$ ). El alelo Q puede ser protector para el Infarto al miocardio prematuro. Un estudio de casos y controles en 720 pacientes no se encontró diferencias estadísticamente significativa cuando se analizó la relación entre el polimorfismo R353Qy el riesgo cardiovascular (incluidos la enfermedad coronaria, EVC isquémico y la enfermedad arterial periférica). Las concentraciones del FVII ag se comportaron de manera similar, sin diferencias para la interacción entre controles y pacientes con Hipercolesterolemia familiar (RR vs. RQ/QQ;  $p=0.96$ ). En el subgrupo de pacientes con HF no se encontró asociación con la enfermedad cardiovascular, genotipo FVIIag y niveles de FVIIag (RR vs. RQ/QQ;  $p=0.97$ ). en resumen no se encontró una relación directa entre el riesgo cardiovascular en pacientes con HF heterocigoto, polimorfismo R353Q y del factor VII y niveles de FVIIAg.

El presente estudio exhibe un estado hipofibrinolítico en un grupo selectivo de individuos con determinados antecedentes genéticos, con altos niveles de antígeno PAI-1 y FVII de la coagulación. Además, previamente hemos identificado un incremento en la concentración de proteína C reactiva y fibrinógeno en

individuos con DM2 cuando se compara con sujetos con tolerancia normal a la glucosa. Condiciones proinflamatorias, protrombóticas y un estado hipofibrinolítico podrían aumentar el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular <sup>125</sup>.

Los puntos fuertes de nuestra investigación incluyen las similitudes entre nuestra muestra y la muestra poblacional de la ENSANUT 2006, así como la matrícula de los sujetos con similar gravedad del síndrome metabólico. Algunas limitaciones incluyen la falta de análisis del efecto del tratamiento con estatinas, inhibidores de la ECA, bloqueadores de los receptores de la angiotensina, y los fármacos sensibilizadores de insulina en la concentración plasmática de PAI-1. Análisis futuros deben incluir el posible efecto de la medicación sobre la variabilidad de PAI-1 y la relación de los niveles de PAI-1 en pacientes con hipertensión.

## **CONCLUSIONES**

Los sujetos con Síndrome Metabólico tienen niveles plasmáticos elevados de antígeno PAI-1. En nuestra muestra, los factores metabólicos (hipertensión, HDL-c baja e hipertrigliceridemia) tienen una contribución más importante que el polimorfismo 4G/5G en los niveles plasmáticos de PAI-1 de sujetos con Síndrome Metabólico. Sin embargo, Los factores metabólicos sólo explicaron 12% de la variabilidad PAI-1. Sin embargo, pudimos observar una mayor concentración plasmática correspondiente a PAI-1 y factor FVII de la coagulación. Como hemos demostrado en estudios previos por nuestro grupo de investigación el plasma las concentraciones de PAI-1 fueron mayores en pacientes jóvenes con Infarto de miocardio y la hipertensión fue la segundo factor de riesgo cardiovascular más frecuente, seguido de dislipidemia. Hallazgos anteriores y recientes apoyan la idea que la caracterización de biomarcadores emergentes de fibrinólisis como PAI-1 debe medirse para la vigilancia de la transición a un estado saludable a través del desarrollo del síndrome metabólico. Cabe mencionar que la concentración de PAI-1 y Factor VII no estuvo correlacionado con sus respectivos genotipos de riesgo 4G/5G y Factor VII (R353Q). Debido a lo anterior podemos proponer que el paciente con síndrome metabólico cursa con un estado protrombotico e hipofibrinólisis, el cual confiere un incremento del riesgo para el desarrollo de complicaciones tromboticas micro y macrovasculares.

## **PERSPECTIVAS**

El estudio permite cuestionarnos la existencia de niveles de severidad de síndrome metabólico y su relación con alteraciones de los sistema hemostático-fibrinolítico y de la función endotelial, plantearnos la posibilidad de la existencia de una ascenso escalonado de gravedad del síndrome metabólico o evolución de las posibles complicaciones micro y macrovasculares, y su repercusión en morbi-mortalidad de causa principalmente cardiovascular. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los polimorfismos 4G/5G o el R353Q. Sin embargo, el incremento en la concentración plasmática de PAI-1 y FVII de la coagulación en los sujetos con SM se encontró un incremento en la concentración plasmática de PAI-1 y del FVII de la coagulación en los casos en el grupo de casos en comparación de los controles.

En un futuro se pueden plantear como blancos de tratamiento PAI-1 y FVII de manera que se pueda influir en sistema hemostático-fibrinolítico y así influir en los resultados negativos obtenidos en la enfermedad cardiovascular y aterotrombótica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Reaven GM. Syndrome X: 6 years later. *J Intern Med Suppl.* 1994; 736:13-22.
2. Timar O, Sestier F, Levy E. Metabolic Syndrome X: a review. *Can J Cardiol.* 2000, 16: 779-89.
3. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988, 37: 1595-607.
4. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. *Diabet Med.* 1998, 15 : 539-53.
5. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: finding from the third National Health and Nutrition examination Survey. *JAMA.* 2002, 287: 356-59.
6. Resnick HE; Strong heart study investigators. Metabolic Syndrome in Americans Indians. *Diabetes care* 2002, 25: 1246-47.
7. Araneta MR, Wingard DL, Barrett-Connor E. Type 2 diabetes and metabolic syndrome in Filipina- American women: a high risk non-obese population. *Diabetes Care* 2002; 25: 494-99
8. Isomaa B, Almgren P, Toumi T. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes care.* 2001, 24: 683-89.
9. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA. The metabolic syndrome and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002; 288: 2709-16.
10. Marques-Vidal P, Mazoyer E, Bongard V. Prevalence of insulin resistance syndrome in southwestern France and its relationship with inflammatory and hemostatic markers. *Diabetes Care* 2002, 25: 1372-77.
11. Jia WP, Xiang KS, Chen L, Lu JX, Wu YM. Epidemiological study on obesity and its comorbidities in urban Chinese older than 20 years of age in Shanghai China, *Obes Rev.* 2002, 3: 157-65.
12. Wu G. Further study of risk factors for stroke and coronary heart disease, the prevalence of metabolic syndrome in 11 provinces cohort in China. *Diabetes Care.* 2004, 36: 298-300.

13. Onat A, Ceyhan K, Basar O, Erer B, Toprak S, Samsoy V. Metabolic syndrome: major impact on coronary risk in a population with low cholesterol levels—a prospective and cross-sectional evaluation. *Atherosclerosis*. 2003; 165: 285-92.
14. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105: 2696-98.
15. Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 1998, 97: 596-601.
16. Meaney E, Lara-Esqueda A, Ceballos-reyes GM, Asbun J, Vela A, Martinez-Marroquin Y, Lopez V, Meaney A, de la Cabada-Tamez E, Velazquez-Monroy O, Tapia-Conrey R. cardiovascular risk factors in the urban Mexican population: the FRIMEX study. *Public Health*. 2007: 121-378-84.
17. Schargrodsky H, Hernandez-Hernandez R, Champagne BM, Silva H, Vinueza R, Silva Aycaguer LC, Touboul PJ, Boissonnet CP, Escobedo J, Pellegrini F, macchia A, Wilson E: CARMELA Study Investigators. *Am J Med*. 2008: 121:58-65.
18. Dunn EJ, Grsnt PJ. Type 2 diabetes: An Atherothrombotic Syndrome. *Current Molecular medicine*. 2005; 5: 323-32
19. Lindhal TL, Ohlsson PI, Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem J* 1990; 265: 109-113.
20. Owensby DA, Morton PA, Wun TC, Schwartz AL. Binding of plasminogen activator type-1 to extracellular matrix of Hep G2 cells: evidence that the binding protein is vitronectin. *J Biol Chem* 1991; 266: 4334-40.
21. Kruithof EK, Nicolosa G, Bachmann F. Plasminogen activator inhibitor 1: development of a radioimmunoassay and observations on its plasma concentrations during venous occlusion and after platelet aggregation. *Blood* 1987; 70: 1645-53.
22. Leander K, Wiman B, Hallqvist J, Stent-Linder M, de Faire U. Stockholm Heart epidemiology Program. PAI-1 4G/5G polymorphisms in relation to risk of non-fatal myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Thromb Haemost* 2003; 89: 1064-61.

23. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001. 24: 683-89.
24. Paramo J, Colucci M, Collen D, van der Werf F. Plasminogen activator inhibitor in the blood of patients with coronary artery disease. *BMJ*. 1985, 291. 573-4.
25. Aznar J, Estelles A, Tomo G, Sapeña P, Tormo V, Blanck S, España F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br. Heart J*. 1988; 59: 535-42.
26. Juhan-Vague I, Alessi M, Joly P. Plasma plasminogen activator inhibitor in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis*. 1989, 9: 362-67.
27. Juhan-Vague I, Pyke S, Alessi M, Jespersen J, Haverkate F, Thompson S. 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.
28. Hamsten A, Defaire U, Wallidus G. Plasma inhibitor activator in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet*. 1987; II, 3-9.
29. Juhan-vague I, Roul C, Alessi M, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients-relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost*. 1989; 61: 370-3.
30. Mansfield MH, Stickland M, Grant P. PAI-1 concentrations in first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes: metabolic and genetic associations. *Thromb Haemost*. 1997; 77. 357-61.
31. Sakkinen P, Wahl P, Cushman M, Lewis M, Tracy R. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol*. 2000;152: 897-907.
32. Juhan-Vague I, Thompson S, Jespersen J. Involvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome. A study of 1500 patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group. *Arterioscler Thromb*. 1993, 13. 1865-73.

33. Landin K, Tengborn L, Smith U. J Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med.* 1990; 227: 273-78.
34. Asplund-Carlson A, Hamsten A, Wiman B, Carlson LA. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity and VLDL triglyceride concentration, insulin levels and insulin sensitivity: studies in randomly selected normo- and hypertriglyceridaemic men. *Diabetologia.* 1993; 36: 817-25.
35. Meigs J, Mittleman M, Nathan D. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA.* 2002; 283: 221-28.
36. Festa A, D Agostinno R, Mykkanen L. Low-density lipoprotein particle size is inversely related to plasminogen activator inhibitor-1 levels. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 562-68.
37. Vague P, Juhan –Vague I, Aillaud MF, Badier C, Virad R, Alessi MC, Collen D. Correlation between blood fibrinolytic activity, plasminogen activator inhibitor level, plasma insulin level, and relative body weight normal and obese subjects. *Metabolism.* 1986, 35:250-53.
38. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia.* 1991, 34: 457-62.
39. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost.* 2003; 1: 1575-79.
40. Folsom AR, Qamhieh HT, Wing RR, Jeffery RW, Stinson VL, Kuller LH, Wu KK. Impact of weight loss on plasminogen activator inhibitor (PAI-1), factor VII, and other hemostatic factors in moderately over-weight adults. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 162-69.
41. Kruszynska YT, Yu JG, Olefsky JM, Sobel BE. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes and in lean and obese normal subjects. *Diabetes.* 2000; 49: 633-39,

42. Trost S, Pratley R, Sobel B. Impaired fibrinolysis and risk for cardiovascular disease in the metabolic syndrome and type II diabetes. *Curr Diab Rep.* 2006; 6: 47-54.
43. Hitsumoto T, Takahashi m, Lizuka T, Shirai K. relation between metabolic syndrome and early stage coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2007, 14: 294-302.
44. Mertnes I, Verijken A, Michiels JJ. Van der Planken M, Ruige JB, van Gaal LF. Among inflammation síndrome. *Int J Obes.* 2006; 32: 154-60.
45. Sobel EB, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with non-diabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation.* 1998: 97: 2213-21.
46. Pandolfi A, Cetrullo D, Polishuck R, Alberta MM, Calafiore A, Pellegrini G, Vitacolonna E, Capani F, Consoli A. Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1378-82.
47. Rega G, Kaun C, Weiss TW, Demyanets S, Zorn G, Kastl SP, Steiner S, Seidinger D, Kopp CW, Frey M, Roehle r, Maurer G, Huber K, Wojta J. Inflammatory cytokines interlukin-6 and oncostatin m induce plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue. *Circulation.* 2005; 111: 1938-45.
48. Kruithof EK, Mestries JC, Gascon MP, Ythier A. The coagulation and Fibrinolytic responses of baboons after in vivo thrombin generation effect of interleukin 6. *Thromb Haemost.* 1997; 77: 905-910.
49. Juhan-Vague I, Alessi MC, Joly P, Thirion X, Vague P, Declerck PJ, Serradimigni A, Collen D. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis.* 1989; 9: 362-67.
50. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol.* 2002, 152: 897-907.

51. Lundgren CH, Brown SI, Nordt TK, Sobel BE, Fujii S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation*. 1996; 93: 106-110.
52. Ibara H, urano T, Takada A, Loskutoff DJ. Induction of plasminogen activator inhibitor 1 gene expression in adipocytes by thiazolidinediones. *FASEB J*. 2001; 15: 1233-35.
53. Voros G, Maquoi E, Collen D, Lijnen HR. Differential expression of plasminogen activator inhibitor-1 tumor necrosis factor-alpha, TNF-alpha converting enzyme and ADAMTS family members in murine fat territories. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1625: 36-42.
54. Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *J Clin Invest*. 1996; 97: 37-46.
55. Mansfield M, Strickland M, Grant P. PAI-1 polymorphism is associated with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1995; 842-48.
56. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very low density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 20-26.
57. Nilsson L, Gafvels M, Musakka L. VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor. *J Lipid Res* 1999; 40: 913-919.
58. Funk M, Endler G, Exner M, Marculescu R, Endler L, Abrahamiam H, Mauler H, Grimm A, Raith M, Mannhalter C, Prager R, Irsigler K, Wagner OF. PAI-1 4G/5G insertion/deletion promoter polymorphism and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Wien Klin Wochenschr*. 2005. 117: 707-10.
59. Sartori MT, Vettor R, De Pergola R, De Mitrio V, Saggiorato G, Della Mea P, Patrassi GM, Loscardi AM, Fabris R, Girolami A. Role of the 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promoter on PAI-1 levels in obese patients:

- influence of fat distribution and insulin-resistance. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 1161-9.
60. Ziets B, Buechler C, Drobnik W, Herfarth H, Scholmerich J, Schaffler A. Allelic frequency of the PAI-1 4G/5G promoter polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and lack of association with PAI-1 plasma levels. *Endocr Res* 2004, 30: 443-53.
61. Martinez-Calatrava MJ, Martinez.Larrad MT, Zabena C, Gonzalez- Sanchez JL, Fernandez-Perez C, Serrano-Rios M. The 4G/5G PAI-1 genotype is associated with elevated plasma PAI-1 levels regardless of variables of the metabolic syndrome and smoking status. A population-base study in Spanish population- *Diabetes Obes Metab* 2007, 9: 134.5.
62. Meigs JB, Dupuis J, Liu O, Donnell CJ, Fox CJ, Kathiresan S, Gabriel SB, Larson MG, Yang Q, Herbert AG, Wilson PW, Feng D, Tofler GH, Cupples LA. *Obesity.* 2006; 14: 753-758.
63. Ozel Demiralp D, Aktas H, Akar N. The effect of plasminogen activator inhibitor-1 675 4G/5G polymorphism on PAI-1 gene expression and adipocyte differentiation. *Clin Appl Thromb Haemost.* 2007; 14: 17-21.
64. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997; 20 (suppl II): 3-10.
65. Kinlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 2001, 12: 383-89.
66. Hsueh WA, Quiñónez MJ, Creager MA. Endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Rev.* 1997; 5: 343-52.
67. Hsueh WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med.* 1998; 105: 4S-14S.
68. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.* 1998, 105. 9S-32S.
69. Caballero AE. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subject at risk for type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999; 48: 1856-62.
70. Davies MJ. The contribution of thrombosis to the clinical expression of coronary atherosclerosis. *Thromb Res.* 1996; 82: 1-32.

71. Sherman CT, Litvack F, Grundfest W, Lee M, Hickey A, Chauv A, Kass R, Blanche C, Matloff J, Morgenstern L. Coronary angiography in patients with unstable angina pectoris. *N Engl J Med*. 1986; 315: 913-919.
72. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*. 1986; 2: 532-537.
73. Wion KL, Kelly D, Summerfield JA, Tuddenham EG, Lawn RM. Distribution of factor VIII mRNA and antigen in human liver and other tissues. *Nature*. 1985; 317:726-9
74. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. *Lancet*. 1986; 2: 533-7.
75. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 54-9.
76. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 1997; 96: 1102-8.
77. Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, Evans A, Luc G, Ferrieres J, Arveiler D, Juhan-vague I. Association of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10,500 male participants in a prospective study of myocardial infarction—the PRIME Study. *Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. Thromb Haemost*. 1998; 880: 749-56.
78. Meade TW, Ruddock V, Stirling YM, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Study. *Lancet*. 1993; 342: 1076-9.
79. Folsom AR, Wu KK, Davis CE, Conlan MG, Sorlie PD, Szklo M. Population correlates of plasma fibrinogen and factor VII, putative cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 1991; 91: 191-205.

80. Balleisen L, Bailey J, Epping PH, Schutle H, van de Loo J. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using and menopause. *Thromb Haemost.* 1985; 54: 475-9.
81. Balleisen L, Assmann G, Bailey J, Epping PH, Schutle H, van de Loo J. Epidemiological study of factor VII, factor VIII and fibrinogen in a industrial population II. Balleisen data on the relation to blood pressure, blood glucose, uric acid, and lipid fractions. *Thromb Haemost.* 1985; 54: 721-3.
82. Mansfield MW, Heywood DM, Grant PJ. Circulating levels of factor VII, fibrinogen and von Willebrand factor and features of insulin resistance in first-degree relatives of patients with NIDDM. *Circulation.* 1996; 94: 217-6.
83. Miller GJ, Walter SJ, Stirling Y, Thompson SG, Esnouf MP, Meade TW. Assay of factor VII by two techniques: evidence for increased conversion of VII to alpha VIIa in hyperlipidaemia, with possible implications for ischaemic heart disease. *Br J Haematol.* 195; 59: 249-58.
84. Mitropoulos KA, Miller GJ, reeves BE, Wilkes HC, Cruickshank JK. Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle-aged men. *Atherosclerosis.* 1989; 76: 203-8.
85. Bruckert E, Carvalho de Sousa J, Giral P, Soria C, Chapman MJ, Caen J, de Gennes JL. Interrelationship of plasma triglyceride and coagulant factor VII levels in normotriglyceridemic hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1989; 75: 129-34.
86. Eichinger S, Mannucci PM, Tradati F, Arbini AA, Rosenberg RD, Bauer KA. Determinants of plasma factor VIIa in humans. *Blood.* 1995; 86: 3021-5.
87. Carvahlo de Sousa J, Bruckert E, Giral P, Soria C, Chapman J, Truffert J, dairou F, De Gennes JL, Caen JP. Coagulation factor VII and plasma triglycerides. Decreased catabolism as a possible mechanism of factor VII hyperactivity. *Haemostasis.* 1989; 19: 125-30.
88. Carvalho AC, Lees RS, Vaillancourt RA, Cabral RB, Colman RW. Activation of the kallikrein system in hyperbetalipoproteinemia. *J Lab Clin Med.* 1978; 91:117-22.

89. Miller GJ, Martin JC, Mitropoulos KA, Esnouf MP, Cooper JA, Morrissey JH, Howarth DJ, Tuddenham EG. Activation of factor VII during alimentary lipemia occurs in healthy adults and patients with congenital factor XII or factor XI deficiency, but not in patients with factor IX deficiency. *Blood*. 1996; 87: 4187-96.
90. Zitoun D, Bara L, Basedevant A, samana MM. Levels of factor VIIc associated with decreased tissue factor pathway inhibitor and increased plasminogen activator inhibitor-1 in dyslipidemias. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 77-81.
91. De Sousa JC, Soria C, Ayrault-jarrier M, Pastier D, Bruckert E, Amiral J, Bereziat G, Caen JP. Association between coagulation factors VII and X triglyceride rich lipoproteins. *J Clin Pathol*. 1988; 41: 940-4.
92. Seligsohn U, Osterud B, Brown SF, Griffin JH, Rapaport SI. Activation of human factor VII in plasma and in purified systems: roles of activated factor IX, kallikrein, and activated factor XII. *J Clin Invest*. 1997; 64: 1056-65.
93. Green FR, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade TW, Humphries SE, A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11: 540-546.
94. Meilahn E, Ferrell R, Kiss J, Temple A, Green FR, Humphries SE. Kuller I. Genetic determination of coagulation factor VIIc levels among healthy middle-age women. *Thromb Haemost* 1995; 73: 623-625.
95. Kario K, Narita N, Matsuo T, Kayaba K, Tsutsumi A, Matsuo M, Miyata T, Shimada K. Genetic determinants of plasma factor VII activity in the Japanese. *Thromb Haemost*. 1995; 73: 617-22.
96. Saha N, Liu Y, Heng CK, Hong S, Low PS, Tay JS. Association of factor VII genotype with plasma factor VII activity and antigen levels in healthy Indian adults and interaction with triglycerides. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 1923-7.
97. Humphries SE, Lane A, Green FR, Cooper J, Miller GJ. Factor VII coagulant activity and antigen levels in healthy men are determined by interaction between factor VII genotype and plasma triglyceride concentration. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 193-8.
98. Esparza-García JC, Santiago-Germán D, Guadalupe Valades-Mejía M, Hernández-Juárez J, Aguilar-Sosa E, Leños-Miranda A, Alvarado-Moreno A,

Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. GLU298ASP and 4G/5G Polymorphisms and the Risk of Ischemic Stroke in Young Individuals. *Can J Neurol Sci.* 2015;42:310-6. doi: 10.1017/cjn.2015.45.

99. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G. The Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature ST elevation myocardial infarction in Mexican population. *Clin Chim Acta.* 2010;411:553-557.

100. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez Gabriela. Asociación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) con el infarto agudo del miocardio con elevación del ST en pacientes jóvenes. *Rev Esp cardiol* 2009;62:365-372.

101. Araneta MR, Wingard DL, Barrett-Connor E. Type 2 diabetes and metabolic syndrome in Filipina- American women: a high risk non-obese population. *Diabetes Care* 2002; 25: 494-99.

102. Dunn EJ, Grsnt PJ. Type 2 diabetes: An Atherothrombotic Syndrome. *Current Molecular medicine.* 2005; 5: 323-32.

103. Lindhal TL, Ohlsson PI, Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem J* 1990; 265: 109-113.

104. Owensby DA, Morton PA, Wun TC, Schwartz AL. Binding of plasminogen activator type-1 to extracellular matrix of Hep G2 cells: evidence that the binding protein is vitronectin. *J Biol Chem* 1991; 266: 4334-40.

105. Kruithof EK, Nicolosa G, Bachmann F. Plasminogen activator inhibitor 1: development of a radioimmunoassay and observations on its plasma concentrations during venous occlusion and after platelet aggregation. *Blood* 1987; 70: 1645-53.

106. Leander K, Wiman B, Hallqvist J, Stent-Linder M, de Faire U. Stockholm Heart epidemiology Program. PAI-1 4G/5G polymorphisms in relation to risk of non-fatal myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program (SHEEP). *Thromb Haemost* 2003; 89: 1064-61.

107. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001. 24: 683-89.
108. Paramo J, Colucci M, Collen D, van der Werf F. Plasminogen activator inhibitor in the blood of patients with coronary artery disease. *BMJ*. 1985, 291:573-4.
109. Aznar J, Estelles A, Tomo G, Sapena P, Tormo V, Blanck S, España F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br. Heart J*. 1988; 59: 535-42.
110. Juhan-Vague I, Alessi M, Joly P. Plasma plasminogen activator inhibitor in angina pectoris. Influence of plasma insulin and acute-phase response. *Arteriosclerosis*. 1989, 9: 362-67.
111. Wu G. Further study of risk factors for stroke and coronary heart disease, the prevalence of metabolic syndrome in 11 provinces cohort in China. *Diabetes Care*. 2004, 36: 298-300.
112. Juhan-Vague I, Pyke S, Alessi M, Jespersen J, Haverkate F, Thompson S. 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.
113. Hanna M, Björck. Gender-Specific Association of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Polymorphism With Central Arterial Blood Pressure. *American Journal Of Hypertension* 2011, 24: 7; 802-808.
114. McCormack L.J. Promoter (4G/5G) plasminogen activator inhibitor-1 genotype in Pima Indians: relationship to plasminogen activator inhibitor-1 levels and features of the insulin resistance syndrome. *Diabetologia*. 1996;39: 1512–1518.
115. Ogawa M. R353Q Polymorphism, Activated Factor VII, and Risk of Premature Myocardial Infarction in Japanese Men. *Circ J* 2004; 68: 520–525.
116. Hamsten A, Defaire U, Wallidus G. Plasma inhibitor activator in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet*. 1987; II, 3-9.

117. Juhan-vague I, Roul C, Alessi M, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients-relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost.*1989; 61: 370-3.
118. Jing-Ren Jeng. Association of PAI-1 Gene Promoter 4G/5G Polymorphism With Plasma PAI-1 Activity in Chinese Patients With and Without Hypertension. *Am J Hypertens* 2003;16:290–296.
119. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 2696-98.
120. Mansfield MH, Stickland M, Grant P. PAI-1 concentrations in first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes: metabolic and genetic associations. *Thromb Haemost.*1997; 77. 357-61.
- 121.Sakkinen P, Wahl P, Cushman M, Lewis M, Tracy R. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol.* 2000;152: 897-907.
- 122.Juhan-Vague I, Thompson S, Jespersen J. nvolvement of the hemostatic system in the insulin resistance syndrome. A study of 1500 patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group. *Arterioscler Thromb.*1993, 13. 1865-73.
- 123.Landin K, Tengborn L, Smith U. J Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. *J Intern Med.* 1990; 227. 273-78.
- 124.Asplund-Carlson A, Hamsten A, Wiman B, Carlson LA. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity and VLDL triglyceride concentration, insulin levels and insulin sensitivity: studies in randomly selected normo- and hypertriglyceridaemic men. *Diabetologia.* 1993; 36: 817-25.
- 125.Meigs J, Mittleman M, Nathan D. Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA.* 2002; 283: 221-28.
- Hamsten A, Defaire U, Wallidus G. Plasma inhibitor activator in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction.*Lancet.* 1987; II, 3-9.

## **ANEXO 1.**

**Extracción de la muestra sanguínea:** Se extraerá de la vena antecubital 5 ml de sangre total (teniendo cuidado de que el torniquete no sea aplicado con mucha tensión), la cual será colectada en un tubo conteniendo EDTA, el cual será centrifugado a 2500 g por 10 minutos. Posteriormente la capa superior (plasma) será retirada cuidadosamente tratando de no perturbar la siguiente capa en donde se encuentra localizado el contenido de células mononucleares (buffy coat), la cual será transferida con una pipeta de transferencia de plástico estéril a un tubo de plástico Eppendorf estéril de 1.5 ml libre enzimas (RNasas y DNasas). Finalmente el concentrado eritrocitario, el cual se encuentra en la capa inferior se desechará en un contenedor destinado para material (residuos peligrosos).

**Extracción de ADN:** Se utilizará el equipo comercialmente disponible de la marca Qiagen (QIAamp DNAMini Kit) de acuerdo a las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el ADN se procederá a su conservación en un refrigerador a -70 °C, hasta que sea utilizado para la amplificación de los segmentos correspondiente.

### **Determinación del genotipo del PAI-1:**

**Identificación de fragmentos polimórficos:** Una vez amplificado el producto se procederá a su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2%, y será posteriormente teñido con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml y se visualizará usando un transiluminador de luz ultravioleta cuya imagen será grabada en un film y cada paciente será clasificado en uno de los tres grupos: 4G/4G. 4G/5G o 5G/5G.

**Determinación de la concentración plasmática antigénicos de PAI-1:** Su fundamento se basa en la reacción inmunoenzimática llevada a cabo por un anticuerpo monoclonal dirigido al PAI-1, el cual ha sido previamente fijado sobre la superficie de la pared del microplato, el cual se unirá al PAI-1 contenido en la

muestra. Posteriormente se adicionara un cromogénico el cual desarrollara color que será proporcional a la concentración antigénica de PAI-1 contenido en la muestra.

**Genotipificación del factor VII de la coagulación.** Posterior a la extracción de ADN, se llevará la amplificación mediante la técnica de PCR. Serán utilizados los siguientes oligonucleótidos: sentido (5'-GGGAGACTCCCCAAATATCAC-3') y el contrasentido (5'-ACG CAG CCT TGGCTTTCTCTC-3') bajo el siguiente protocolo térmico: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min., seguida de 35 ciclos de los siguientes segmentos, desnaturalización a 94°C por 1 min., alineación a 56°C por 1 min., y un ciclo final a 72 °C por 5 min. La reacción con un volumen final de 50 µl contendrá 200ng de ADN, 50 pmol de cada oligonucleótido, 200 µmol/L de cada dNTP, 1.5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> 1 U de Taq DNA polimerasa y 1X de su correspondiente buffer de PCR.

**Identificación de fragmentos polimórficos:** El amplificado será sometido a la acción de la enzima *MspI*. Los genotipos serán identificados mediante electroforesis de los productos de la acción enzimática mediante la tinción de un gel con bromuro de etidio. Los sujetos positivos para el alelo R el patrón de bandas será visualizado de la siguiente manera (206pb, 67pb, 39pb), mientras que los positivos para el alelo Q (273pb, 39pb).

**Determinación de la concentración plasmática del FVII de la coagulación:** Su fundamento se basa en la reacción inmunoenzimática llevada a cabo por un anticuerpo monoclonal dirigido al FVII de la coagulación, el cual ha sido previamente fijado sobre la superficie de la pared inferior del microplato, el cual se unirá al FVII contenido en la muestra. Posteriormente se adicionara un cromogénico el cual desarrollara color que será proporcional a la concentración antigénica de FVII contenido en la muestra.

# Carta de Consentimiento Informado

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLINICA

**Lugar y Fecha** México DF; a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008

**Por medio de la presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:**

“Valoración de los sistema hemostático-fibrinolítico y de la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico”,

**Registrado ante el Comité Local de Investigación o la CNIC con el número:**

**El objetivo del estudio es:**

“Valoración de los sistema hemostático-fibrinolítico y de la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico”,

**Se me ha explicado que mi participación consistirá en:**

Responder preguntas sobre la evolución de mi enfermedad y sobre mi persona. Serán obtenidas muestras de sangre. Cierta parte mi sangre será utilizada para realizar estudios en mis genes. Mi participación en el estudio no tendrá costo alguno.

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:**

Riesgos de la participación en el estudio: La toma de sangre puede causar molestias temporales o moretones en el sitio de punción y en algunas ocasiones puede haber desmayo.

Beneficios de la participación en el estudio: Los beneficios de la participación en el estudio son evaluar la posible asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1, su correlación plasmática con dicha proteína y el Síndrome Metabólico.

El Investigador Responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.

El Investigador Responsable me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

\_\_\_\_\_  
**Nombre y firma del paciente**

\_\_\_\_\_  
**Investigador Responsable:** Dra. en C. Irma Isordia Salas Matrícula 7553706

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio:  
56395822 Ext: 20883

**Testigos**

\_\_\_\_\_

### ANEXO 3.

HOSPITAL GENERAL REGIONAL No.1  
DR. CARLOS MAC GREGOR SANCHEZ NAVARRO.  
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS.

**PROTOCOLO: “Valoración de los sistema hemostático-fibrinolítico y de la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico”,**

Nombre: \_\_\_\_\_.  
No.Afiliación: \_\_\_\_\_.  
Edad: \_\_\_\_\_ . Sexo: \_\_\_\_\_ . Tel: \_\_\_\_\_ .  
Peso: \_\_\_\_\_ . Talla: \_\_\_\_\_ . IMC: \_\_\_\_\_ . Sedentarismo: \_\_\_\_\_ .  
Tabaquismo: \_\_\_\_\_ . AFD: \_\_\_\_\_ . AFEC: \_\_\_\_\_ .  
DM: \_\_\_\_\_ . HAS: \_\_\_\_\_ . HDL \_\_\_\_\_ . VLDL \_\_\_\_\_ .  
Tensión Arterial Sistólica: \_\_\_\_\_ . Tensión Arterial Diastólica: \_\_\_\_\_ .  
Micro albuminuria: \_\_\_\_\_ . Ácido úrico: \_\_\_\_\_ . LDL: \_\_\_\_\_ .  
Glucosa: \_\_\_\_\_ . Colesterol: \_\_\_\_\_ .  
Triglicéridos: \_\_\_\_\_ . Fibrinógeno: \_\_\_\_\_ .  
Hemoglobina: \_\_\_\_\_ . Hematocrito: \_\_\_\_\_ .  
Leucocitos: \_\_\_\_\_ . Plaquetas: \_\_\_\_\_ .  
Presión diastólica: \_\_\_\_\_ . Presión sistólica: \_\_\_\_\_ .  
Medicamentos antihipertensivos: \_\_\_\_\_ .  
Medicamentos hipoglucemiantes: \_\_\_\_\_ .  
Otro tipo de medicamentos: \_\_\_\_\_ .

AFD: Antecedentes Familiares de Diabetes.

AFECV: Antecedentes Familiares de enfermedad cardiovascular.

DM: Diabetes Mellitus.

HAS: Hipertensión Arterial Sistémica.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

**Polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1.**

	Presente	Ausente
4G/4G		
4G/5G		
5G/5G		

Concentración plasmática de PAI-1: \_\_\_\_\_ng/ml.

**Polimorfismo R353Q  
en el FVII de la coagulación.**

Gln/Gln  
Gln/Asn  
Asn/Asn

Concentración plasmática de FVII: \_\_\_\_\_ng/ml.