



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HGR No. 1 "Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro"

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ALA147THR Y THR325ILE EN EL GEN DEL
INHIBIDOR DE LA FIBRINÓLISIS ACTIVADO POR TROMBINA (TAFI) EN PACIENTES
JÓVENES MEXICANOS CON ENFERMEDAD VASCULAR: COMPARACION DE DOS
TERRITORIOS ARTERIALES (CEREBRAL Y CORONARIO)

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

Manuel Martínez Marino

TUTOR PRINCIPAL

DRA. Irma Isordia Salas

Instituto Mexicano del Seguro Social, HGR No. 1 "Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro",
Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

COMITÉ TUTOR

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz

Instituto Mexicano del Seguro Social, HGR No 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro,
Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Instituto de Seguridad y de Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. Centro
Médico Nacional 20 de Noviembre, División de Medicina Genómica y Genética Clínica.

Ciudad universitaria, Ciudad de México, Enero 2019



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.

Tutor principal

Dra. Irma Isordia Salas.

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis. HGR No. 1 "Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro". IMSS. Tel oficina: 56395822 ext. 1910. Correo electrónico: maissa1405@gmail.com

Responsable de la sede:

Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez

Coordinación de Investigación en Salud. Centro Médico Nacional Siglo XXI

Sitio donde se llevó cabo la investigación:

Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis. HGR No. 1 "Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro". IMSS

Domicilio y telefonos:

Calle Gabriel Mancera 222, Col. Del Valle Nte, CP. 03103, Ciudad de México.
Telefono: 55 5639 5822

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Megan, por su complicidad, tiempo y comprensión en cada uno de los proyectos que emprendemos juntos.

A la Dra. Irma Isordia Salas y al personal de la UIMTHA del HGR 1 del IMSS por su apoyo incondicional, su dedicación, los consejos y motivación para completar y mejorar este trabajo de investigación.

A mi familia y amigos a quienes han sido parte del apoyo y trabajo para continuar en el camino de mi formación académica.

ABREVIATURAS

EVC	Enfermedad Vascular Cerebral
IM / IAM	Infarto de miocardio
IMEST/IAMCEST	Infarto de miocardio con elevación del segmento ST
IC	Infarto cerebral
TAFI/CPB2	Inhibidor de la Fibrinólisis Activado por Trombina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en ingles)
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
SNP	Polimorfismo de nucleotido único (Single Nucleotide Polymorphism, por sus siglas en inglés)
UIMTHA	Unidad de investigación médica en trombosis hemostasia y aterogenesis
HGR	Hospital General Regional
SICASEST	Síndrome isquémico coronario agudo sin elevación del ST
SICACEST	Síndrome isquémico coronario agudo con elevación del ST
EAT	Enfermedad aterotrombótica
IMC	Índice de masa corporal

ÍNDICE

Contenido	Página
1. Resumen	1
2. Marco teórico y antecedentes	2
3. Justificación	30
4. Planteamiento del problema	31
5. Pregunta de investigación	32
6. Hipotesis	32
7. Objetivos	33
8. Material y metodos	34
9. Consideraciones éticas	45
10. Análisis estadístico	47
11. Resultados	48
12. Discusión	54
13. Conclusión	58
14. Referencias bibliograficas	60
Anexo A. Extracción y procesamiento de muestras	75
Anexo B. Criterios de donadores de banco de sangre	78
Anexo C. Lineamiento de los aspectos éticos	80
Anexo D. Hoja de recolección de datos	81
Anexo E. Carta de consentimiento informado	82
Anexo F. Dictamen de aceptación	84

1. RESUMEN

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ALA147THR Y THR325ILE EN EL GEN DEL INHIBIDOR DE LA FIBRINÓLISIS ACTIVADO POR TROMBINA (TAFI) EN PACIENTES JÓVENES MEXICANOS CON ENFERMEDAD VASCULAR: COMPARACIÓN DE DOS TERRITORIOS ARTERIALES (CEREBRAL Y CORONARIO)

Introducción: El infarto de miocardio (IM) y el infarto cerebral (IC) comparten características fisiopatológicas y similares factores de riesgo. Alrededor de un 20% de pacientes con estas patologías son jóvenes, a quienes en muchas circunstancias no se les detecta una causa etiológica aparente que justifique el evento. No obstante, se han descrito diversos genotipos asociados al IC e IM con limitada información con respecto a nuestra población. Nuestra propuesta es identificar posibles marcadores genéticos que estén asociados a dichas enfermedades.

Objetivo: Determinar la frecuencia de los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile en el gen del inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI) en sujetos mexicanos menores de 45 años con IC, IM y sus respectivos controles.

Material y métodos: Estudio de casos y controles pareado, retroprospectivo, de grupos independientes, de pacientes evaluados en la UIMTHA del H.G.R. No1 Dr. Mc Gregor Sánchez Navarro del IMSS con IM o IC y sujetos sanos donadores del banco de sangre de la misma unidad que aceptaron participar o que han participado en estudios de la misma unidad con diferente objetivo pero autorizando el uso de sus datos y muestras sanguíneas para estudios ulteriores.

Resultados: Se estudiaron 244 pacientes con IM con elevación del ST (IMEST). En un segundo estudio se reclutaron 250 pacientes con IC. Cada grupo con sus respectivos controles pareados por edad y sexo. Los polimorfismos se determinaron por medio de reacción en cadena de la polimerasa con restricción de fragmentos polimórficos. Se determinó una asociación significativa en la distribución del genotipo Thr325Ile ($p=0.001$) y la frecuencia alélica ($p=0.001$) entre los pacientes con IMEST y su grupo control, pero no en la distribución genotípica de Ala147Thr ($p=0.24$) ni en la frecuencia alélica ($p=0.46$) ni tampoco en la distribución genotípica de Thr325Ile ($p=0.25$) y Ala147Thr ($p=0.21$) o la frecuencia alélica entre el IC. Existieron factores independientes para IMEST: El alelo Ile (OR 1.51, IC 95% 1.10 – 2.09, $P=0.01$) Diabetes mellitus tipo 2 (OR 2.26, 95% IC 1.43 - 3.58, $P=0.001$) hipertensión (OR 3.12, 95% IC, 2.01 – 4.86, $P=0.001$), tabaquismo (OR 6.78, IC 95%, 4.47- 10.30, $P=0.001$), dislipidemia (OR 2.12, IC 95% 1.45 – 3.10, $P=0.001$), historia familiar de enfermedad aterotrombótica (OR 3.14, IC 95% 1.98 – 5.01, $P=0.001$). Los factores independientes identificados para IC fueron: hipertensión (OR 2.6, IC 95% 1.45 – 4.66 $P=0.0013$) tabaquismo (OR 2.06, IC 95% 1.34 – 3.15, $P=0.0009$) e historia familiar de enfermedad aterotrombótica (OR 2.15, IC 95% 1.36 – 3.4, $P=0.0009$).

Conclusión. La participación del TAFI y sus polimorfismos tiene una variabilidad con respecto a su función en los diferentes subtipos de trombosis arteriales, sin embargo dada su relación con la aterosclerosis e inflamación el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI parece tener mayor impacto en el IM que en el IC en mestizos mexicanos ≤ 45 años, estos hallazgos sustentan la necesidad de caracterizar a una población con enfermedades clínicamente idénticas pero con ciertas particularidades genéticas que involucran mecanismos fisiopatológicos diferentes.

Palabras clave: Infarto cerebral, Infarto de miocardio, trombosis arterial, polimorfismos, CPB2, TAFI, Ala147Thr, Thr325Ile

2. MARCO TEORICO

Introducción

Los eventos vasculares agudos de tipo arterial, principalmente cardio y cerebro vasculares son considerados una causa importante de muerte y discapacidad prematura en los países desarrollados e incrementan con mayor frecuencia en los países en vías de desarrollo (1-3). De la misma forma, su alta frecuencia reportada y la tendencia de atribuir estas patologías (junto con los eventos vasculares periféricos) a un proceso de aterosclerosis adquiere gran importancia debido a que comparten muchos de los factores de riesgo, predominantemente modificables (hipertensión, diabetes mellitus, obesidad, entre otros) (4). Para algunos países latinoamericanos, incluido México, los padecimientos crónicos vasculares tendrán un peso difícil de sostener en el futuro debido al incremento de la frecuencia de los múltiples factores de riesgo (5).

Por otro lado el advenimiento futuro de estos padecimientos vasculares tendrá un impacto negativo debido a que el número de los territorios arteriales enfermos (cardiovascular, cerebrovascular y vascular periférico) tiene un factor predictivo para desenlaces desfavorables, sobretodo cuando existen dos o mas territorios comprometidos (5).

GENERALIDADES Y ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

- Enfermedad vascular cerebral

La definición tradicional de Enfermedad vascular cerebral (EVC) es clínica y basada en un episodio súbito de disfunción focal del cerebro, retina o medula espinal, con una duración mayor a las 24 horas o de cualquier duración si en la imagen (tomografía o resonancia magnética) o en la autopsia se observa infarto o hemorragia focal relevante asociada a los síntomas (6).

La EVC es considerada la segunda causa de muerte a nivel mundial y la primera causa de discapacidad neurológica en los adultos (4). En EUA cada año aproximadamente 750,000 personas experimentan una EVC de *novo* o

recurrente, lo que denota que en promedio cada 40 segundos una persona sufre una EVC. Actualmente en este país cerca de 6.6 millones de personas (mayores de 20 años) han tenido un EVC, con una proyección para el año 2030 a incrementar un 20.5%. La presentación de la EVC (arterial) se distribuye de la siguiente manera: 83% Infarto cerebral (IC), 10% hemorragia intracerebral y 3% hemorragia subaracnoidea (7).

En México la prevalencia reportada por Cantu-Brito y cols (8) en el estudio BASID (por sus siglas en inglés *Brain Attack Surveillance in Durango*) fue de 7.7 por 1000 habitantes (IC 95% 4.3 por 1000 - 11.2 por 1000) con una incidencia acumulada de 232 por 100 000 (IC 95% 27.8 – 436.9)

En el estudio RENAMEVASC (Registro Nacional Mexicano de Enfermedad Vascul ar Cerebral) (9) de los 2000 eventos cerebrovasculares registrados, el 59.1% fue por IC, 28.3% por hemorragia intracerebral, 12% por hemorragia subaracnoidea y 3% por trombosis venosa cerebral. El 36.8% de la población con EVC fue menor de 45 años y de estos la gran mayoría se debió a IC.

La EVC puede manifestarse por diferentes síndromes clínicos, dependiendo del territorio cerebral afectado, que incluyen: el síndrome total de circulación anterior, síndrome parcial de circulación anterior, síndrome lacunar y síndrome de circulación posterior, apartados incluidos en la clasificación de Oxford, OCSP (Por sus siglas en inglés Oxfordshire C Stroke Project) (10).

En lo que respecta al IC, tipo de EVC que con mayor frecuencia se presenta y que es de nuestro interés en este estudio, etiológicamente podemos clasificarlos en subtipos dependiendo del mecanismo (6). Uno de los sistemas de clasificación con mayor frecuencia utilizados es el TOAST (11) (Por sus siglas en inglés, *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) la cual distribuye los mecanismos en los siguientes subtipos: Enfermedad (Por aterosclerosis) de grandes vasos, Enfermedad de pequeño vaso, cardioembólico, otras causas identificables (habitualmente causas infrecuentes y raras) y causa indeterminada. Existen otros sistemas alternos de clasificación, principalmente el ASCOD (12) (A: Aterosclerosis, S: Enfermedad de pequeño vaso, C:

Cardiopatía, O: Otras causas, D: Disección arterial), sistema que algunos autores también consideran útil (13).

Se atribuye en general que las causas de IC basados en el sistema de clasificación TOAST son por aterosclerosis de grandes vasos, cardioembolismo y enfermedad de pequeño vaso, cada una aportando la etiología de un 25% de los casos aproximadamente, y el restante se considera de causa no determinada o criptogénico (13), sin embargo se ha detectado que hasta una cuarta parte de pacientes de esta última categoría en estudios con monitoreo cardiaco prolongado (de hasta 4 semanas) tienen una causa cardioembolica debido a fibrilación auricular (15), así como también poco más de un 10% de los pacientes con IC criptogénico y sospecha de causa cardioembolica tienen hallazgos (por angiotomografía de vasos de cuello) de placas de aterosclerosis (>5mm de grosor) no estenoticas en la arteria carótida ipsilateral al territorio del IC en comparación con el lado contralateral (sin IC), sugiriendo ser una posible causa poco reconocida de IC en estos pacientes (16).

En México, en el estudio PREMIER (17) un registro multicéntrico donde evaluaron a cerca de mil pacientes con IC e isquemia cerebral transitoria se determinó que de acuerdo a la clasificación OCSP, el 18% fueron parte de síndrome total de la circulación anterior, 38% parcial anterior, 26% lacunares y 17% síndromes de la circulación posterior, y dentro del mecanismo incluido en el sistema TOAST se reportó que 8% fueron por aterosclerosis de grandes vasos, 18% cardioembolicos, 20% lacunares, 6% misceláneos y 42% no determinados o criptogénicos.

Infarto cerebral en el adulto joven.

El IC tiene importantes repercusiones en el aspecto funcional como en la calidad de vida de los pacientes, principalmente cuando son jóvenes (18,19). De acuerdo a diferentes estadísticas, al menos el 10 – 12% de los pacientes con IC son menores de 45 o 50 años dependiendo de la edad límite considerada por el autor (18- 20).

En algunas series reportan que conforme la edad incrementa, también se incrementa el riesgo de IC, por lo que a edad más temprana menor será la prevalencia (13,21,22).

En el registro PREMIER (17) se determinó que aproximadamente 23% de los 1040 pacientes con un primer evento de IC tenían menos de 55 años de edad sin existir diferencia entre el género, y sin más características descritas, dado que no se realizó análisis a fondo de este subgrupo de pacientes.

FACTORES DE RIESGO DE IC EN JÓVENES:

Tabaquismo. Con un OR (Odds ratio) de 2.2 cuando el consumo va de 1 a 10 cigarrillos y 9.1 cuando es ≥ 40 cigarrillos al día (23).

Migraña. El riesgo incrementa al doble en portadores de migraña con aura, con mayor afección en territorios de la circulación posterior (24).

Puerperio y embarazo. El riesgo incrementa días antes del parto y hasta 6 semanas después (25,26).

Anticonceptivos orales (AO). Existe un incremento del riesgo al menos cuatro veces para las mujeres que toman AO con alto contenido de estrógenos (27).

Uso de drogas ilícitas. Las drogas con efecto simpaticomimético pueden ocasionar eventos vasculares isquémicos por medio de múltiples mecanismos, como hipertensión, incremento de la agregación plaquetaria, entre otros (19).

ETIOLOGÍA DE IC EN JÓVENES:

Cardioembolismo: Se ha identificado como causa de IC en joven en cerca del 20% de los pacientes, las causas específicas reportadas hasta ahora son múltiples (13,19,28,29). Actualmente una importante causa de cardioembolismo descrita en la población joven es el foramen oval permeable (FOP). La prevalencia actual de FOP es del 25% aunque disminuye conforme incrementa la edad (30,31). El ecocardiograma transesofágico contrastado sigue siendo el estudio con mayor sensibilidad para su detección (32). En muchos de los casos incluso además de realizar electrocardiogramas seriados y ecocardiograma

transtorácico, muchos autores recomiendan la ecocardiografía transesofágica como un estudio que forma parte del protocolo diagnóstico del IC en joven (13). Siempre será necesario recordar que las fuentes embolígenas de alto riesgo en jóvenes detectadas por ecocardiografía incluyen las válvulas mecánicas protésicas, estenosis mitral, endocarditis, cardiomiopatías, trombos intracavitarios y tumores cardíacos como el mixoma (33-35).

Angiopatías no aterosclerosas. La disección cervical arterial es por mucho la angiopatía no aterosclerosa más frecuente, considerándose como una de las tres primeras causas de IC en jóvenes. La evidencia de displasia fibromuscular es positiva hasta en un 15% de los pacientes con disección de la carótida interna (36). Otras causas descritas para considerar angiopatías no aterosclerosas son: Trauma, infección, migraña, vasculitis, síndrome de vasoconstricción cerebral reversible, enfermedades genéticas o hereditarias (Enfermedad de Fabry, Moya-Moya, entre otras) etc (19). Los estudios como la Resonancia magnética con angiografía, la angiotomografía o el ultrasonido Doppler carotídeo – vertebral combinado con el Doppler transcraneal pueden utilizarse para confirmar una lesión intra o extracraneal de grandes vasos (13).

Enfermedad de pequeño vaso. A pesar de que este mecanismo está altamente relacionado con diabéticos e hipertensos de larga evolución, existen altos porcentajes descritos en poblaciones asiáticas y la población americana de color, lo que pudiera condicionar una influencia racial y étnica sobre este subtipo de IC (37,38). Es frecuente en este grupo de pacientes los hallazgos de infartos lacunares silentes, leucoaraiosis y lesiones de la sustancia blanca periventricular (39).

Otras causas identificables. Después de haber realizado el abordaje completo de laboratorio (incluyendo biometría hemática completa, velocidad de sedimentación globular, proteína C-reactiva, electrolitos, glucemia, tiempos de coagulación, perfil de función hepático, perfil de función renal, perfil de lípidos e incluso tiroideo) e imagenología podremos tener en mente alguna etiología de menor frecuencia como trombofilias, padecimientos inmunológicos, trastornos protrombóticos, entre otros. Las enfermedades hematológicas e IC se encuentran relacionadas a trombofilias hereditarias sólo en un 5%. Siendo la causa de

trombofilia adquirida mas frecuente de IC en joven el síndrome de anticuerpos antifosfolipidos, específicamente el anticoagulante lúpico (40,41).

Infarto de origen no determinado (criptogénico). Alrededor de un 25 -50% de los IC en jóvenes son indeterminados, sin embargo un frecuente error en los eventos criptogénicos es el retraso en la investigación etiológica o el estudio incompleto en estos pacientes. Esto tiene particular importancia cuando se trata de una disección arterial cervical que puede resolver de inmediato o un trombo intracavitario que puede desaparecer en fragmentos o embolizar y no detectarse en los estudios posteriores al evento (31,42,43).

En México, Barinagarrementeria y cols (44), en un estudio prospectivo en adultos jóvenes con IC, reportaron las siguientes causas: No determinado en 32%, vasculopatías no aterosclerosas 27%, cardioembolismo 24%, enfermedades hematológicas 10%, por aterosclerosis prematura 3% y atribuido a migraña 3%.

- **Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)**

La cardiopatía isquémica es la principal causa de muerte en adultos en los Estados Unidos de América, representando un tercio de todas las muertes en sujetos mayores de 35 años, siendo causada prácticamente por la EAC la cual suele ser producto de un síndrome coronario agudo (45). La última actualización del 2016 de la AHA (*American Heart Association* por sus siglas en inglés) sobre enfermedades del corazón y la EVC informó que la tasa de mortalidad global por cardiopatía isquémica fue de 102.6 por 100,000 (46).

En México, la cardiopatía isquémica es una de las principales causas de muerte desde la década de los noventas, atribuyéndose 50,000 muertes en el año 2003 y contribuyó a cerca del 10% de todas las causas de mortalidad en dicha fecha. En el Registro Nacional de Síndromes Isquémicos Coronarios Agudos (RENASICA) el 65.2% correspondió a un síndrome isquemico coronario agudo sin elevación del segmento ST (SICASEST) y el resto al síndrome isquemico coronario agudo con elevación del ST (SICACEST), predominando el sexo

masculino con el 78% y la edad promedio de 53 años. En el RENASICA II se determinó que el SICACEST fue la causa mas frecuente de hospitalización (56%), seguida del SICASEST (44%) y con un incremento en la incidencia de diabetes en la población estudiada, además de el resto de los factores cardiovasculares conocidos (47,48).

Fisiopatológicamente el infarto de miocardio (IM) resulta de una interacción de factores genéticos y ambientales asociandose a la ruptura de una placa aterosclerosa (denominada “vulnerable”) constituida por un núcleo lipídico, intima delgada y remodelación positiva, (49) atribuyéndose en general que cerca del 90% de los pacientes con IM presentan este tipo de lesiones ateromatosas descritas (50,51), las cuales culminan en una lesión arterial obstructiva que produce daño tisular, compartiendo aspectos fisiopatológicos con el IC, lo que sustenta que ambos padecimientos comparten múltiples factores de riesgo (5).

Debido a que la expresión clínica de la EAC son los síndromes coronarios agudos, estos se pueden clasificar SICACEST y SICASEST, así como también se considera a la angina inestable (en la que no hay marcadores de necrosis miocárdica) dentro de esta división (dado que es un inminente precursor de un infarto de miocardio y su fisiopatología es similar al SICASEST en la que resultan de una oclusión parcial o intermitente de una arteria coronaria, mientras que el SICACEST resulta de una oclusión total del vaso) (52).

Los criterios para el diagnóstico de infarto de miocardio y su clasificación aún vigentes son los descritos por la *Tercera Global IM Task Force* (53) (Cuadro I y II)

Cuadro I. Tercera Definición Universal de IM

El término IM se debe utilizar cuando haya pruebas de necrosis miocárdica en un contexto clínico coherente con isquemia miocárdica aguda. En esas condiciones, cualquiera de los criterios siguientes cumple el diagnóstico de IAM:

- **Detección de un aumento o descenso de los valores de biomarcadores cardiacos (preferiblemente cTn) con al menos un valor por encima del p99 del LRS y con al menos uno de los siguientes:**
 - Síntomas de isquemia
-

- Nuevos o supuestamente nuevos cambios significativos del segmento ST-T o nuevo BRIHH
 - Aparición de ondas Q patológicas en el ECG
 - Pruebas por imagen de nueva pérdida de miocardio viable o nuevas anomalías regionales en el movimiento de la pared
 - Identificación de un trombo intracoronario en la angiografía o la autopsia
- **Muerte cardíaca** con síntomas de isquemia miocárdica y supuestas nuevas alteraciones isquémicas en el ECG o nuevo BRIHH, pero que se produjo antes de determinar biomarcadores cardíacos o antes de que aumentasen los valores de estos
 - Se define arbitrariamente el **IM relacionado con ICP** por la elevación de cTn ($> 5 \times p99$ del LRS) en pacientes con valores basales normales ($\leq p99$ del LRS) o un aumento de los valores de cTn $> 20\%$ si los basales son elevados y estables o descienden. Además, se necesita: a) síntomas de isquemia miocárdica; b) nuevos cambios isquémicos del ECG; c) hallazgos angiográficos coherentes con complicación del procedimiento, o d) demostración por imagen de nueva pérdida de miocardio viable o nuevas anomalías regionales en el movimiento de la pared
 - La **trombosis del stent asociada a IM** si se detecta en la angiografía coronaria o la autopsia en el contexto de isquemia miocárdica y con un aumento o descenso de los títulos de biomarcadores cardíacos con al menos un valor $> p99$ del LRS
 - El **IM relacionado con la CABG** se define arbitrariamente por la elevación de títulos de biomarcadores cardíacos ($> 10 \times p99$ del LRS) en pacientes con valores basales de cTn normales ($\leq p99$ del LRS). Además, se debe considerar diagnóstico de IM: a) nuevas ondas Q patológicas o nuevo BRIHH; b) nuevo injerto documentado angiográficamente o nueva oclusión de la arteria coronaria nativa, o c) pruebas por imagen de nueva pérdida de miocardio viable o nuevas anomalías regionales en el movimiento de la pared

BRIHH: bloqueo de rama izquierda del haz de His; CABG: cirugía de revascularización aortocoronaria; cTn: troponinas cardíacas; IAM: infarto agudo de miocardio; ICP: intervención coronaria percutánea; IM: infarto de miocardio; LRS: límite superior de referencia; p99: percentil 99.

Cuadro II. Clasificación Universal del Infarto Agudo de Miocardio

Tipo 1: IM espontáneo

IM espontáneo relacionado con ruptura de placa aterosclerótica, ulceración, fisura, erosión o disección que resulta en trombo intraluminal en una o más de las arterias coronarias y reducción del riego sanguíneo miocárdico o embolia plaquetaria distal con la consiguiente necrosis miocítica. El paciente podría tener EAC grave subyacente, pero en ocasiones hay EAC no obstructiva o no hay EAC

Tipo 2: IM secundario a desequilibrio isquémico

En caso de lesión miocárdica con necrosis en que un trastorno distinto de EAC contribuye al desequilibrio entre suministro y la demanda miocárdicas de oxígeno, p. ej., disfunción endotelial coronaria, espasmo de la arteria coronaria, embolia coronaria, taquiarritmias o bradiarritmias, anemia, insuficiencia respiratoria, hipotensión e hipertensión con o sin HVI

Tipo 3: IM que resulta en muerte cuando aún no se dispone de las determinaciones de biomarcadores

Muerte cardíaca con síntomas de isquemia miocárdica y supuestas nuevas alteraciones isquémicas en el ECG o nuevo BRIHH, pero que ocurre antes de

que se pudiera tomar las muestras de sangre o el biomarcador cardiaco pudiese aumentar o, más raramente, sin haber determinado los biomarcadores cardiacos

Tipo 4a: IM relacionado con ICP

El IM relacionado con la ICP se define arbitrariamente por la elevación de los títulos de cTn $> 5 \times$ p99 del LRS en pacientes con valores basales normales (\leq p99 del LRS) o un aumento de cTn $> 20\%$ si los valores basales eran elevados y estables o descendentes. Además se necesita uno de los siguientes: a) síntomas de isquemia miocárdica; b) nuevos cambios isquémicos del ECG o nuevo BRIHH; c) pérdida angiográfica de permeabilidad de la arteria coronaria principal o una rama lateral, flujo lento o ausencia de flujo persistentes o embolización, o d) evidencia por imagen de nueva pérdida de miocardio viable o nuevas anomalías regionales del movimiento de la pared

Tipo 4b: IM relacionado con trombosis del stent

El IM relacionado con trombosis del stent se detecta mediante angiografía coronaria o autopsia en el contexto de isquemia miocárdica y aumento o descenso de los títulos de los biomarcadores cardiacos con al menos un valor $>$ p99 del LRS

Tipo 5: IM relacionado con la CABG

El IM relacionado con la CABG se define arbitrariamente por la elevación de los títulos de los biomarcadores cardiacos $> 10 \times$ p99 del LRS en pacientes con valores basales de cTn normales (\leq p99 del LRS). Además, uno de los siguientes: a) nuevas ondas Q patológicas o nuevo BRIHH; b) nueva oclusión de la arteria coronaria nativa o injerto documentada angiográficamente, o c) evidencia por imagen de nueva pérdida de miocardio viable o nuevas anomalías regionales del movimiento de la pared

BRIHH: bloqueo de rama izquierda del haz de His; CABG: cirugía de revascularización aortocoronaria; cTn: troponinas cardiacas; ICP: intervención coronaria percutánea; IM: infarto de miocardio; LRS: límite superior de referencia; p99: percentil 99

- **Enfermedad coronaria en el adulto joven**

A pesar de que la EAC lidera los índices de mortalidad a nivel mundial, no existen datos suficientes en la literatura acerca de la enfermedad prematura y el IM en “jóvenes”. Las consecuencias de esta patología son devastadoras, especialmente en el grupo de jóvenes en quienes las repercusiones sociales, psicológicas, la posibilidad de trabajar y las limitaciones socioeconómicas se vuelven prioritarias. No existe consenso en cuanto al punto de corte de edad para la definición de EAC en joven. Hay quienes incluyen pacientes menores de 35 años (54), 40, 45 años (55), o hasta 55 años como límite superior (56).

Aunque se considera que la proporción de pacientes jóvenes con IM es baja, la importancia de su evaluación radica en la necesidad de intervención oportuna; las cifras discrepan, oscilando entre 2-10% del total de infartos de miocardio

reportados (57,58). El estudio GRACE encontró una prevalencia de 6.3% de SICA en pacientes jóvenes, en el Registro Thai fue de 5.8% y en el Registro Español de 7% (59-61).

El estudio epidemiológico mejor conocido en cuanto a medicina cardiovascular es el *Framingham Heart Study* (62) el cual reportó una incidencia de 10 años de IM en jóvenes (menores de 55 años) de 51.1/1000 en hombres y 7.4/1000 en mujeres; McManus y cols (63), reportaron una menor incidencia de infarto en el grupo de 25 a 54 años: 66/100,000 Fournier y cols (64), han reportado tasas de incidencia de aproximadamente 4% en menores de 40 años. Mientras que una de las cifras más altas es la de Loughan y cols (65), en Melbourne, Australia en donde encontraron 20% de ingresos hospitalarios por IM en menores de 55 años en un seguimiento de 6 años.

En general el IM en jóvenes puede dividirse en 2 grupos, aquellos con arterias coronarias angiográficamente normales y aquellos con EAC. En el caso del grupo sin aparente EAC la etiología se ha asociado a arteritis, trombosis (estados de hipercoagulabilidad), embolismo o vasoespaso (66,67). En el segundo grupo con EAC generalmente el infarto es secundario al proceso aterosclerótico, el cual inicia posiblemente desde la infancia (68). Dentro de los IM sin aparente EAC existen causas no frecuentes de IM como la disección coronaria espontánea en el periparto, así como aneurismas coronarios congénitos o secundarios a enfermedad de Kawasaki (69).

Los factores de riesgo cardiovascular son comparables con su contraparte de mayor edad, gran parte de los pacientes tienen al menos un factor de riesgo cardiovascular identificable entre los cuales sobresale tabaquismo, sobrepeso, historia familiar de EAC, dislipidemia especialmente hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL, así como abuso de cocaína (61,70,71).

Diversos autores han identificado el tabaquismo como el principal factor de riesgo, entre ellos Yusuf y cols (72), quienes determinaron su asociación con IM reportando un OR de 3.3 (IC 95%, 2.86-3.87); Aggarwal y cols (73) refieren que dicho factor es cinco veces más prevalente en jóvenes con IM.

El antecedente familiar de EAC se reporta en 41-71% de los pacientes (74-76) comparados con pacientes de mayor edad, los individuos jóvenes tienen el doble de prevalencia de historia familiar de EAC (77) aunque algunos estudios sugieren que puede ser hasta 4 veces mayor (78).

El género más afectado continúa siendo el masculino abarcando el 79-95 % de los casos (54,73). Xie y cols (79), encontraron también alta prevalencia (50%) de diabetes mellitus e hipertensión arterial como factores de riesgo importantes en mujeres jóvenes con IM, sin embargo generalmente su frecuencia no es tan alta en el grupo de IM joven.

El espectro de esta enfermedad difiere entre los grupos de edad en múltiples formas, entre las cuales se han reportado la presentación clínica, siendo más frecuente el dolor torácico típico de novo en jóvenes (sin antecedente de episodios previos de angina) y predominando los casos de SICASEST hasta en 2/3 partes (63) Los hallazgos angiográficos también son diferentes en los jóvenes, en el estudio CASS (80) se reportó una prevalencia de arterias coronarias normales en aproximadamente 18% así como enfermedad de un sólo vaso en 38%. Esta última alteración se ha visto incluso en forma más frecuente en otras series como la de Bhardwaj y cols (57%) y en el estudio de Xie y cols (71.8%) (81).

El tratamiento de estos pacientes se basa en las mismas guías utilizadas para mayores de 55 años, en donde en el caso de SICACEST los beneficios de angioplastia y trombólisis ya han sido establecidos. La edad joven es un predictor independiente de pronóstico favorable posterior a trombolisis (82).

El pronóstico y respuesta a tratamiento generalmente es mejor en jóvenes, presentando menor índice de complicaciones y mortalidad (61,83), sin embargo la insuficiencia cardíaca es una complicación potencialmente debilitante en este grupo de pacientes quienes se encuentran en la cúspide de su vida productiva y laboral, siendo entonces un factor predictor importante en cuanto al pronóstico a largo plazo (63).

El desarrollo de ambos padecimientos vasculares (IC e IM) está influenciado por la presencia de factores modificables como tabaquismo, hábitos dietéticos, sobrepeso y sedentarismo, así como por otras comorbilidades como hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, dislipidemias, entre otros. Sin embargo en una buena parte de los pacientes adultos jóvenes ambos eventos no suelen asociarse a los factores de riesgo cardiovasculares conocidos, aunque esta aseveración tiene quizá mayor aplicación para el IC (50,51,66,67).

Bases genéticas del infarto cerebral y de miocardio

Actualmente se considera que el IM y el IC son resultado de una enfermedad multifactorial y poligénica compleja que surgen de un gran número de interacciones entre genes - genes y genes - medio ambiente, incluso los estudios de genoma sugieren que la contribución de factores genéticos es de aproximadamente el 10%, desempeñando un papel importante en la causalidad de las enfermedades cardiovasculares (84,85).

Los primeros datos acerca de la participación de un componente genético en el desarrollo de un IM provienen de estudios realizados en familiares de los pacientes que lo han presentado, en quienes el riesgo de padecer IM fue cuatro veces mayor que en los familiares en primer grado de sujetos sanos (86-88), por lo que en la actualidad se considera como un riesgo independiente. Los estudios para evaluar la influencia hereditaria de algún genotipo específico son particularmente relevantes cuando se llevan a cabo en gemelos univitelinos (89). En un estudio realizado en 21,004 parejas de gemelos, el riesgo de presentar IM fue significativamente más alto en 7,310 gemelos (90). De forma similar existe evidencia de que la historia en familiares de primer grado con EVC está asociado con un incremento en el riesgo de un IC (OR 2.65, IC95% 1.75-4.01), siendo esta asociación mayor cuando la historia es en un hermano en comparación con alguno de los padres (91).

Considerando que la patogénesis de las enfermedades tromboticas arteriales es compleja e involucra múltiples aspectos genéticos y factores ambientales, como se ha explicado previamente, existe un grupo de pacientes que no presentan factores de riesgo tromboticos o cardiovasculares, lo que ha dado lugar a que

con el apoyo del progreso en la investigación genómica los investigadores se enfocan a la búsqueda de factores genéticos que puedan actuar con predisposición a factores de riesgo convencionales, modulando los efectos de tales factores de riesgo en los órganos blanco o influyendo en un efecto independiente sobre un fenómeno trombótico vascular, aportando conocimiento para mejorar los alcances de la fisiopatología molecular de estos fenómenos vasculares (92). La capacidad de cierta variación genética de contribuir a la patogénesis de una enfermedad está determinada por su impacto funcional en la expresión genética o la función de la proteína. En forma general se han clasificado como patogénicas, probablemente patogénicas, de significado incierto, benignas y probablemente benignas (93).

Se ha considerado que las variaciones genéticas comunes pueden llegar a contribuir a la susceptibilidad a enfermedades, la progresión o complicación de las mismas y a la variabilidad a una respuesta terapéutica. Existen mínimas variaciones, en forma cuantiosa, responsables de la mayoría de la variabilidad de rasgos hereditarios en la población general. Estas variaciones incluyen polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés), inserciones y deleciones (indels), variaciones en el número de copias y repeticiones cortas en tándem. Los SNP constituyen la forma más abundante de variación genética, estimándose aproximadamente entre 2.8 y 3.9 millones de las mismas por individuo (94).

Existen polimorfismos que modifican la actividad de las proteínas, aumentándola o disminuyéndola, alterando su expresión y estabilidad, y por lo tanto modificando el equilibrio metabólico y homeostasis del organismo en sus diferentes sistemas. De esta manera la determinación de estas variaciones genéticas como los SNP, ha dado lugar a un enfoque más efectivo sobre la variación genética asociada a diversas enfermedades multifactoriales, ya que proporciona una visión diferente y nueva de la patogénesis de estas condiciones. (85,95)

Se ha estimado influencia hereditaria en un 40-50% de los casos de enfermedad coronaria (96) y más de 40 locus asociados se han identificado como potenciales candidatos. Si bien hasta el momento se cuenta con calificaciones que predicen

el riesgo cardiovascular, el avance científico exige involucrar la parte genética para mejorar las herramientas de predicción de riesgo e incluso proponer nuevos blancos terapéuticos. (97,98)

Existen diversos perfiles patogénicos involucrados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Metabolismo lipídico, inflamación, fibrinólisis y hemostasia, entre otros) que han dado lugar a la búsqueda de ciertas variaciones genéticas que puedan explicar una alteración de la homeostasis y den lugar a una enfermedad. Las principales líneas de investigación que lideran los estudios en los fenómenos vasculares por trombosis arterial, principalmente en enfermedades cardiovasculares son (85,92,95,99-101):

1) Hemostasia.

a) Sistema de coagulación.

- *Fibrinogeno (Factor I)*. Algunos polimorfismos de esta glicoproteínas se han considerado por mucho tiempo un riesgo independiente para IM, pero los estudios realizados en búsqueda de asociación con el IC han descartado su posible asociación.
- *Protrombina (Factor II)*. Variantes genéticas de esta glicoproteína vitamina K dependiente que convierte el fibrinógeno en fibrina han tenido hallazgos controversiales en IC y trombosis venosa cerebral.
- *Factor V de Leiden*. Sus polimorfismos se han encontrado asociados a enfermedades cardio cerebro vasculares y trombosis venosa, entre otros.
- *Factor VII*. Ha habido mucho interés sobre la influencia de este factor dependiente de vitamina K sobre su papel en el inicio de la coagulación en enfermedades tromboticas arteriales, pero sus polimorfismos mas estudiandos no han sido contundentes hasta ahora en su asociación con IM o IC, excepto por un estudio que reportó asociación entre una de sus variantes y el IC en sujetos mayores de 60 años.
- *Factor XII*. El papel de los polimorfismos de esta proteína involucrada en las vía intrínseca de la coagulación es poco claro en relación a trombosis venosas e IM, existiendo sólo un reporte en relación a su asociación en la población española y el IC.
- *Factor XIII*. Polimorfismos de este factor tienen resultados contradictorios en su relación con el IM, pero estudios recientes han

reportado un polimorfismo protector que parece disminuir el riesgo en IM e IC.

- *Factor de Von Willebrand*. Variantes genéticas de esta glicoproteína que promueve la adhesión plaquetaria han sido asociadas a un incremento del riesgo tanto para IC como para IM, predominantemente en poblaciones asiáticas.

b) Factores fibrinolíticos

- *Inhibidor del activador del plasminogeno 1 (PAI-1)*. Se han descrito polimorfismos del gen que codifica para esta proteína en relación al riesgo de IM y su asociación también con las concentraciones elevadas de triglicéridos.

- *Activador del Plasminogeno tisular (tPA)*. Modificaciones en diversas secuencias de nucleótidos en sujetos portadores han sido asociadas con el incremento en el riesgo de IM

- *Inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI)*. También llamado Carboxipeptidasa B2 (CPB2), algunos de sus polimorfismos tienen asociación con IM y controversial con IC, sin embargo más adelante se especificarán los detalles de esta proteína y sus polimorfismos.

2) Receptores plaquetarios.

- a) Complejo glicoproteína IIb/IIIa.** Es un receptor miembro de la familia de las integrinas, esencial para la adhesión plaquetaria, uno de sus polimorfismos ha tenido asociación constante con IM y controversialmente con IC.

- b) Complejo glicoproteína Ia/IIa.** La variación genética de esta proteína se ha relacionado con incremento del riesgo en IC principalmente en jóvenes pero mayor asociación en IM aparentemente.

- c) Complejo glicoproteína Ib/IX/V.** Es un complejo receptor para el factor de Von Willebrand y se ha determinado que uno de sus polimorfismos confiere riesgo para IC en población asiática.

3) Función endotelial.

- a) Sintetasa de óxido nítrico endotelial (e-NOS).** Es una enzima que cataliza la formación de óxido nítrico soluble con múltiples efectos vasculares lo que ha contribuido a que sus polimorfismos tengan asociación con hipertensión,

aterosclerosis, IM, IC, entre otros.

b) Trombomodulina. Es un receptor de superficie de la célula endotelial del cual se han identificado dos de sus polimorfismos siendo uno de ellos el que se asocia principalmente a fumadores con IM.

4) **Metabolismo de homocisteína.**

a) Metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Una variante genética en el gen que codifica esta enzima puede dar lugar a niveles elevados de homocisteína que se consideran un factor de riesgo independiente para aterosclerosis y trombosis arterial.

5) **Sistema Renina Angiotensina.**

a) Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA). Un polimorfismo en el gen que codifica esta enzima ha tenido evidencia de condicionar incremento de las concentraciones séricas de ECA y condicionar riesgo de IC.

b) Angiotensinógeno. Esta glicoproteína secretada por el hígado y sustrato para la acción de la renina se ha implicado con el desarrollo de hipertensión arterial, aterosclerosis carótidea y lesiones de sustancia blanca cerebral, sin evidencia contundente de incrementar el riesgo de IC, lo anterior dado principalmente por un par de polimorfismos que incrementan sus concentraciones séricas.

6) **Metabolismo de lipoproteínas.**

a) Apolipoproteína E (ApoE). Esta proteína plasmática implicada en el transporte de lípidos tiene diferentes isoformas, codificadas por 3 alelos diferentes, uno de estos alelos ha sido identificado como relacionado al incremento del riesgo de IC.

b) Apolipoproteínas (APO) y lipoproteína lipasa. Variantes genéticas de estas proteínas se han visto involucradas con el incremento del riesgo de IM y de IC.

Al ser las enfermedades cardiovasculares multifactoriales, la interacción ambiente-genotipo puede determinar el desarrollo y progresión del estado patológico, a través de mecanismos dinámicos, reguladores, epigenéticos (principalmente la metilación, la modificación de histonas y la interferencia no codificante del ARN) que confluyen en un fenotipo específico. La consecuencia de estas interacciones a exposiciones ambientales a través del tiempo y espacio

pueden condicionar un factor protector a un individuo con un genotipo de riesgo y viceversa (102).

Con base en amplia información preexistente en el mundo y los avances científicos y tecnológicos, desde hace más de 10 años iniciamos la formación de un grupo médico científico interdisciplinario en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA), con sede en el Hospital General Regional # 1 “Carlos Mac Gregor Sánchez” (HGR1) del Instituto Mexicano del Seguro social (IMSS) en la Ciudad de México con el objetivo de participar en el desarrollo del conocimiento genético y sus variantes en las enfermedades cardiovasculares en nuestra población. Debido a que anualmente se valoran más de mil pacientes enviados principalmente del mismo hospital (HGR1) y de los diferentes hospitales del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que provienen de diferentes departamentos clínicos (medicina interna, cardiología, neurología, hematología, entre otras) se iniciaron estudios para delimitar el perfil genético que confiere el riesgo para la enfermedad cardio cerebro vascular en sujetos jóvenes, logrando identificar algunas variantes genéticas que presentan asociadas para el desarrollo de SICACEST (< 45 años) en nuestra población como son: la inserción/delección 4G/5G en el gen del PAI-1 (103), el polimorfismo Glu298Asp en el gen de la e-NOS (104) y el polimorfismo PIA 1/A2 de la glicoproteína IIIa plaquetaria (105). En forma contraria demostramos que el polimorfismo en el C677T en el gen de la enzima 5,10 MTHFR, el polimorfismo R353Q del gen del factor VII de la coagulación y el polimorfismo N700S en el gen de la trombospondina-1 no representan un factor de riesgo o protector para IM en este subgrupo de pacientes (Figura 1) (106,107).

En lo que respecta a los pacientes con IC se identificaron algunas variantes genéticas que presentan asociación para el desarrollo de IC (< 45 años) en nuestra población, como son: el polimorfismo C677T en el gen de la MTHFR (108), y el Glu298Asp en el gen del e-NOS; y a diferencia del SICACEST la inserción/delección 4G/5G en el gen del PAI-1 (109) y el polimorfismo PIA 1/A2 de la glucoproteína IIIa plaquetaria no tuvieron asociación alguna con este grupo de pacientes (105) (Estas investigaciones se han desarrollado a lo largo de diversos trabajos y colaboraciones, contando actualmente con un Biobanco que resguarda gran parte de muestras séricas de pacientes que han participado en

los diferentes protocolos de investigación y que han autorizado el uso de sus muestras sanguíneas para colaborar en estudios futuros de la UIMTHA, aportando además diversos datos clínicos y demográficos que confidencialmente se tienen en una base de datos en la unidad).

Figura 1. Polimorfismos estudiados en la UIMTHA y su asociación con IM o IC.

Polimorfismos (<45a)	Infarto de miocardio	Infarto cerebral
UIMTHA		
4G/5G del PAI -1 (103,109)	Asociado	No asociado
Glu298Asp de la eNOS (104,105)	Asociado	Asociado
PIA 1/A2 de la Gp IIIa (105)	Asociado	No asociado
C677T en la MTHFR (106,108)	No asociado	Asociado
R353Q del FVII (107)	No asociado	En proceso
N700S de la Trombospondina 1	No asociado	En proceso

Con los estudios previamente comentados intentamos abarcar hasta ahora ciertas líneas de investigación para ampliar el estudio de las enfermedades cardio cerebro vasculares principalmente en el adulto joven (<50 años) en nuestra población, haciendo evidente los diferentes resultados entre el IM y el IC. Esto ha impulsado en complementar el conocimiento sobre estos dos territorios y sus patrones de variabilidad genética con el objetivo de demostrar que muy posiblemente son territorios de comportamiento diferente aunque comparten características anatómicas similares. Por lo anterior es de nuestro interés continuar en la búsqueda de estas diferencias, principalmente en mecanismos de la fibrinólisis dado que forma parte del desarrollo patogénico del trombo y es también un blanco terapéutico en ambos padecimientos (110).

Algunos de los polimorfismos que se han descrito asociados al desarrollo de IC en la vía fibrinolítica son los asociados al TAFI también llamado Carboxipeptidasa

B2 (CPB2), como lo son el Ala147Thr y el Thr325Ile del gen del TAFI, debido a su implicación con las modificaciones en las concentraciones de la proteína y consecutivamente con su funcionamiento frente a la trombina, la cual es una proteína con actividad enzimática que produce la conversión de fibrinógeno a fibrina y el desarrollo de un coágulo insoluble de fibrina como último paso en la cascada de la coagulación durante el proceso hemostático. El TAFI o CPB2 como se describirá mas adelante y de forma indistinta a lo largo del protocolo, no es mas que un vínculo, descrito hace algunos años, entre la coagulación y la fibrinólisis.

Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina

El TAFI, es una carboxipeptidasa activa que se reportó en 1989 e identificada años mas tarde como un zimógeno que puede ser activado por trombina, ejerciendo así un efecto antifibrinolítico (110), por lo que no es mas que otro vinculo entre la coagulación y la fibrinólisis. Su proenzima pro-TAFI (procarboxipeptidasa U, procarboxipeptidasa B plasmática). La molécula de pro-TAFI es activada por tripsina, plasmina y más eficientemente por el complejo trombina/trombomodulina, lo que genera la forma activa de la enzima TAFI (carboxipeptidasa U, B). El TAFI es altamente inestable, con una vida media de solamente 10 minutos a 37°C debido a la inestabilidad proteolítica y a su degradación dependiente de la temperatura. El TAFI activado protege al coágulo de ser lisado mediante la proteólisis de arginina y lisina del extremo carboxiterminal de la fibrina y limita tanto la unión con el plasminógeno como la formación de plasmina (111). El TAFI es dependiente de la generación de trombina y en consecuencia, los trastornos que involucran un aumento o una disminución de ésta, afectará en forma directa la protección del coágulo para ser lisado.

Como ya se menciona antes el TAFI es una procarboxipeptidasa, de la familia de las metalocarboxipeptidasas. Estas enzimas circulan en plasma y también están presentes en tejidos como el páncreas e hidrolizan los puentes peptídicos C-terminal. El grupo de las carboxipeptidasas consiste en las serinocarboxipeptidasas, las argininocarboxipeptidasas y las anteriormente mencionadas, metalocarboxipeptidasas. Dentro de las metalocarboxipeptidasas,

se encuentra la llamada carboxipeptidasa N (CPN) y el TAFI. En 1988, debido a su gran inestabilidad térmica, se llamó inicialmente CPU (carboxipeptidasa U). Luego debido a su actividad arginin-carboxipeptidasa inducida por la coagulación, se denominó CPR, y más tarde otro grupo en el contexto de otro experimento descubrieron esta misma enzima con actividad pancreática similar a CPB, por lo que la denominó CPB. Bajzar y cols en 1995, purificaron dicha enzima y demostraron que podía ser activada por la trombina y que estando activa era capaz de inhibir la fibrinólisis, por lo que la llamaron TAFI. Siendo TAFI el zimógeno, mientras que la forma activa se denomina TAFI activada o funcional (112,113).

Caracterización, síntesis y propiedades del TAFI

Se sintetiza en el hígado y megacariocitos como un prepro péptido que consiste en 423 aminoácidos. TAFI es una glicoproteína con un peso molecular de 56 KDa. El gen del TAFI se encuentra en el cromosoma 13q14.11 y contiene 11 exones y tienen una longitud de 48 kb de DNA genómico. La transcripción se puede iniciar en múltiples regiones, siendo el TAFI un pro péptido de 423 aminoácidos. Hay 19 SNP a lo largo del gen del TAFI, de los cuales 6 están en regiones codificantes, de estos últimos, dos resultan de una sustitución de un aminoácido: +505 G/A y +1040 C/T, correspondientes a la sustitución Ala/Thr en la posición 147 (rs3742264) y Thr/Ile en la posición 325 (rs1926447) respectivamente, resultando en 4 isoformas de TAFI. La estructura del TAFI consiste en dos dominios: 1) dominio catalítico (Ala⁹³-Val⁴⁰¹;36Kda) y el péptido de activación N- Terminal (residuos 1-76) y una región de unión (residuos 77-92) (Phe¹ – Arg⁹²;20Kda). (110,114)

La activación del TAFI es catalizada por la plasmina, tripsina y la trombina, y el lugar de fragmentación está en la región Arg⁹². El TAFIa exhibe al menos una afinidad 10 veces inferior por el plasminógeno, lo que parece indicar que la unión al plasminógeno podría ser potenciada por el péptido de activación, aunque el papel fisiológico de esta interacción no ha sido elucidado. La trombina no activa el TAFI y requiere concentraciones elevadas de alrededor de 500 nmol/L para activar el TAFI en 10 minutos, mediante *Hippuryl-Arg* hidrólisis. La activación del TAFI ocurre simultáneamente a la formación de fibrina en sangre. Esta activación por trombina se potencia con la presencia de trombomodulina. Parece que la

trombomodulina amplifica la eficacia catalítica de la activación del TAFI dependiente de la trombina unas 1250 veces. También se produce la activación del TAFI de manera fisiológica mediante la plasmina, y es 8 veces más potente que la trombina, sobre todo en presencia de glicosaminoglicanos como los encontrados en la matriz extracelular. Teniendo en cuenta que el complejo trombina-trombomodulina activa el TAFI en función de la concentración, se puede esperar que la activación del TAFI también dependa de su concentración en plasma, lo que puede tener implicación en los síndromes hemorrágicos y trombóticos (113). De esta forma, la trombina generada en la activación de la coagulación no solamente es responsable de la formación de fibrina sino que también es capaz de protegerla de su lisis mediante la activación del TAFI. Una vez activado el TAFI, actúa sobre la fibrinólisis. Se sabe que la proteólisis de la fibrina, mediada por la plasmina, constituye un potente proceso de retroalimentación positiva que aumenta la activación del plasminógeno. El TAFIa inhibe la fibrinólisis mediante una proteólisis de residuos lisina y arginina de la región carboxi-terminal de la fibrina durante el proceso de lisis, concretamente precisa que la plasmina haya iniciado el proceso de lisis de la fibrina. En cuanto a la inhibición del TAFIa, es la misma inestabilidad térmica y conformacional del TAFIa la que regula su acción y su conversión en TAFIai. La posterior fragmentación del TAFIai evita su reactivación de una manera permanente (115,116).

Papel Fisiopatológico del TAFI

El TAFI, al inhibir la fibrinólisis, actúa como un procoagulante de forma que su defecto podría llevar a un estado permanente de fibrinólisis con el consiguiente riesgo de sangrado, y por el contrario su exceso podría causar procesos trombóticos (113,117). Se ha estudiado en pacientes con leucemia aguda promielocítica, encontrándose una disminución de su actividad, cercana al 60% con niveles normales de TAFI antigénico. En esta entidad se sospecha que esta disminución de la actividad del TAFI se debe a la acción de la plasmina, ya que en estos pacientes habitualmente se detecta una hiperfibrinólisis. También se ha estudiado el TAFI en la angina inestable encontrándose niveles elevados que podrían contribuir a la oclusión de los vasos coronarios. Este incremento se cree que es debido a un estado inflamatorio crónico detectado en los pacientes con

angina inestable (118). En pacientes con insuficiencia renal crónica, el TAFI, tanto funcional como antigénicamente, es absolutamente normal y no presenta correlación con los incrementos de complejos plasmina- α 2antiplasmina (PAP), con los complejos trombina- antitrombina (TAT) ni con la severidad de la insuficiencia renal. También se ha relacionado con el riesgo de trombosis venosa (119). Además, parece que no sólo tiene acción antifibrinolítica, en algunos casos se ha descrito como una proteína reactiva, y también se ha relacionado con sustratos como la bradiquinina, lo que sugiere que también tendría acción sobre el tono vascular (120). Estamos por tanto ante una molécula que tiene un papel crucial en la interacción entre la coagulación y la fibrinólisis, y con posibles mecanismos de acción aún desconocidos. Ello nos conduce a la importancia de profundizar en el posible rol del TAFI en la trombosis así como las posibles variaciones en plasma tanto del TAFI antigénico como el funcional o activo en las diferentes poblaciones. Varios estudios han relacionado los niveles altos de TAFI antigénico con el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares como los síndromes coronarios agudos, y pocos han estudiado su relación con la enfermedad cerebrovascular isquémica.

En conclusión a lo reportado en los diferentes estudios, a lo largo del tiempo se ha revelado que las variaciones genéticas por un SNP del gen que codifica para TAFI afectan sus niveles de expresión incrementando sus concentraciones y con ello el riesgo de eventos trombóticos (121).

Polimorfismos del Thr147Ala y el Thr325Ile en el gen del TAFI y su relación con el IC

Defectos en la activación de TAFI quizá contribuyan a la aparición de patologías de excesivo sangrado, mientras que un incremento en la activación de TAFI debido a un incremento en la generación de trombina permita la aparición de eventos trombóticos como el IM y IC. Por lo que el desarrollo de inhibidores específicos de TAFI o inhibidores que interfieran en la generación de trombina (122). Además de la participación en la regulación de la fibrinólisis, TAFI también tiene una importante función en la regulación del proceso inflamatorio, reparación y presión arterial. Se ha identificado que el incremento en la concentración plasmática de TAFI se asocia con un aumento en el riesgo para el desarrollo de IC (123), así como la severidad y evolución del mismo (124). El

incremento en la concentración de TAFI se asocia a una baja respuesta en el tratamiento de reperfusión con la terapia fibrinolítica del activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA) en pacientes con IC (125).

También se ha identificado el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI que modula tanto los niveles antigénicos como los niveles de actividad de la proteína asociándose con un incremento de esta última, ya que el homocigoto Ile/Ile (genotipo de riesgo) de dicho polimorfismo incrementa hasta un 60% su efecto antifibrinolítico en presencia de trombomodulina y hasta un 30-50% en ausencia de esta, independientemente del residuo en la posición 147, y con ello en el riesgo de trombosis arterial, con respecto al polimorfismo Ala147Thr en el gen del TAFI se ha asociado también incremento en los niveles de TAFI en los individuos homocigotos Thr/Thr comparados con los otros genotipos (Ala/Ala y Ala/Thr) (126).

Santamaría A y cols (127) reportó en población española que los niveles de TAFI fueron significativamente más altos en los casos con IC en comparación con los controles, confirmando un OR ajustado de 5.7 (IC 95% 2.3 – 14.1, $p < 0.05$) (128). Leebeek FWG y cols (128) describieron en población del norte de Europa que el incremento de los niveles de TAFI se asocio a un mayor riesgo de IC comparado con los cuartiles bajos (OR 4.0, IC 95% 1.6 – 9.8), así como también se determinó una relación con los niveles altos de fibrinógeno ($r = 0.19$, $p = 0.01$), en 36 casos se realizó nuevamente una medición de TAFI en la fase convaleciente (a los 3 meses del IC) y no existió una diferencia significativa entre los niveles de TAFI en la fase aguda (muestra tomada entre los 7 y los 14 días después del IC) y la fase convaleciente. Además se determinó una asociación del polimorfismo de riesgo Thr325Ile (homocigoto Ile/Ile) del gen del TAFI con un OR 1.39 (IC 95% 0.62 - 3.13) con la presencia de IC.

Landenvall C y cols (123), en un estudio en población belga, reportaron que el TAFI activo (OR 2.22, IC 95% 1.89 – 2.61) e inactivo (OR 1.21, IC 95% 1.06 - 1.38) tienen asociación con la presencia de IC, sin existir diferencia de los niveles de TAFI en la fase aguda con la toma a los 3 meses de seguimiento. En relación a los SNP del gen del TAFI no existió relación alguna.

Biswas A y cols (115), determinaron que existió asociación entre el incremento de los niveles séricos de la CPB2 con el IC no cardioembólico en pacientes menores de 40 años ($p < 0.001$) comparado con controles, con una correlación similar con los niveles de fibrinógeno y Factor VIII de la coagulación, y de la misma forma evaluaron 13 de los SNP del gen del TAFI y determinaron que al menos 5 de ellos tenían asociación alélica con el IC, entre ellos Ala147Thr y Thr325Ile.

Sin embargo el mismo autor (Biswas A y cols) en el año 2009 (129) en un estudio en población pediátrica indio-asiática con el objetivo de buscar la asociación de 13 diferentes polimorfismos con la presencia de IC determinó una asociación del Ala147Thr del gen del TAFI (siendo el genotipo de riesgo el homocigoto Thr/Thr) con IC con un OR de 2.45 (IC 95% 1.13 – 5.30).

En el estudio LURIC (126) realizado con población francesa, se identificó la asociación del polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI con el incremento de la incidencia de IC en comparación con quienes no tuvieron dicho desenlace, siendo nuevamente el genotipo de riesgo el homocigoto Ile325Ile (OR 1.67, IC95% 1.15-2.43, $p = 0.0075$).

En conclusión hasta ahora la literatura relaciona de forma constante el incremento de los niveles séricos de TAFI en relación a la presencia de un IC, existiendo asociaciones con los polimorfismos Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI, siendo los de riesgo, los considerados homocigotos para el alelo mutante, es decir Ile325Ile y Thr147Thr respectivamente, sin embargo los hallazgos no han sido constantes y se han realizado en diferentes poblaciones, aunque hasta ahora sin incluirse en poblaciones latinas.

Shi L y cols en población China demostraron una asociación entre IC y el polimorfismo Ala147Thr (Thr/Thr) del gen del TAFI con un OR 4.17 (IC 95% 2.12 – 8.22) sin embargo esta referencia no tiene difusión internacional siendo comentada en revisiones de meta - análisis por lo que se desconoce gran parte de la metodología y detalles de dicho estudio (121).

Polimorfismos Thr 147 Ala y Thr 325 Ile en el gen del TAFI y la enfermedad cardiovascular

En el estudio PRIME (Prospective Epidemiological Study of MI) la concentración media de TAFI fue significativamente mayor en el grupo de sujetos que desarrollaron angina en comparación con el grupo control (119 vs 107%, $p=0.02$). El riesgo de desarrollo de un futuro episodio de angina fue 5 veces mayor en los pacientes con una concentración de TAFI en el último cuartil comparado con los que presentaron concentraciones en el nivel inferior (IC 95%, 1.38 a 18.58). Con respecto a los polimorfismos del TAFI, el genotipo Thr/Thr (Del Thr147Ala) fue significativamente más frecuente en el grupo de sujetos con angina comparado con el control, representando el genotipo Thr 147 Thr un marcador de riesgo para angina de pecho en la población Francesa con RR de 2.7 (IC 95% 1.23 -5.8) (49,50). En jóvenes se ha identificado al genotipo de riesgo del Thr325Ile como factor de riesgo para IM en poblaciones como la española (130,131).

En otro estudio realizado por Akatsu H y cols (118), 202 mujeres Japonesas aparentemente sanas y sin ninguna ingesta de medicamento se demostró un incremento en la concentración plasmática de TAFI en las de edad mayor comparadas con jóvenes, y con respecto a los polimorfismos siendo mayor en las portadoras de genotipo de riesgo Thr/Thr. Lo anterior confiere posiblemente un incremento en el riesgo de los individuos de mayor edad debido a que un aumento en la concentración de TAFI produce una disminución en la actividad fibrinolítica y con ellos un incremento en la formación del trombo.

En forma contraria, en un estudio realizado en sujetos Holandeses sobrevivientes a su primer IM menores de 70 años, no se identificó una asociación entre el polimorfismo Ala147Thr del gen del TAFI y el desarrollo de Infarto Agudo (132).

Existen autores que han intentado explicar el incremento de los niveles de TAFI debido al SNP Thr325Ile que modula tanto los niveles antigénicos como los niveles de actividad in vitro. En un estudio realizado en 127 pacientes <51 años y 99 sujetos aparentemente sanos (grupo control), se reportó un estado de hipofibrinólisis con un incremento en la concentración plasmática de PAI-1 y un incremento en la actividad de TAFI. Además, de encontrar una asociación entre

el genotipo Ile 325 y una disminución en la concentración antigénica de TAFI (130).

De igual forma, se ha identificado al genotipo Thr325Ile en el gen del TAFI como factor de riesgo en otras poblaciones como la española (131,133), en la cual se correlacionó el genotipo homocigoto para Ile con un incremento en la concentración antigénica de TAFI. En pacientes con IAM tratados con fibrinólisis, se demostró una asociación entre un incremento en la concentración de TAFI y un peor pronóstico en cuanto a reperfusión y recurrencia de IAM en estos pacientes (131). Debido a lo anterior se ha considerado como un marcador genético para el desarrollo de síndromes coronarios agudos (134).

En el estudio ATTAC en el cual se incluyeron pacientes jóvenes con diagnóstico de IM, IC y aparentemente sanos como grupo control, se demostró al genotipo Thr325Ile en el gen del TAFI como un marcador de riesgo para este tipo de pacientes sobre todo en la EAC (135).

En base a lo anterior es importante evaluar la participación de TAFI y su regulación por las variantes genéticas descritas en sujetos de alto riesgo, así como en personas que hayan presentado un IM o IC, con la finalidad de complementar el conocimiento de los eventos vasculares y la aparición de los mismo, la recurrencia de estos o en monitoreo de la terapia fibrinolítica (136,137)

Finalmente en un meta - análisis realizado por Wang S.W y cols (121) en donde analizaron la asociación de enfermedad cardiovascular y cerebrovascular concluyen que los portadores de SNP Ala147Thr G>A del gen del TAFI tienen mayor asociación significativa con enfermedades cerebrovasculares que cardiovasculares (OR 1.05, IC 95% 0.90 – 1.23 $p < 0.05$) y los portadores del SNP Thr325Ile C>T en el gen del TAFI tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares que cerebrovasculares (OR 1.25, IC 95% 1.02 – 1.54 $p = 0.029$)

Generalidades y funciones de la UIMTHA

Se trata de una unidad de investigación con más de 10 años de trabajo y colaboración en el seguimiento, abordaje diagnóstico y manejo terapéutico de padecimientos relacionados a trastornos de hemostasia, trombosis y aterogénesis, siendo dirigida por el Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz con formación y amplia experiencia en trastornos hematológicos y de la coagulación. La unidad labora primordialmente en turno matutino, excepcionalmente en turno vespertino y/o fin de semana, y se divide en laboratorios de investigación en hemostasia y coagulación, aterosclerosis, y misceláneos. Los estudios que se llevan a cabo (en sangre periférica) en esta unidad suelen ser complementarios para realizar el abordaje diagnóstico y/o terapéutico o de seguimiento en diferentes enfermedades incluyendo en estos estudios la determinación de: Anticoagulante lúpico, proteína C, S, antitrombina, resistencia a la proteína C activada, fibrinógeno, diversos factores de coagulación, activador del plasminogeno tisular, homocisteína y mutaciones del MTHFR, dímero D, complejos trombina/antitrombina, TAFI, enzimas de Oxido nítrico, fragmentos de protrombina, pruebas de actividad plaquetaria, entre otros más estudios.

Las principales unidades fuente de donde provienen los pacientes que son enviados a esta unidad son el HGR 1, el Hospital de especialidades y de cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México. Sin embargo algunas otras unidades hospitalarias principalmente de la delegación sur del IMSS eventualmente aportan un número menor de pacientes. La principales áreas que refieren pacientes a esta unidad son: Medicina interna, cardiología, hematología, angiología, neurología, nefrología y otras con menor participación.

El paciente que acude es enviado con el formato 4-30-08 institucional del IMSS, debidamente llenado, firmado por el médico que envía y la jefatura del servicio, con el referente sello de vigencia de la unidad de donde se envía. Dicho formato es debidamente llenado, adicionalmente se agrega un resumen en extenso y comentarios que habitualmente incluye el servicio que envía.

Una vez que el paciente llega a la UIMTHA es decisión del coordinador de la unidad aceptarlo o no. Ya aceptado el paciente se decide el o los estudios que serán necesarios y se dirige a iniciar un expediente con su documentación además de programarle una cita para realizar la toma de muestra, ya que dependiendo de los estudios que se consideren, los días de martes a viernes se

realiza la toma y procesamiento de muestras por cada uno de los subdepartamentos que conforma la unidad. De esta forma en todos los subdepartamentos se llevan acabo diferentes protocolos de investigación que involucran en muchas ocasiones manejo de muestras sanguíneas de estos pacientes, por lo que frecuentemente se extiende la invitación a los pacientes a participar en estudios de investigación de la unidad sin existir algún compromiso por aceptar o declinar su participación ya que esto no involucra mas que una participación voluntaria de la población.

3. JUSTIFICACION

Nuestra propuesta de investigación esta enfocada en identificar el patrón de comportamiento de los diferentes factores genéticos que condicionan una respuesta fibrinolítica anómala de manera temprana, debido a que los padecimientos cardio y cerebro vasculares han incrementado de manera notable en nuestro país.

Este estudio es parte de una pregunta genérica sobre la similitud o diferencia del comportamiento de dos diferentes territorios vasculares en sujetos jóvenes en los que posiblemente se tenga mayor probabilidad de participación de estos polimorfismos dado que son protagonistas independientes en la vía de la fibrinólisis y con ello en la perpetuidad de los factores protromboticos; y, debido al poco tiempo de exposición a los factores de riesgo modificables que se tiene en estos en comparación con los adultos mayores, su determinación adquiere una gran relevancia clínica y fisiopatológica, y de la misma forma su interpretación y posible aplicación.

Los resultados obtenidos del presente estudio, nos ayudarán a entender aún mejor las bases moleculares y fisiopatológicas de las enfermedades vasculares arteriales en los pacientes jóvenes de nuestra población y con ello desarrollar nuevas hipótesis en búsqueda de herramientas bioquímicas alternas para mejorar la prevención, diagnóstico e incluso tratamiento de los eventos cardio y cerebro vasculares que se manifiestan de manera temprana (95).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El IC e IM representan una de las causas más importante de morbi-mortalidad en el mundo. En México, ambas patologías se reportan dentro de las 3 primeras causas de muerte y es altamente discapacitante principalmente cuando se presentan en pacientes jóvenes, por lo que constituyen un problema de salud pública, con altos costos en su rehabilitación y tratamiento médico.

En un porcentaje considerable de los pacientes jóvenes no se identifican factores de riesgo de peso ni etiología precisa sobre el evento vascular (IM o IC) y de forma consecutiva se otorga un mismo tratamiento (antiagregantes plaquetarios) invariablemente, no obstante, existe evidencia de que ambos territorios tienen comportamiento diferente y posiblemente eso pueda tener una implicación en su respuesta terapéutica y posible recurrencia, situaciones que modifican el pronóstico de dichos pacientes.

Aunado a lo anterior, debido a que la variabilidad genética tiene comportamientos diferentes con respecto a las diferentes poblaciones, es imposible evitar pensar que los tan inconstantes hallazgos de estudios basados en variaciones genéticas como los SNP sean aplicables a nuestra población, una población que comparte patologías de países en vías de desarrollo como países desarrollados, y que con el paso del tiempo ve incrementar la frecuencia de los padecimientos cardio cerebro vasculares.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Pregunta 1.

En muestras de sangre periférica de sujetos adultos menores de 45 años de edad.

a) ¿Cuál es la asociación entre la presencia del polimorfismo Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI y la presencia de IC?

Pregunta 2.

a) ¿Cuál es la asociación entre la presencia del polimorfismo Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI y la presencia de IM?

6. HIPÓTESIS

1. Los genotipos de riesgo (Ile325Ile o Thr147Thr) de los polimorfismos Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI confieren individualmente un OR de 2.1 (126) y 1.67 (121) respectivamente.
2. Los genotipos de riesgo (Ile325Ile o Thr147Thr) de los polimorfismos Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI confieren un OR de 2 (126, 133) de manera individual cada uno.

7. OBJETIVOS

GENERALES:

1) Determinar la asociación de los polimorfismos propuestos (Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI) en los pacientes sanos en comparación con portadores de IC (≤ 45 años de edad) ajustados por edad y sexo.

2) Determinar la asociación de los polimorfismos propuestos (Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI) en los pacientes sanos en comparación con portadores de IM (≤ 45 años de edad) ajustados por edad y sexo.

ESPECIFICOS:

1) Determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos Thr325Ile y Thr147Ile en el gen del TAFI en los dos grupos (IC e IM) de pacientes controles sanos menores de 45 años.

2) Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo Thr325Ile y Thr147Ile en el gen del TAFI en los casos (IC e IM).

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1.- LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO.

El procesamiento de las muestras se realizó en la UIMTHA del Hospital "Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro", del Instituto Mexicano del Seguro Social, en la Ciudad de México.

8.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio de casos y controles de grupos independientes.

Por la maniobra del investigador: Observacional, analítico

Por el número de mediciones: Transversal

Por la recolección de datos: Retroprolectivo

Por la dirección: Retrospectivo

Por el diseño: Casos y controles pareado

8.3.- DISEÑO DE LA MUESTRA

8.3.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Debido a que la UIMTHA del Hospital "Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro", del Instituto Mexicano del Seguro Social es una Unidad de Investigación Médica dedicada al estudio del paciente con enfermedad aterotrombótica contamos con una base de datos y biobanco de pacientes que han sido referidos a la unidad con diagnóstico de IC e IM con una edad ≤ 45 años y que participarán previamente en estudios aceptados por la Comisión local de Investigación para determinar otros polimorfismos genéticos (PAI – 1, ENOS, MTHFR, Factores de coagulación entre otros) y que aún se conserva el resto de estas muestras de sangre periférica en refrigeración a -80°C (debidamente etiquetadas y con número de folio) así como sus características clínicas y demográficas en la base de datos (formato Excel Microsoft®) de la unidad con la correspondiente confidencialidad y acceso exclusivo al tutor responsable, por lo que no fueron molestados para el procesamiento de sus muestras en este estudio. Sin embargo para completar el tamaño de muestra se invitó a los pacientes que acudieron a la UIMTHA para continuar con protocolo diagnóstico así como a evaluar su

terapia con antiagregantes plaquetarios, a participar en el protocolo y de aceptarse les citó en día (miércoles o viernes del 1ro de Junio 2017 al 30 de junio del 2018) y hora determinada (de 8:00 a 11:30 am) para toma de muestra y explicación en extenso del protocolo así como firma de carta de consentimiento informado, siempre y cuando cumplieran con los criterios de selección.

8.3.2. GRUPOS DE ESTUDIO:

1. Criterio de selección general para todos los pacientes participantes: Que cumplan los criterios para población mestiza-mexicana (138)

A) Sujetos mexicanos ≤ 45 años con diagnóstico de IC

B) Sujetos mexicanos ≤ 45 años con diagnóstico de IM

C) Controles sanos. Sujetos sanos mayores de 18 y ≤ 45 años de edad.

- DEFINICIÓN DE CASOS:

1. **CASO INFARTO CEREBRAL.** Paciente con primer evento de IC, con diagnóstico clínico, tomográfico y/o de resonancia magnética, diagnosticado por un especialista en neurología del departamento de Neurología del CMN SXXI, o bien del HGR1 del IMSS.

2. **CASO INFARTO DE MIOCARDIO.** Paciente con primer evento de IM por diagnóstico clínico, electrocardiográfico y por laboratorio de IMCEST, diagnosticados por médico especialista en cardiología en el Hospital de cardiología del CMN SXXI o bien en el HGR 1 del IMSS.

8.3.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE MUESTRAS DE CASOS IC:

CRITERIOS GENERALES

1.- Muestras de sangre periférica de sujetos de ambos sexos con las siguientes características:

1.1.- Sujetos mayores de 18 y ≤ 45 años de edad

1.2.- Sujetos con primer evento de IC, con diagnóstico clínico, tomográfico y/o de resonancia magnética de IC, diagnosticados por un especialista del departamento de Neurología del CMN SXXI ó del departamento de Neurología del HGR # 1 Carlos Mac Gregor Sanchez Navarro del IMSS.

CRITERIOS PARA MUESTRAS RETROLECTIVAS

1.- Muestras en refrigeración en biobanco de sangre periférica pertenecientes a la UIMTHA del HGR 1 IMSS de pacientes con IC que se tomaron en las fechas de Marzo del 2012 hasta el 31 de Mayo del 2017 y que continuen en condiciones adecuadas para su procesamiento y se cuente además con la información completa en la base de datos.

2.- Sujetos que aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado en protocolos de investigación previamente aceptados por la Comisión local de Investigación para determinar otros polimorfismos genéticos (PAI – 1, ENOS, MTHFR, Factores de coagulación entre otros).

CRITERIOS PARA MUESTRAS PROLECTIVAS

1.- Muestras de pacientes enviados a la UIMTHA del HGR 1 IMSS, provenientes de la misma unidad o de cualquiera de los hospitales de CMN SXXI para continuar protocolo de extensión de estudio y que se tomó muestra de sangre periférica en las fechas de Marzo del 2012 hasta Junio 2018.

2.- Pacientes que acudieron con resumen completo que se requiere para completar la información clínica de este protocolo de estudio.

7.- Sujetos que aceptaron participar, leyendo y firmando el consentimiento informado de este protocolo de investigación.

8.3.2.2.CRITERIOS DE INCLUSIÓN E MUESTRAS DE CASOS IM:

CRITERIOS GENERALES

1.- Muestras de sangre periférica de sujetos de ambos sexos con las siguientes características:

1.1.- Mayores de 18 y ≤ 45 años de edad.

1.2.- Sujetos con primer evento de IM por diagnóstico clínico, electrocardiográfico y por laboratorio de IMCEST, diagnosticados por médico especialista en cardiología.

CRITERIOS PARA MUESTRAS RETROLECTIVAS

1.- Muestras en refrigeración en biobanco de sangre periférica pertenecientes a la UIMTHA del HGR 1 IMSS de pacientes con IM que se tomaron en las fechas de Marzo del 2012 hasta el 31 de Mayo 2017 y que continuen en condiciones

adecuadas para su procesamiento y se cuente además con la información completa en la base de datos.

2.- Sujetos que aceptarán participar y firmarán el consentimiento informado en protocolos de investigación previamente aceptados por la Comisión local de Investigación para determinar otros polimorfismos genéticos (PAI – 1, ENOS, MTHFR, Factores de coagulación entre otros).

CRITERIOS PARA MUESTRAS PROLECTIVAS

1.- Muestras de pacientes enviados a la UIMTHA del HGR 1 IMSS, provenientes de la misma unidad o de cualquiera de los hospitales de CMN SXXI para continuar protocolo de extensión de estudio y que se tomó muestra de sangre periférica en las fechas de Marzo del 2012 hasta Junio 2018.

2.- Pacientes que acudan con resumen completo que se requiere para completar la información clínica de este protocolo de estudio.

7.- Sujetos que aceptaron participar leyendo y firmando el consentimiento informado de este protocolo de investigación.

8.3.2.3. CRITERIOS DE INCLUSOS DE MUESTRAS DE AMBOS GRUPOS CONTROLES

1.- Pacientes de ambos sexos.

2.- Mayores de 18 y ≤ 45 años de edad.

3.- Pacientes que acudieron al banco de sangre del HGR 1 como donadores en el período del primero de Marzo del 2012 al 30 de Junio del 2013.

4.- Sujetos que aceptarán participar en el protocolo de estudio y que firmaron el consentimiento informado debido a su participaron en protocolos de estudio aceptados por la Comisión local de Investigación para determinar otros polimorfismos genéticos (PAI – 1, ENOS, MTHFR, Factores de coagulación entre otros).

8.3.2.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y NO INCLUSIÓN PARA EL GRUPO CONTROL

- Diagnóstico de algún proceso patológico después de haber sido incluidos en el estudio (clínicamente o por laboratorio).
- Que usen terapia anticoagulante.

- Que no cuente con el etiquetado correcto y/o no se pueda verificar su folio correspondiente.
- Que no se cuente con las variables necesarias para este protocolo de investigación en la base de datos de la unidad.
- Que no se encuentre en condiciones para llevar a cabo su procesamiento ya sea por alteraciones en la conservación o por ser una muestra insuficiente.

8.3.2.5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN Y NO INCLUSIÓN PARA PACIENTES CON IC ó IM

CRITERIOS GENERALES

- Diagnóstico de algún proceso como:
 - Portadores de trombofilia congénita o adquirida.
 - Portadores de cardiomiopatía congénita o adquirida.
 - Portadores de valvulopatía cardiaca.
 - Portadores de arritmias cardiacas (En el caso de IC)
 - Portadores de anemia de células falciformes, policitemia vera, trombocitemia esencial, hiperglobulinemia.
 - Portadores de cáncer.
- Que usen terapia anticoagulante

CRITERIOS PARA MUESTRAS RETROLECTIVAS

- Que no cuente con el etiquetado correcto y/o no se pueda verificar su folio correspondiente.
- Que no se cuente con las variables necesarias para este estudio en la base de datos de la unidad.
- Que no se encuentre en condiciones para llevar a cabo su procesamiento ya sea por alteraciones en la conservación o por ser una muestra insuficiente.

CRITERIOS PARA MUESTRAS PROLECTIVAS

- Que no acepten participar en el estudio.
- Que se encuentren sin conclusión diagnostica por estudios incompletos en el momento de su participación en el estudio (Descrito en el resumen de envío)

- Que no lleven consigo el resumen de envió con la información clínica necesaria así como reporte de estudios de imagen y laboratorio.
- Diagnóstico de algún proceso patológico después de haber sido incluidos en el estudio (clínicamente o por laboratorio), como los comentados en los criterios generales de exclusión
- Que tengan historia de eventos previos de IM o IC, anterior al evento por el que acuden en la actualidad.

8.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

8.4.1 PARA GRUPO Y CONTROL DE IC.

Se calculó el tamaño de la muestra en base a lo demostrado en otras poblaciones y de acuerdo a los OR reportados para la presencia del polimorfismo Ala147Thr y el Thr 325 Ile del gen del TAFI entre enfermos y sanos. Se utilizó el sistema *Quanto*, para cálculos de tamaño de muestra en estudios de polimorfismos genéticos, basándonos en los OR de los estudios previamente realizados en otras poblaciones y la prevalencia del evento. Se consideró un valor alfa de 0.05 y un poder estimado a priori de 0.80 (beta 0.20). Para el polimorfismo Ala147Thr en IC se obtuvo un tamaño de muestra requerido de 66 pacientes y para Thr325Ile en IC 192 pacientes.

Ala147Thr en IC (126)

Diseño: Casos y controles pareados	Hipótesis: Interacción Gen - ambiente
Poder 0.80	Significancia: 0.050, Dos colas
Modo de herencia: Log- additive	Frecuencia alélica: 0.2600
Prevalencia: 0.0050	
Modelo de enfermedad:	
P ₀ : 0.00074	K _P : 0.000123
R _G : 2.1200	*R _G : 2.1200
R _E : 1.0000	*R _E : 1.0000
R _{GE} : 1.0000	(* Indica valores calculados)
Total: 66 pacientes.	

Thr325Ile en IC (121)

Diseño: Casos y controles pareados	Hipótesis: Interacción Gen - ambiente
Poder 0.80	Significancia: 0.050, Dos colas
Modo de herencia: Log- additive	Frecuencia alélica: 0.1600
Prevalencia: 0.0050	
Modelo de enfermedad:	

8.5. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTES

Presencia de Infarto Cerebral

- a). Enfermedad Vascul ar Cerebral isquemica.
- b). Definición conceptual. Presencia de un déficit neurológico clínico asociado a la evidencia de una zona isquémica en el sistema nervioso central mediante una TAC o IRM de encéfalo.
- c). Definición operacional. Presencia de una zona de necrosis en cualquier zona del sistema nervioso central evidenciada por un estudio de imagen (TAC de craneo: Imagen hipodensa en un territorio vascular cerebral con o sin zonas de transformación hemorrágica; IRM de encefalo: Zona hiperintensa en T2, FLAIR o difusión, e hipointensa en T1 en un territorio vascular o zonas limitrofes que compartan 2 territorios vasculares con o sin transformación hemorrágica), asociado síntomas súbitos de deficit neurológico compatible con un territorio cerebrovascular.
- d). Tipo de variable. Cualitativa.
- e). Escala de medición. Dicotómica. Si /No

Presencia de Infarto de Miocardio

- a) Definición Conceptual: Muerte celular de las miofibrillas causada por falta de aporte sanguíneo a una zona del corazón.
- b) Definición operacional: Presencia de al menos 2 de los siguientes criterios:
 - 1) Dolor torácico sugestivo de isquemia, 2) Cambios electrocardiográficos característicos (ver criterios de inclusión), 3) Incremento en los biomarcadores de necrosis miocárdica (ver criterios de inclusión).
- c) Categoría: Cualitativa
- d) Escala de medición: Nominal
- e) Unidad de Medición. Dicotómica. Si/No

VARIABLE INDEPENDIENTE

1. Presencia del polimorfismo Ala 147 Thr en el gen del TAFI

a) Definición Conceptual: Variación en la secuencia de ADN en el gen del TAFI, el cual consiste en un cambio de un nucleótido de guanina por citocina el cual produce un cambio de un aminoácido de treonina por uno de alanina en la posición 147 de la molécula.

b) Definición Operacional: es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por un cambio de un aminoácido de treonina por uno de alanina en la posición 147 de la proteína.

c) Tipo de Variable: Cualitativa

d) Escala de Medición: Nominal, Dicotómica

e) Unidades de Medición: Si (Presencia de Homocigoto Thr/Thr) No (Presencia de homocigoto Ala/Ala o heterocigoto Thr/Ala)

2. Presencia del polimorfismo Thr 325 Ile en el gen TAFI

a) Definición Conceptual: Variación en la secuencia de ADN en el gen del TAFI, el cual consiste en un cambio de un nucleótido de citocina por timina el cual produce un cambio de un aminoácido de Treonina por uno de Isoleucina en la posición 325 de la molécula.

b) Definición Operacional: es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por un cambio de un aminoácido de Treonina por uno de Isoleucina en la posición 325 de la proteína.

c) Tipo de Variable: Cualitativa

d) Escala de Medición: Nominal, Dicotómica

e) Unidades de Medición: Si (Presencia de Homocigoto Ile/Ile) No (Presencia de homocigoto Thr/Thr ó heterocigoto Thr/Ile)

VARIABLES CONFUSORAS

Hipertensión arterial sistémica

a) Definición Conceptual: Elevación de la tensión arterial sistólica >de 140 mmHg o de la tensión arterial diastólica >90 mmHg en mediciones repetidas sin asociación a factores farmacológicos o tóxicos.

b) Definición Operacional: Es la presencia de diagnóstico previo de cifras de tensión sistólica ≥ 140 mmHg o diastólica ≥ 90 mmHg en ≥ 2 mediciones repetidas o bien cifras de tensión arterial normales pero bajo efecto de tratamiento antihipertensivo. Realizado por un médico.

c) Tipo de Variable: Cualitativa

d) Escala de Medición: Nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: si/no

Diabetes Mellitus tipo 2

a) Definición Conceptual: elevación de la glucosa sérica igual o mayor de 126 mg/dl en ayuno al menos 6 horas, o bien 200 mg/dl o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas.

b) Definición Operacional: Glicemia igual o mayor de 126 mg/dl en ayuno de al menos 6 horas, o bien 200 mg/dl o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas, o bien cifras normales de glucemia bajo tratamiento hipoglucemiante.

c) Tipo de Variable: Cualitativa

d) Escala de Medición: Nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Si/No

Dislipidemia

a) Definición Conceptual: estado de desequilibrio caracterizado por un aumento en la concentración de una, de varias o todas de las fracciones lipídicas del plasma

b) Definición Operacional: Historia de cifras de Colesterol ≥ 200 mg/dl y triglicéridos igual o mayores a 180 mg/dl.

c) Tipo de Variable: Cualitativa

d) Escala de Medición: Nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Si/No

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: Fuma o no fuma actualmente.
- c) Tipo de Variable: Cualitativa
- d) Escala de Medición: Nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: Si/No

Obesidad

- a) Definición Conceptual: Peso corporal secundario al acúmulo de tejido adiposo que confiere un índice de masa corporal $>30\text{m}^2/\text{Kg}$.
- b) Definición Operacional: estado de desequilibrio entre el aporte y la demanda de la alimentación.
- c) Tipo de Variable: Cualitativa
- d) Escala de Medición: Nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: Si/No

Antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombotica (EAT)

- a) Definición Conceptual: EVC o IM presentado en familiares cercanos como padres o hermanos con la posibilidad de transmisión por herencia.
- b) Definición Operacional: Antecedente de EVC o IM en familiares de primera línea antes de los 55 años de edad en hombres y antes de los 65 en mujeres.
- c) Tipo de Variable: cualitativa
- d) Escala de Medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: Si/No

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Con relación a los aspectos éticos, a todos los pacientes se les otorgó la hoja de consentimiento informado, corroborando su adecuado entendimiento y contestando a sus preguntas. El estudio de investigación se basa y cumple con los lineamientos de 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, con su última modificación en la 64ª asamblea en Fortaleza Brasil, 2013. Los datos personales y los resultados de los participantes son estrictamente confidenciales. Se explicó a cada uno de los participantes en forma detallada, el objetivo del estudio y lo que consiste el procedimiento de manera que no afecta o modifica su tratamiento en caso de no aceptar su inclusión. Se les dio a leer y firmar carta de consentimiento informado previa inclusión en el protocolo a cada uno de los participantes.

Procedimientos. Toma de muestra sanguínea 15 ml de sangre total (4 ml en un tubo conteniendo el anticoagulante EDTA y dos tubos de 3 ml en un tubo conteniendo como anticoagulante citrato), los cuales fueron utilizados para la extracción de ADN y la determinación de TAFI plasmático.

Posibles riesgos y molestias. El único procedimiento a realizar fue la obtención de sangre periférica mediante punción de una vena antecubital superficial, y el riesgo del estudio se consideró como mínimo de acuerdo a la ley general de salud.

Beneficios al término del estudio. El paciente no recibió beneficio directo, sin embargo se explicó a los participantes que los resultados obtenidos contribuirán a un mejor entendimiento relacionado con el desarrollo de la enfermedad.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento. Debido a que es un estudio exploratorio y no recibe un beneficio directo el paciente y el médico no serán informados en relación a los resultados obtenidos.

En relación a posibles alternativas de tratamiento consideramos que en este apartado no aplica debido al tipo de estudio.

Participación o retiro. En caso de negarse a participar o de retiro, dicha decisión no repercutirá en lo absoluto en su tratamiento y asistencia médica.

Confidencialidad: La identidad de los sujetos se resguardó mediante la asignación de un número de folio que impide ligar los datos con los participantes. Los participantes no se contactarán por ningún otro motivo. Los datos confidenciales y personales obtenidos jamás serán expuestos en publicaciones, seminarios o presentaciones académicas o científicas.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentan con medidas de tendencia central y de dispersión de acuerdo a la distribución de los datos. Se calculó el OR con intervalos de Confianza (IC) al 95% para las variables independientes. Las variables categóricas se analizaron con la prueba de chi cuadrada. Para el análisis de variables continuas se usó la prueba de *t* de Student o U de Mann Whitney dependiendo la distribución. El equilibrio de Hardy-Weinberg se determinó con la prueba de chi cuadrada. Se considero con significancia estadística un valor de $p < 0.05$ (dos colas). Finalmente, todas las variables en las que se haya obtenido una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) fueron incluidas en un análisis de regresión logística multivariado, para poder obtener cada uno de los factores o variables que representaron un riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 16: SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

11. RESULTADOS

Grupo de IC.

Se incluyeron 283 sujetos de edad ≤ 45 años de edad con primer evento de IC. Se excluyeron 33 pacientes por presentar: deficiencia de proteína S (n=7), deficiencia de proteína C (n=1), anticuerpos anticardiolipinas (n=15), anticoagulante lúpico (n=6), resistencia adquirida a la proteína C activada (n=4), deficiencia de antitrombina (n=1); y 14 pacientes por una diferente conclusión diagnóstica (hemorragia intracerebral).

La población final analizada estuvo constituida por 250 pacientes ≤ 45 años de edad con IC y 250 controles pareados por edad y sexo. En la tabla 1 se muestran las características clínicas y demográficas del grupo de casos de IC y controles.

En el grupo de los casos, la edad promedio fue de 35.3 ± 6.7 años, predominando el sexo femenino en 59.2% (n=148), con un índice de masa corporal (IMC) promedio de 30.9 ± 2.6 kg/m². Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales en orden de frecuencia fueron: dislipidemia en 43.2% (n=108), tabaquismo en 29.2% (n=75), historia familiar de EAT en 26% (n=65), hipertensión arterial en 16.8% (n=42), y diabetes mellitus tipo 2 en 9.2% (n=23). Existió mayor frecuencia de hipertensión arterial (OR 2.6, CI 95% 1.45 – 4.66 p=0.0013), tabaquismo (OR 2.06, IC 95% 1.34 – 3.15 p<0.001) e historia familiar de EAT (OR 2.15, IC 95% 1.36 – 3.4 p<0.001) en el grupo de casos vs. controles. No existió evidencia de diferencia significativa para la edad, sexo, IMC y diabetes mellitus tipo 2 entre ambos grupos.

En las tablas 2 y 3 se describe la distribución genotípica y frecuencia alélica de los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile en el gen del TAFI respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre la presencia de cualquiera de los dos polimorfismos descritos con la presencia de IC.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de 250 pacientes de edad ≤ 45 años con IC y 250 controles.

Variable	Casos n=250	Controles n=250	Valor de P
Edad, años±DE	35.3±6.7	34.8±4.2	NS
Mujeres, n (%)	148 (59.2)	147 (58.8)	NS
IMC, kg/m ² ±DE	30.9±2.6	29.3±1.7	NS
Dislipidemia, n (%)	108 (43.2)	104 (44.6)	0.70
HAS, n (%)	42 (16.8)	18 (7.2)	0.0013
DM2, n (%)	23 (9.2)	19(7.6)	0.18
Tabaquismo, n (%)	75 (29.2)	43 (17.2)	0.02
AHF de EAT, n (%)	65 (26.0)	35 (14.0)	0.02

IMC=índice de masa corporal; HAS=hipertensión arterial sistémica; DM2=diabetes mellitus tipo 2; AHF de EAT=antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica; NS=no significativa.

Tabla 2. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Ala147Thr en pacientes con IC y controles.

	Casos (n=250)	Controles (n=250)	Valor de P
Genotipo			
Thr/Thr, n (%)	163 (65.2%)	175 (70.0%)	0.20
Thr/Ile, n (%)	75 (30.0%)	67 (26.8%)	
Ile/Ile, n (%)	12 (4.8%)	8 (3.2%)	
Ile/Ile + Thr/Ile vs. Thr/Thr	12 + 75 vs. 163	7 + 67 vs. 175	0.25
Frecuencia alélica			
Thr, n (%)	401 (77.2%)	417 (83.4%)	0.19
Ile, n (%)	99 (22.8%)	83 (16.6%)	

Tabla 3. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Ala147Thr en pacientes con IC y controles.

	Casos (n=250)	Controles (n=250)	Valor de P
Genotipo			
Ala/Ala, n (%)	132 (52.8%)	118 (47.2%)	0.14
Thr/Ala, n (%)	101 (40.4%)	108 (43.2%)	
Thr/Thr, n (%)	17 (6.8%)	24 (9.6%)	
Thr/Thr + Thr/Ala vs. Ala/Ala	17 + 101 vs 132	24 + 108 vs. 118	0.21
Frecuencia alélica			
Ala, n (%)	365 (73.0%)	344 (68.8%)	0.14
Thr, n (%)	135 (27.0%)	156 (31.2%)	

Grupo de IM.

Se incluyeron 255 sujetos de edad ≤ 45 años de edad con primer evento de IM. Se excluyeron 11 pacientes por presentar: expediente incompleto 5, diagnóstico diferente 6, por lo que la población incluida para este protocolo fueron 244 pacientes.

En la tabla 4 se muestran las características clínicas y demográficas del grupo de 244 casos de IM y sus controles. En el grupo de los casos, la edad promedio fue de 41.0 ± 4.7 años, predominando el sexo masculino en 78.9% (n=193), con un IMC promedio de 30.2 ± 3.2 kg/m². Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales en orden de frecuencia fueron: tabaquismo en 75.4% (n=184), dislipidemia en 55.3% (n=135), historia familiar de EAT en 35.2% (n=86), hipertensión arterial en 39.4% (n=96), y diabetes mellitus tipo 2 en 30.7% (n=75). Existió mayor frecuencia de hipertensión arterial (OR 3.12, IC 95% 2.01 – 4.86 p=0.001), diabetes mellitus tipo 2 (OR 2.26, IC 95% 1.43 – 3.58, p=0.001) tabaquismo (OR 6.78, IC 95% 4.47- 10.30, p=0.001) dislipidemia (OR 2.12, IC

95% 1.45 – 3.10) e historia familiar de EAT (OR 3.14, IC 95% 1.98 – 5.01 p=0.001) en el grupo de casos vs. controles. No existió evidencia de diferencia significativa para la edad, sexo, IMC y diabetes mellitus tipo 2 entre ambos grupos. Las tablas 5 y 6 muestran la distribución genotípica y frecuencia alélica de los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile en el gen del TAFI respectivamente para los pacientes con IM y controles. Existió diferencia significativa en la distribución genotípica entre los grupos, (P=0.001). Determinándose una asociación entre la presencia del polimorfismo Thr325Ile (homocigoto Ile/Ile) en el gen del TAFI con la presencia de IM de manera significativa (p < 0.005). Entre los pacientes con IM 65.2% fueron homocigotos para el alelo Thr, 30% para el Thr/Ile y 12% homocigotos para el alelo Ile. En el modelo dominante Ile/Ile + Thr/Ile vs. Thr/Thr (OR 1.62, IC 95% 1.12 – 2.36 P=0.001) demostró mayor asociación en la población con IM que en los controles.

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de 244 pacientes de edad ≤ 45 años con IM y 244 controles.

Variable	Casos (n=244)	Controls (n=244)	OR (95% CI)	P value
Edad, años	41.0 ±4.7	39.2 ±5.0	—	NS
Sexo, n (%)				
Hombre	193(78.9)	194(79.3)	—	NS
Mujer	51(21.1)	50 (20.7)		
IMC, kg/m ²	30.2± 3.2	28.9 ± 4.1	—	NS
DM2, n (%)	75 (30.7)	40 (16.5)	2.26 (1.43-3.58)	0.001 ^b
HAS, n (%)	96 (39.4)	42 (17.2)	3.12 (2.01-4.86)	0.001 ^b
Tabaquismo, n (%)	184 (75.4)	76 (31.0)	6.78(4.47- 10.30)	0.001 ^b
Dislipidemia, n (%)	135 (55.3)	90 (37.2)	2.12(1.45-3.10)	0.001 ^b
Historia familiar de EAT, n (%)	86 (35.2)	36 (14.7)	3.14(1.98-5.01)	0.001 ^b

IMC=índice de masa corporal; HAS=hipertensión arterial sistémica; DM2=diabetes mellitus tipo 2; AHF de EAT=antecedente hereditario de enfermedad aterotrombótica; NS=no significativa.

Tabla 5. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Ala147Thr en pacientes con IM y controles.

	Casos (n=244)	Controles (n=244)	Valor de P
Genotipo			
Ala/Ala, n (%)	112 (45.9%)	120 (49.2%)	0.24
Thr/Ala, n (%)	103 (42.2%)	104 (42.6%)	
Thr/Thr, n (%)	29 (11.9%)	20 (8.2%)	
Thr/Thr + Thr/Ala vs. Ala/Ala	29 + 103 vs 112	20 + 104 vs. 120	0.24
Frecuencia alélica			
Ala, n (%)	327 (67.0%)	344 (70.5%)	0.46
Thr, n (%)	161 (33.0%)	144 (29.5%)	

Tabla 6. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Thr325Ile en pacientes con IM y controles.

	Casos (n=244)	Controles (n=244)	Valor de P
Genotipo			
Thr/Thr, n (%)	144 (59.0%)	171(70.1%)	0.01*
Thr/Ile, n (%)	88 (36.1%)	66 (27%)	
Ile/Ile, n (%)	12 (4.9%)	7 (2.9%)	
Ile/Ile + Thr/Ile vs. Thr/Thr	12 + 88 vs. 144	7 + 66 vs. 171	0.01*
Frecuencia alélica			
Thr, n (%)	376 (77.0%)	408 (83.6%)	0.01*
Ile, n (%)	112 (23.0%)	80 (16.4%)	

Se realizó un análisis multivariado con el desenlace del IM, dado los resultados de la asociación del polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI con esta patología y las variables de peso significativas y avaladas en la literatura, se reportan en la tabla 7, obteniendo un OR de 1.4 (IC 95% 1.03 – 1.82, $p= 0.04$) para el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI.

Tabla 7. Análisis multivariado de regresión logística usando IM como variable dependiente.

Factor de riesgo	OR	IC 95%	Valor de P
Diabetes mellitus 2	2.1	1.67 – 2.56	0.02
Hipertensión	2.8	1.9-3.82	0.01
Tabaquismo	3.10	2.12-4.01	0.01
Dislipidemia	2.2	1.78 – 2.92	0.03
AHF de EAT	2.4	1.64-3.1	0.02
TAFI (Thr325Ile)	1.4	1.03 – 1.82	0.04

EAT=antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica

12. DISCUSIÓN

Con respecto a las características generales que se obtuvo del presente estudio el grupo de pacientes con IC se comportó con una relación 1.3:1 con respecto a la mujer: hombre, que difiere a lo reportado por los grandes estudios descriptivos de IC en jóvenes en donde la relación hombre:mujer se comporta discretamente mayor en hombres (22, 43), sin embargo nuestro protocolo no intenta establecer o compararse con dichos estudios dado que la metodología realizada involucró a pacientes consecutivos que aceptaron participar al protocolo de manera voluntaria, en donde es más frecuente que el sexo femenino continúe el seguimiento y participación en protocolos de investigación. Por otro lado la edad promedio de este grupo se mantuvo en 35.3 ± 6.7 sin una diferencia significativa para el promedio de edad de hombres vs mujeres, y dado que el criterio de inclusión fue menores de 45 años la comparación con otros estudios es incompatible por el hecho que cada autor define sus criterios de inclusión, en donde Puatala J y cols (22) para una cohorte de más de 1000 pacientes considero como criterio de inclusión menores de 50 años, por lo tanto la edad promedio fue superior a la que reportamos en nuestro estudio y esto esta considerado porque en el IC el factor de riesgo de la edad es un factor no modificable por lo que el incremento de dicho factor condiciona incremento proporcional a la incidencia de eventos (22,29).

En el grupo de pacientes con IM el sexo tuvo mayor consistencia con respecto a lo publicado en donde el sexo masculino tiende a ser el que con mayor frecuencia se afecta en esta patología de manera muy significativa (57,58), y con respecto a la edad comparado con el grupo de pacientes con IC tienden a ser un grupo en donde es evidente la diferencia, debido a que el grupo de pacientes con IM tuvo un promedio de edad mayor que el grupo de pacientes con IC, lo cual es producto de los factores de riesgo tradicionales, sustentado en la literatura tienen mayor impacto en las patologías cardíacas vs cerebrovasculares (22, 49,51,54), por tal motivo es plausible que la incidencia en ambos grupos incremente con la edad, sin embargo tiende a inclinarse de manera importante al extremo de mayor edad y como consecuencia los factores de riesgo convencionales para aterosclerosis incrementan también y con ello la exposición temporal que

favorece los fenómenos aterotrombóticos bien definidos y extremadamente asociados en el IM a diferencia del grupo de IC en donde la población se encuentra mas limitada dado la inclusión estricta de pacientes en etiología criptogénica.

Con respecto a los factores de riesgo es evidente que en ambos grupos la prevalencia de dichos factores fue contundente cuando se comparó con los grupos controles en donde fue aun más significativo en el IM comparado con el grupo de IC, y esto lo consideramos puede explicarse por el hecho de que las grandes series de pacientes con estas patologías a pesar de ser jóvenes han demostrado que existe un incremento de la frecuencia de estas patologías consideradas factores de riesgo cardiovasculares y que explican el fenómeno multifactorial, ya que cuando los pacientes presentan 2 más factores de riesgo convencionales la probabilidad de desenlaces cardio cerebrovasculares se incrementa de manera significativa (4,5). Las asociaciones de riesgo de las distintas comorbilidades con el IC y el IM se consideran como hallazgos consistente con la literatura universal, pero en ningún momento puede compararse de manera sustancial con otros estudios dirigidos a evaluar esta condición, debido a que este estudio no pretende establecer de manera primaria dicho peso de los factores de riesgo por lo que su diseño fue establecido de manera específica con un calculo de muestra con el objetivo de determinar la asociación de polimorfismos y eso limita que pueda extrapolarse el riesgo obtenido en la población, siendo los estudios ideales para medir la magnitud de este riesgo los estudio de cohorte.

Un dato importante que comentar, es que en la totalidad de la población estudiada, el elevado IMC que denota sobrepeso u obesidad fúe un comportamiento promedio de la totalidad de la población estudiada, dato que debemos considerar es consistente con lo establecido en poblaciones mexicanas en donde debido a los factores dietéticos y la alta prevalencia de sedentarismo ha orillado a nuestra población a un incremento de peso de manera importante con respecto a la altura, lo que resulta en rangos de anormalidad, por lo que por ser un estudio de casos y controles debemos tomarlo con mesura ya que el análisis ideal será evaluar de manera prospectiva a grupos de riesgo que compartán este factor de riesgo.

En el presente estudio se analizaron los dos polimorfismos del gen del TAFI que condicionan una función patológica del sistema fibrinolítico.

El incremento del TAFI se ha asociado al aumento del riesgo y severidad de ambos subtipos de trombosis arterial (123-128). Sin embargo la participación de los polimorfismos Thr325Ile y Ala147Thr en el gen del TAFI con el incremento del riesgo cardiovascular no ha sido concluyente (121). En este estudio los polimorfismos mencionados no se asociaron con la presencia de IC en adultos \leq 45 años, cuando fueron pareados por edad y sexo con el grupo control. Resultados similares han sido reportados (sin incluir población hispana o americana) con diferentes criterios de selección, Ladenvall y cols (123) estudiaron 600 sujetos suecos consecutivos, menores de 70 años de edad, de raza blanca con primer IC o recurrente, sin evidenciar asociación; en población japonesa Akatsu y cols (118) estudiaron adultos mayores (edad promedio de 82 años) sin determinar asociación con los polimorfismos del TAFI; y en población caucásica del norte de europa, Leebeek y cols (128) estudiaron 124 sujetos con edad promedio de 56 años describiendo nula asociación entre los polimorfismos y la presencia del IC. Pero, por otro lado Kozian y cols, en el estudio LURIC (126) demostró una asociación del polimorfismo para el alelo mutante Thr325Ile (Ile/Ile) en el gen del TAFI con el IC prematuro (OR 1.67 IC95% 1.15 – 2.43, $p=0.0075$), pero no para el polimorfismos Ala147Thr en le gen del TAFI. A diferencia de un estudio realizado en la población China en 98 sujetos con IC y 100 controles, determinando una asociación positiva con el alelo mutante (Ile/Ile), con un OR de 4.17 (IC95% 2.12 – 8.22) (121).

En el caso de los polimorfismos del gen del TAFI y el riesgo de IM en el presente estudio el polimorfismo Ala147Thr en el gen del TAFI no tuvo asociación con la presencia de IM en adultos \leq 45 años; en cambio, el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI se asocio con la presencia de IM en adultos \leq 45 años, similar a los reportado en población egipcia por Kamal H y cols (133) quienes estudiaron 46 sujetos con IM con edad promedio de 55 años, atribuyendose riesgo a los portadores del polimorfismo Thr325Ile en el alelo Ile (Frecuencia alélica T) (OR de 3.26 IC95% 1.82 – 5.83, $p= 0.0001$). En el estudio LURIC, Kozian y cols (126)

describieron también una asociación entre dicho polimorfismo y el desarrollo de IM (OR 1.86 IC95% 1.01-3.27, $p=0.031$). Con resultados similares en población española, donde evaluaron 53 pacientes con IM y 53 controles, con asociación del portador del genotipo homocigoto del alelo mutante (Ile/Ile) del polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI e IM (OR 5.71 IC95% 2.23 – 14.62) (131). A diferencia de lo reportado en el estudio PRIME (116) realizado en población francesa, donde el TAFI se asoció al riesgo de desarrollar angina de pecho en comparación con el grupo control. Contradictorio a nuestros resultados en este estudio el polimorfismo Ala147Thr en el gen del TAFI fue el asociado (homocigoto Thr), considerándose un marcador de riesgo en esa población (RR 2.7 IC 95% 1.2 – 5.8) .

Por otro lado Xu CW y cols (99) reportaron en población asiática nula asociación entre los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile en el gen del TAFI y la enfermedad coronaria; de la misma manera Zorio E y cols (130) en población española no encontraron asociación con el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI y la presencia IM. A diferencia de lo observado por De Bruijne y cols (134) en población holandesa, en donde determinaron que el polimorfismo Thr325Ile del gen del TAFI se asoció con menores cifras de este último y además con menor riesgo de IM.

Nuestros resultados no son del todo comparables con muchos publicados, debido a que en primer lugar nuestros criterios de selección fueron estrictamente definidos para evitar la exposición a los factores de riesgo tradicionales, otorgándole mayor peso a los factores genéticos que juegan un papel importante en el desarrollo de los eventos trombóticos y sustentando en que en la población hispana la información es insuficiente con respecto a este tipo de estudios.

Nuestros resultados son concordantes con el polimorfismo Thr325Ile en el gen del TAFI y su asociación con el IM, con un comportamiento similar y constante en diferentes poblaciones.

Hasta el día de hoy este estudio complementa los resultados de estudios de riesgo genético en el comportamiento de estas dos subformas de trombosis arterial, donde a pesar de ser territorios que comparten factores de riesgo y estrategias de tratamiento preventivas, existe un espectro de predisposición genética diferente (Figura 1).

13. CONCLUSIÓN

Hasta el día de hoy sabemos que el TAFI puede tener implicaciones en los diferentes subtipos de trombosis arterial, considerándose marcador no solo en la fibrinólisis sino también de inflamación (139) tanto así que en estudios dinámicos del flujo en vasos coronarios el incremento de sus niveles antigénicos tiene un rol crucial en fenómenos de aterosclerosis prematura, inflamación, agregación plaquetaria, entre otros (140), por lo cual ya diferentes autores los han considerado como parte del proceso de modulación de aterosclerosis (141) (142) siendo asociado con diferentes factores de riesgo metabólico (143), lo que a diferencia del proceso fisiopatológico del IC, en el que participan posiblemente mas factores propiamente vasculares aparentemente el componente aterosclerótico no tiene el mismo impacto que en el IM; sin embargo es evidente que diversos estudios han relacionado el incremento del TAFI con el IC por lo que este estudio declina a descartar que la parte genética en el incremento del TAFI este relacionada y no orilla a pensar que esta disregulación posiblemente se explique por otra vía de interacción con TAFI.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

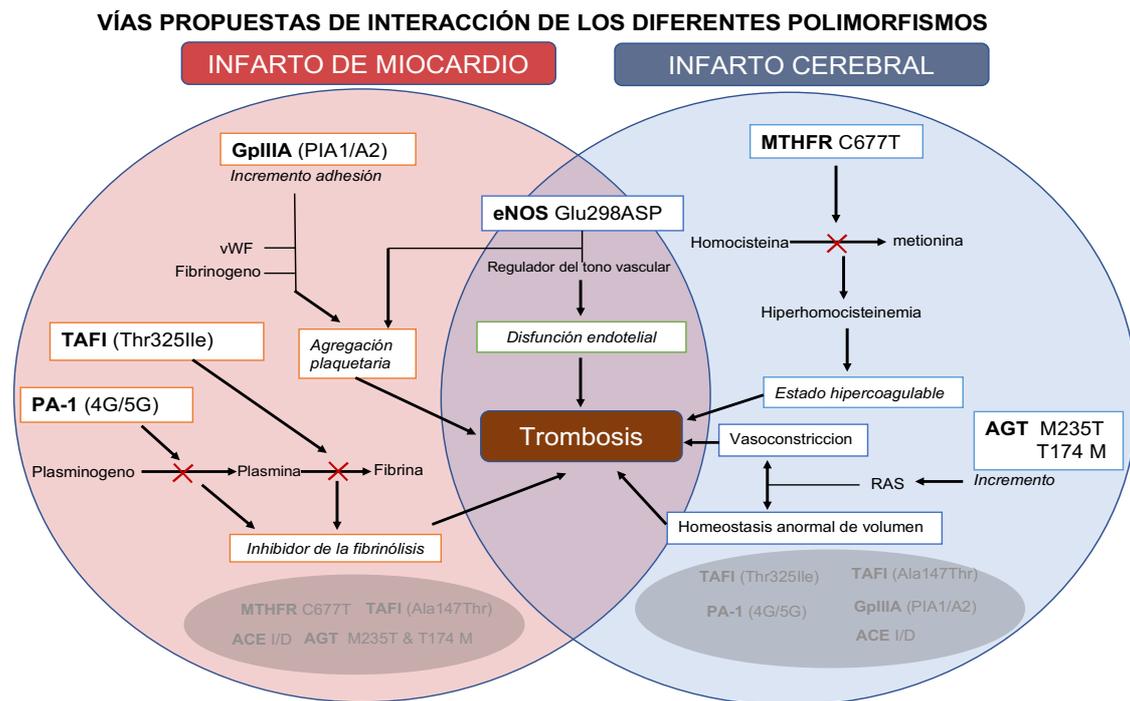
Hay ciertas limitaciones del presenta estudio que deben ser reconocidas. Primero, los estudios de casos y controles involucran solo el estudio de casos sobrevivientes, lo que evita que el espectro completo de la enfermedad sea estudiado. Segundo, la falta de medición de TAFIa que daría lugar a la evaluación del genotipo al fenotipo no fue realizado por razones de factibilidad de la prueba y el diseño temporal del estudio (retrospectivo) (144,145). Tercero, el análisis de asociación de los SNP en ningún momento es un intento de establecer causalidad, dado el aspecto multifactorial de estos padecimientos en la población.

Otra limitación importante se dio en la selección de los sujetos controles en los cuales por cuestiones de factibilidad nos fue imposible estudiar a fondo con el objetivo de descartar una patología cardiovascular (EKG, Ecocardiograma, entre otros) y cerebrovascular (Estudio de neuroimagen) previa, situación que comprendemos le da menor validez a la selección de nuestro controles.

Conflicto de interés

Los autores del presente trabajo se desligan de cualquier conflicto de interés existente.

Figura 1. Propuesta de interacción de los diferentes polimorfismos asociados y no asociados con IM e IC en población mexico-meztizo de >45 años de edad.



Los polimorfismos: GP IIIA (PIA1/A2), glucoproteína plaquetaria, PAI-1 (4G/5G), Inhibidos del activador del plasminogeno, TAFI (Ala147Thr, Thr325Ile), Inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina, eNOS (Glu298Asp), sintasa endotelial de óxido nítrico, MTHFR (C677T), metiltetrahidofolato reductasa, AGT (M235T, T174M), angiotensinogeno, ACE (I/D) Enzima convertidora de angiotensina RAS, Sistema renina-angiotensina, vWF, Factor de Von Willebrand. Los polimorfismos en gris y abajo no están asociados con IM y/o IC

14. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fuster V. Epidemic of cardiovascular disease and stroke: the three main challenges. *Circulation* 1999; 99: 1132–37.
2. Murray CJL, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease study. *Lancet* 1997; 349: 1269–76.
3. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, et al. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001; 104: 2855–64
4. Rothwell, et al. Oxford Vascular Study. *Lancet* 2004, 5. Cantú-Brito C, Chiquete E, Ruiz-Sandoval JL, Gaxiola E, Albuquerque DC, Corbalan R, Ramos A, Bhatt DL, Steg PG; Group RLaC. Atherothrombotic disease, traditional risk factors, and 4-year mortality in a Latin American population: the REACH registry. *Clin Cardiol.* 2012;35:451–457
5. Cantú-Brito C, Chiquete E, Ruiz-Sandoval JL, Gaxiola E, Albuquerque DC, Corbalan R, Ramos A, Bhatt DL, Steg PG; Group RLaC. Atherothrombotic disease, traditional risk factors, and 4-year mortality in a Latin American population: the REACH registry. *Clin Cardiol.* 2012;35:451–457
6. Hankey GJ. Stroke. *Lancet* 2017. Feb 11;389 (10069): 641- 654
7. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133(4):e38-e60.
8. Cantu-Brito C, Majersik JJ, Sánchez BN, et al. Hospitalized Stroke Surveillance in the Community of Durango, Mexico – the Brain Attack Surveillance in Durango (BASID) Study. *Stroke.* 2010; 41:878–84.
9. Cantú-Brito C, Ruiz-Sandoval JL, Chiquete E, Arauz A, León-Jiménez C, Murillo-Bonilla LM, Villarreal-Careaga J, Barinagarrementería F, Fernández JA, Torres B, Rodríguez-Leyva I, Rangel-Guerra R. Factores de riesgo, causas y pronóstico de los tipos de enfermedad vascular cerebral en México: Estudio RENAMEVASC. *Rev Mex Neuroci* 2011; 12 (5)

10. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet* 1991; 337: 1521–26.
11. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993; **24**: 35–41.
12. Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Wolf ME, Hennerici MG. The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovasc Dis* 2013; **36**: 1–5.
13. Ferro JM, Massaro AR, Mas J-L. Aetiological diagnosis of ischaemic stroke in young adults. *Lancet Neurol* 2010; 9: 1085–96
14. Saver JL. CLINICAL PRACTICE. Cryptogenic stroke. *N Engl J Med*. 2016 May 26;374 (21):2065-74
15. Hart RG, Catanese L, Perera KS, Ntaios G, Conolly SJ. Embolic Stroke of Undetermined Source: A Systematic Review and Clinical Update
16. Coutunho JM, Derkatch S, Potvin AR, Tomlinson G, Kiehl TR, Silver FL, Mandell DM. Nonstenotic carotid plaque on CT angiography in patients with cryptogenic stroke. *Neurology*. 2016 Aug 16; 87 (7):665-72.
17. Cantú-Brito C, Ruíz-Sandoval JL, Murillo-Bonilla LM, Chuiquete E, León-Jiménez C, Arauz A, et al. Acute care and one-year outcome of Mexican patients with first-ever acute ischaemic stroke: the PREMIER study. *Rev Neurol* 2010;51 (11): 641-649.
18. Varona JF. Long-Term Prognosis of Ischemic Stroke in Young Adults. *Stroke Research and Treatment*. Volume 2011, Article ID 879817, 1-5p
19. Griffiths D, Sturm J. Epidemiology and Etiology of Young Stroke. *Stroke Research and Treatment* Volume 2011, Article ID 209370, 1-9.
20. Luji Y F. Ischemic stroke in young adults: an overview of etiological aspects. *Arq Neuropsiquiatr* 2012;70(6):462-466.
21. Sturm W, Mackay M, and Thrift AG, “Stroke among women, ethnic groups, young adults and children,” in *Handbook of Clinical Neurology*, M. Fisher, Ed., vol. 92, Elsevier, New York, NY, USA, 2009.

22. Putaala J, Metso AJ, Metso TM, et al. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15 to 49 with first-ever ischemic stroke: the Helsinki young stroke registry. *Stroke* 2009; 40: 1195–203)
23. Love BB, Biller J, Jones MP, Adams HP Jr, Bruno A. Cigarette smoking. A risk factor for cerebral infarction in young adults. *Arch Neurol* 1990; 47: 693–98.
24. Schurks M, Rist PM, Bigal ME, Buring JE, Lipton RB, Kurth T. Migraine and cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2009; 339: b3914
25. Sharshar T, Lamy C, Mas JL. Incidence and causes of strokes associated with pregnancy and puerperium. A study in public hospitals of Ile de France. *Stroke in Pregnancy Study Group. Stroke* 1995; 26: 930–36.
26. Helms AK, Kittner SJ. Pregnancy and Stroke. *CNS Spectr* 2005; 10: 580–87. 22 Mas JL, Lamy C. Stroke in pregnancy and the puerperium. *J Neurol* 1998; 245: 305–13.)
27. Chakhtoura Z, Canonico M, Gompel A, Thalabard JC, Scarabin PY, Plu-Bureau G. Progestogen-only contraceptives and the risk of stroke: a meta-analysis. *Stroke* 2009; 40: 1059–62.)
28. Varona JF. Diagnostic Work-Up and Etiology in Ischemic Stroke in Young Adults: Before and Now. *J Neurol Neurophysiol* 2012.3:133.
29. Ghandehari K and Moud Z. I, “Incidence and etiology of ischemic stroke in Persian young adults,” *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 113, no. 2, pp. 121–124, 2006
30. Lechat P, Mas JL, Lascault G, et al. Prevalence of patent foramen ovale in patients with stroke. *N Engl J Med* 1988;318:1148-1152
31. Larrue V, Berhoune N, Massabuau P, et al. Etiologic investigation of ischemic stroke in young adults. *Neurology* 2011;76:1983-1988.)
32. Cabanes L, Coste J, Derumeaux G, et al. Patent Foramen Ovale and Atrial Septal Aneurysm Study Group. Interobserver and intraobserver variability in detection of patent foramen ovale and atrial septal aneurysm with transesophageal echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2002; 15: 441–46

33. Huang TY, Tseng HK, Liu CP, Lee CM. Comparison of the clinical manifestations of infective endocarditis between elderly and young patients—a 3-year study. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; 42: 154–59.
34. Nishimura RA, Carabello BA, Faxon DP, et al. ACC/AHA 2008 Guideline update on valvular heart disease: focused update on infective endocarditis: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines endorsed by the Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 676–85.
35. Gegouskov V, Kadner A, Engelberger L, Carrel T, Tevaearai H. Papillary fibroelastoma of the heart. *Heart Surg Forum* 2008; 11: E333–39)
36. Schievink WI. Current concepts: spontaneous dissection of the carotid and vertebral arteries. *N Engl J Med* 2001;344:898-906
37. Lee TH, Hsu WC, Chen CJ, Chen ST. Etiologic study of young ischemic stroke in Taiwan. *Stroke* 2002;33:1950-1955.
38. Tan KS, Tan CT, Churilov L, Mackay M, Donnan GA. Ischaemic stroke in young adults: a comparative study between Malaysia and Australia. *Neurology Asia* 2010;15:1-9.
39. Putaala J, Kurkinen M, Tarvos V, Salonen O, Kaste M, Tatlisumak T. Silent brain infarcts and leukoaraiosis in young adults with first-ever ischemic stroke. *Neurology* 2009; 72: 1823–29.
40. Brey RL. Antiphospholipid antibodies in young adults with stroke. *J Thromb Thrombolysis* 2005;20:105-112
41. Ng KW, Loh PK, Sharma VK. Role of investigating thrombophilic disorders in young stroke. *Stroke Res Treat.* 2011 Feb 8;2011:670138
42. Amarenco P. Underlying pathology of stroke of unknown cause cryptogenic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27 (Suppl 1): 97–103
43. Yesilot Barlas N, Putaala J, Waje-Andreassen U, et al. Etiology of first-ever ischemic stroke in European young adults: the 15 cities young stroke study. *Eur J Neurol* 2013;20:1431-1439.
44. Barinagarrementeria F, Figueroa T, Huebe J, Cantú Cerebral Infarction in People under 40 Years. *Cerebrovasc Dis* 1996;6:75-79

45. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, et al. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med* 2016;4:256.
46. Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin EJ, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2016;133:e38-360
47. García A, Jerjes-Sánchez C, Martínez BP, et al. RENASICA II. Un registro Mexicano de los síndromes coronarios agudos. *Arch Cardiol Mex* 2005; Supl 2: S6-S19
48. Huerta B. Epidemiología de los síndromes conocarios agudos (SICA). *Arch Cardiol Mex* 2007;77:S4, 214-218
49. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovascular Pathol.*2004;13:125-138.
50. Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, Song JA, Kim DH, Lee KH, Yamanaka F, Lee MG, Park KH, Sim DS, Lee SH, Kim HG, Yoon NS, Yoon HJ, Kim KH, Park HW, Kim JH, Ahn Y, Cho JG, Park JC, Kang JC. Impact of diabetes mellitus on plaque vulnerability and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction with plaque rupture. *Int J Cardiol.* 2001;154:197-198.
51. Von Eckardstein A, Schulte H, Assmann G. Increased risk of myocardial infarction in men with both hypertriglyceridemia and elevated HDL cholesterol. *Circulation.* 1999;99:1925
52. Overbaugh KJ. Acute coronary síndrome. *Am J Nurs.* 2009 May;109(5):42-52
53. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. (2012): Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 60: 1581-1598.
54. Schoenenberger AW et al. Acute coronary syndromes in young patients: Presentation, treatment and outcome. *International Journal of Cardiology* 148 (2011) 300–304
55. Doughty M, Mehta R, Bruckman D, Das S, Karavite D, Tsai T, Eagle K. Acute myocardial infarction in the young—The University of Michigan experience. *Am Heart J* 2002;143:56-62.
56. Spatz E, Curry L, Masoudi F, Zhou S, Strait K, Gross C et al. The VIRGO Classification System: A Taxonomy for Young Women with Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2015 Nov 3; 132(18): 1710–1718

57. Choudhury L, Marsh JD. Myocardial infarction in young patients. *Am J Med* 1999;107:254-61; Zimmerman F, Cameron A, Fisher L, et al. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors, and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). *J Am Coll Cardiol* 1995;26:654-61
58. Wolfe MW, Vacek JL. Myocardial infarction in the young. *Chest* 1988;94:926-30.
59. Avezum A, Makdisse M, Spencer F, Gore JM, Fox KA, Montalescot G, et al. Impact of age on management and outcome of acute coronary syndrome: Observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) *Am Heart J*. 2005;149:67-73.
60. Tungsubutra W, Tresukosol D, Buddhari W, Boonsom W, Sanguanwang S, Srichaiveth B, et al. Acute coronary syndrome in young adults: The Thai ACS Registry. *J Med Assoc Thai*. 2007;90:81-90
61. Morillas P, Bertomeu V, Pabón P, Ancillo P, Bermejo J, Fernández C, et al. Characteristics and outcome of acute myocardial infarction in young patients. The PRIAMHO II study. *Cardiology*. 2007;107:217-25
62. Kannel WB, Abbott RD. Incidence and prognosis of unrecognized myocardial infarction. An update on the Framingham study. *N Engl J Med* 1984;311:1144-7
63. McManus DD, Piacentine SM, Lessard D, Gore JM, Yarzebski J, Spencer FA, et al. Thirty-year (1975 to 2005) trends in the incidence rates, clinical features, treatment practices, and short-term outcomes of patients <55 years of age hospitalized with an initial acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2011;108:477-82
64. Fournier JA, Sanchez A, Quero J, Fernandez-Cortacero JA, GonzalezBarrero A. Myocardial infarction in men aged 40 years or less: a prospective clinical-angiographic study. *Clin Cardiol* 1996;19:631-6
65. Loughnan ME, Nicholls N, Tapper NJ. Demographic, seasonal, and spatial differences in acute myocardial infarction admissions to hospital in Melbourne Australia. *Int J Health Geogr* 2008;7:42.
66. Padler FA, Comad AR. Myocardial infarction with normal coronary artery: A case report and review of literature. *Am J Med Sci*. 1997;314:342-5

67. Penny WJ, Colvin BT, Brooks N. Myocardial infarction with normal coronary arteries and factor XII deficiency. *Br Heart J.* 1985;53:230–4
68. Milonig G, Malcolm GT, Wick G. Early inflammatory and immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the pathological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study. *Atherosclerosis.* 2002;160:444–8)
69. Lee BW, Tay JS, Yip WC, Yap HK, Chan KY, Low PS. Kawasaki syndrome in Chinese children. *Ann Trop Pediatric.* 1989;9:147–51.
70. Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, Ng G. Myocardial infarction in Young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). *J Am Coll Cardiol* 1995;26:654–61;
71. Kanitz MG, Giovannucci SJ, Jones JS, Mott M. Myocardial infarction in young adults: risk factors and clinical features. *J Emerg Med* 1996;14:139–45
72. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004;364:937–52
73. Aggarwal A, Aggarwal S, Goel A, Sharma V, Dwivedi S. A retrospective case-control study of modifiable risk factors and cutaneous markers in Indian patients with young coronary artery disease. *JRSM Cardiovasc Dis* 2012;1
74. Wiesbauer F, Blessberger H, Azar D, Goliash G, Wagner O, Gerhold L, et al. Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (< or =40 years of age). *Eur Heart J* 2009;30:1073–9;
75. Hoit BD, Gilpin EA, Henning H, Maisel AA, Dittrich H, Carlisle J, et al. Myocardial infarction in young patients: an analysis by age subsets. *Circulation* 1986;74:712–21.;
76. Zimmerman FH, Cameron A, Fisher LD, Ng G. Myocardial infarction in young adults: angiographic characterization, risk factors and prognosis (Coronary Artery Surgery Study Registry). *J Am Coll Cardiol* 1995;26:654–61.).
77. Hosseini SK, Soleimani A, Karimi AA, Sadeghian S, Darabian S, Abbasi SH, et al. Clinical features, management and in-hospital outcome of ST

- elevation myocardial infarction (STEMI) in young adults under 40 years of age. *Monaldi Arch Chest Dis* 2009;72:71–6.)
78. Chan MY, Woo KS, Wong HB, Chia BL, Sutandar A, Tan HC. Antecedent risk factors and their control in young patients with a first myocardial infarction. *Singapore Med J* 2006;47:27–30
79. Xie CB, Chan MY, Teo SG, Low AF, Tan HC, Lee CH. Acute myocardial infarction in young Asian women: A comparative study on Chinese, Malay and Indian ethnic groups. *Singapore Med J*. 2011;52:835–9
80. Coronary artery surgery study (CASS): a randomized trial of coronary artery bypass surgery. Survival data. *Circulation* 1983;68:939-50.
81. Bhardwaj R, Kandoria A, Sharma R Myocardial infarction in young adults- risk factors and pattern of coronary artery involvement. *Niger Med J*. 2014 Jan-Feb; 55(1): 44–47
82. Holmes Jr DR, White HD, Pieper KS, Ellis SG, Califf RM, Topol EJ. Effect of age on outcome with primary angioplasty versus thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:412–9.)
83. Moccetti T, Malacrida R, Pasotti E, et al. Epidemiologic variables and outcome of 1972 young patients with acute myocardial infarction. Data from the GISSI-2 database. Investigators of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI-2). *Arch Intern Med* 1997;157:865–9.
84. Ahuja YR, Sharma S, Mohan V. Cardiovascular disease: Interplay of epigenetics. *Clin Exp Hypertens*. 2017;39 (1): 1-7.
85. Bersano A, Ballabio E, Bresolin N, Candelise L. Genetic polymorphism for the study of multifactorial stroke. *Hum Mutat*. 2008 Jun;29 (6):776-95
86. Slack J, Evans KA. The increased risk of death from ischemic heart disease in first-degree relatives of 121 men and 96 women with ischemic heart disease. *J Med Genet* 1966; 3: 329-357.
87. Jorde LB, Williams RR. Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variables, *Am J Cardiol* 1988; 62: 708-713.
88. Rissanen AM. Familial occurrence of coronary heart disease: Effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol* 1979; 44: 60-66.

89. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 1999; 340: 1555-1564.
90. Berg K. The genetics of the hyperlipidemias and coronary artery disease. *Prog Clin Biol Res* 1982; 103: 111-125.
91. Choi JC, Lee JS, Kang SY, Kang JH, Bae JM. Family history and risk for ischemic stroke: sibling history is more strongly correlated with the disease than parental history. *J Neurol Sci*. 2009 Sep 15;284 (1-2):29-32.
92. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:216-229
93. George AL. Use of Contemporary Genetics in Cardiovascular Diagnosis. *Circulation*. 2014;130(22):1971-1980.
94. Abecasis GR, Altshuler D, et al. 1000 Genomes Project Consortium, A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467:1061
95. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med*. 2008;2;7-22.
96. Peden JF, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet*. 2011 Oct 15;20 (R2):R198-2015
97. Casas JP, Cooper J, Miller GJ, Hingorani AD, Humphries SE. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. *Ann Hum Genet* 2006 Mar;70 (Pt 2): 145-69.
98. CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large – scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2013 Jan;45(1):25-33.)
99. Xu X, Li J, Sheng W, Liu L. Meta-Analysis of Genetics Studies from Journals Published in China of Ischemic Stroke in the Han Chinese Population. *Cerebrovasc Dis* 2008;26:48-62
100. Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clinica Chimica Acta* (2003): 31-35

101. Isordia-Salas I, Mendoza-Valdez AL, Almeida-Gutierrez E, Borrayo-Sánchez G. Factores genéticos del sistema hemostático en paciente jóvenes con infarto agudo de I miocardio. *Cir Ciruj* 2010;78:93-97
102. Strohman RC. Maneuvering in the complex path genotype to phenotype- *Science*. 2002; 296: 701-703. ****Ahuja YR, Sharma S, Mohan V. Cardiovascular disease: Interplay of epigenetics. *Clin Exp Hypertens*. 2017;39 (1): 1-7.
103. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62:365-372.
104. 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.)
105. Rivera-García BE, Esparza-García JC, Aceves-Chimal JL, Leños-Miranda A, Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. Platelet glycoprotein IIIA PIA1/A2 polymorphism in Young patient with ST elevation myocardial infarction and idiopathic ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* (2013) 284: 163-171)
106. Isordia-Salas I, Trejo-Aguilar A, Valadés-Mejía MG, Santiago-Germán D, Leños-Miranda A, Mendoza-Valdéz L, Jáuregui-Aguilar R, Borrayo-Sánchez G, Majluf-Cruz A. C677T polymorphism of the 5,10 MTHFR gene in young Mexican subjects with ST-elevation myocardial infarction. *Arch Med Res*. 2010;41:246-250.
107. Valades-Mejía MG, Domínguez-López ML, Aceves-Chimal JL, Leños-Miranda A, Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. Estudio de los polimorfismos R353Q en el gen del factor VII de la coagulación y el N700S en el gen de la trombospondina-1 en pacientes jóvenes mexicanos con infarto de miocardio. *Cir Cir* 2014;82:595-606.
108. Isordia-Salas I, Barinagarrementeria-Aldatz F, Leños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G, VelaÓjeda J, García-Chávez J, Ibarra-González I, Majluf-Cruz A. The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gen Is Associated with Idiopathic Ischemic Stroke in the Young

- Mexican-Mestizo Population. *Cerebrovascular Dis* 2010;29:454-459.
109. Esparza-García JC, Santiago-Germán D, Valades-Mejía MG, Hernández-Juárez J, Aguilar-Sosa E, Leaños-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: 310-316.
110. Foley JH, Kim PY, Mutch NJ. *Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. J Thromb Haemost* 2013;11 (Suppl. 1); 306-15.
111. Sanglas L, Valnickova Z, Arolas JL, Pallarés I, Guevara T, Solà M, Kristensen T, Enghild JJ, Aviles FX, Gomis-Rüth FX. *Structure of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, a molecular link between coagulation and fibrinolysis. Mol Cell*. 2008;31:598-606).
112. Bajzar L, Jain N, Wang P, Walker JB. *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. Crit Care Med*. 2004 May;32(5 Suppl):S320-4
113. Mosnier LO, Buijtenhuijs P, Marx PF, Meijers JCM, Bouma BN. *Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. Blood*. 2003;February 20
114. Marx PF, Brondijk THC, Plug T, Romijn RA, Hemrika W, Meijers JCM, Huizinga EG. *Crystal structures of TAFI elucidate the inactivation mechanism of activated TAFI: a novel mechanism for enzyme autoregulation. Blood* 2008; 112: 2803–9.
115. Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, Akhter MS, Yadav BK, Behari M, Saxena R. *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor gene polymorphisms are associated with antigenic levels in the Asian-Indian population but may not be a risk for stroke. Br J Haematol*. 2008;143:581-588.
116. Morange PE, Juhan-Vahue I, Scarabin PY, et al. *Association between TAFI antigen and Ala147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. (The PRIME study). Thromb Haemost* 2003;89(3):554-60.

117. Schroeder V, Chatterjee T, Mehta H, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. *Thromb Haemost* 2002; 88(6):1020-5.
118. Akatsu H, Ishiguro M, Ogawa N, Kanesaka T, Okada N, Yamamoto T, Campbell W, Okada H. Plasma levels of unactivated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) are down-regulated in young adult women: analysis of a normal Japanese population. *Microbiol Immunol*. 2007;51(5):507-517.
119. Verdú J, Marco P, Benlloch S, Lucas J. Association between the Thr325Ile and Ala147Thr polymorphisms of the TAFI gene and the risk of venous thromboembolic disease. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2008;14:494-495.
120. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR, Lisman T. Low thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activity levels are associated with an increased risk of a first myocardial infarction in men. *Haematologica*. 2009;94:811-818.
121. Wang S. W. Zhang H.H. Dong C.Y, Sun H.H. Meta-analysis of TAFI polymorphisms and risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Genet Mol Res* 15 (2):gmr 15026718
122. Zirlik A. TAFI: a promising drug target? *Thromb Haemost*. 2000;91:420-422.
123. Ladenvall C, Gils A, Jood K, Blomstrand C, Declerck PJ, Jern C. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:955-62.
124. Brouns R, Heylen E, Willemse JL, Sheorajpanday R, De Surgeloose D, Verkerk R, De Deyn PP, Hendriks DF. The decrease in procarboxypeptidase U (TAFI) concentration in acute ischemic stroke correlates with stroke severity, evolution and outcome. *J Thromb Haemost*. 2010;8:75-80
125. Brouns R, Heylen E, Sheorajpanday R, Willemse JL, Kunnen J, De Surgeloose D, Hendriks DF, De Deyn PP. Carboxypeptidase U (TAFIa) decreases the efficacy of thrombolytic therapy in ischemic stroke patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111:165-170

126. Kozian DH, Lorenz M, März W, Cousin E, Mace S, Deleuze JF. Association between the Thr325Ile polymorphism of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and stroke in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost.* 2010;103:976-983.
127. Santamaria, A., Oliver, A., Borrell, M., Mateo, J., Belvis, R., Marti-Fabregas, J., Ortin, R., Tirado, I., Souto, J.C. & Fontcuberta, J. (2003) Risk of ischemic stroke associated with functional thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 34, 2387–2391.
128. Leebeek FW, Goor MP, Guimaraes AH, Brouwers GJ, et al. (2005). High functional levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. *J. Thromb. Haemost.* 3: 2211-2218.
129. Biswas A, Tiwari AK, Ranjan R, Meena A, et al. Prothrombotic polymorphisms, mutations, and their association with pediatric non-cardioembolic stroke in Asian-Indian patients. *Ann. Hematol.* (2009) 88: 473-478.
130. Zorio E, Castelló R, Falcó C, España F, Osa A, Almenar L, Aznar J, Estellés A. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. *Br J Haematol.* 2003;122:958-965)
131. González FJ, Caturla JM, Fernández M, Carrasco R, Marco P, Sánchez J, Benlloch S. Prognosis value of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor concentration and C1040T polymorphism in acute myocardial infarction treated with fibrinolysis. *Med Intensiva.* 2010;34:513-522
132. Meltzer ME, Doggen CJ, de Groot PG, Meijers JC, Rosendaal FR, Lisman T. Low thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activity levels are associated with an increased risk of a first myocardial infarction in men. *Haematologica.* 2009;94:811-818.
133. Kamal HM, Ahmed AS, Fawzy MS, Mohamed FA, Elbaz AA. Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor levels and Thr325Ile polymorphism as a risk marker of myocardial infarction in Egyptian patients. *Acta Cardiol.* 2011;66:483-488.

134. Bruijne EL, Gils A, Guimarães AH, Dippel DW, Deckers JW, van den Meiracker AH, Poldermans D, Rijken DC, Declerck PJ, de Maat MP, Leebeek FW. *The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: the ATTAC study. J Thromb Haemost.* 2009;7:919-927.
135. Boffa MB, Nesheim ME, Koschinsky ML. *Thrombin activable fibrinolysis inhibitor (TAFI): molecular genetics of an emerging potential risk factor for thrombotic disorders. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2001;1:59-74
136. Heylen E, Willemse J, Hendriks D. *An update on the role of carboxypeptidase U (TAFIa) in fibrinolysis. Front Biosci.* 2011;17:2427-2450.
137. Tàssies D, Roqué M, Monteagudo J, Martorell T, Sionis A, Arzamendi D, Heras M, Reverter JC. *Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome. Thromb Res.* 2009;124:614-618.
138. Lopez-Beltrán C, Garía V. *Aproximaciones científicas al mestizo mexicano. Hist. Cienc. Saude-Manguinhos vol. 20 No 2. Rio de Janeiro Apr/Jun 2013;1-15*
139. Colucci M, Semeraro N. *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: At the nexus of fibrinolysis and inflammation. Thromb Res [Internet].* 2012;129(3):314–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2011.10.031>
140. Yildirim MN, Selcoki Y, Uysal S, Nacar a B, Demircelik B, Aydin HI, et al. *Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor : Its role in slow coronary flow. Herz [Internet].* 2013;(Aug):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068025>
141. Duff GL, McMillan GC. *of Atherosclerosis.* 2011;42(Oct):3017–21.
142. Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, et al. *Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, a Potential Regulator of Vascular Inflammation. J Biol Chem.* 2003;278(51):51059–67.
143. Hori Y, Gabazza EC, Yano Y, Katsuki A, Suzuki K, Adachi Y, et al. *Insulin resistance is associated with increased circulating level of*

thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(May):660–5.

144. Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem. 2002;277(2):1021–30.*
145. Plug T, Meijers JCM. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J Thromb Haemost. 2016;14(4):633–44.*

ANEXO A

Extracción de la muestra sanguínea: El alumno de maestría y en apoyo con el investigador asociado extraerán de la vena antecubital 15 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 (4 ml), 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 las 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 desechara 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. Dicho procedimiento será realizado por el alumno de maestría en apoyo con el tutor e investigador responsable experto en la técnica.

Determinación de pureza de ADN

Se realizó la medida de la absorbancia a dos longitudes de onda: UV 260nm y 280 nm debido a que las bases púricas y pirimídicas absorben a 260 nm y los grupos aromáticos en las proteínas a 280 nm. Haciendo el cociente entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm se obtuvo un valor que refleja el estado de pureza del ADN. Si este valor se encuentra entre 1.8-2.0, el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por arriba de 1.8 indican contaminación. Dicho procedimiento será realizado por el alumno de maestría en apoyo con el tutor e investigador responsable experto en la técnica.

Genotipificación del polimorfismo Thr147 Ala en el gen del TAFI. Después de la extracción de ADN se procede a la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de la técnica de biología molecular PCR-RFLP con los siguientes oligonucleótidos: (sentido) 5'-TTGAACTTCCACATGCAGC-3' y (contrasentido)

5' ATCTTGGGCACCATTTTGAG-3' en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 3 Mm cLMG, 50 Mm KCl, 10 Mm Tris-HCL (pH 8.4), 0.5 mM de cada dNTP (Promega) y 1 unidad de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se llevará a cabo en un termociclador marca Applied Biosystem bajo las siguientes condiciones térmicas desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 60°C por 30s, y extensión a 72°C por 1 min repetidos por 30 ciclos. El producto de PCR de 456pb será restringido con la enzima específica BbvI en separados mediante un gel de agarosa al 3% y serán visualizados mediante bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV. La interpretación genotípica se basará en el reconocimiento de las bandas de 124 y 304 pares de bases para el alelo (Ala), mientras que el alelo (Thr) 428pb. El procedimiento será realizado por el tutor e investigador responsable.

Genotipificación del polimorfismo Thr 325 Ile en el gen del TAFI: Después de la extracción de ADN se procede a la amplificación del fragmento de interés mediante el uso de la técnica de biología molecular PCR-RFLP con los siguientes oligonucleótidos: (sentido) 5'-CACAAAGAAAAACAGATCACACAG-3' Y (contrasentido) 5'AAAGCCACCCAATTGTGATT-3' en un volumen final de 50 microlitros conteniendo 3 Mm CIMg, 50 Mm KCl, 10 Mm Tris-HCL (pH 8.4), 0.5 mM de cada dNTP (Promega) and 1 unidad de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se llevará a cabo en un termociclador marca Applied Biosystem bajo las siguientes condiciones térmicas desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación a 60°C por 30s, y extensión a 72°C por 1 min repetidos por 30 ciclos. El producto de PCR será restringido mediante la enzima específica SpeI y separados mediante un gel de agarosa al 3% y serán visualizados mediante bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV. La interpretación genotípica se basará en el reconocimiento de las bandas de 245 pb (Thr), mientras que el (Ile) no es digerido por la enzima permaneciendo la banda de 364 pb. El procedimiento será realizado por el tutor e investigador responsable.

Extracción de información de pacientes en quienes de obtuvo la muestra en años previos.

El alumno de maestría se encargará de realizar una búsqueda exhaustiva en la base de datos de la UIMTHA con respecto a los pacientes que cuenten aun con muestra disponible, en congelamiento y en buenas condiciones en el biobanco de la unidad, llevando a cabo los siguientes pasos:

- 1) Identificación en base de datos, con folio de registro.
- 2) Confirmar información completa en la base de datos y corroborar en base de datos que hay muestra existente aún
- 3) Búsqueda de la muestra bajo ultra refrigeración en base al folio.
- 4) Una vez identificada la muestra, determinar si esta e suficiente.
- 5) Procesamiento de la muestra.

Como parte del control de calidad se realizará a la par la búsqueda de información en las libretas existentes en la unidad, basándonos en las fechas correspondientes identificando las muestras obtenidas y que cumplan con los criterios para participar ya que también se cuenta en dichos registros con la información completa con folio y las información de las variables que existe en la base de datos electrónica.

ANEXO B

CRITERIOS PARA DONACIÓN DEL BANCO DE SANGRE IMSS (HGR 1)

1. Identificaciones autorizadas: Credencial del IFE, licencia de conducir, pasaporte, cédula profesional, cartilla de salud del IMSS con fotografía (sellada), credencial electrónica del IMSS, cartilla militar (menor a 10 años).
Sólo para estudiantes: credencial escolar y CURP.

Todas las identificaciones deben presentarse en original, vigentes y en buen estado.

2. Disponer de un promedio de 2 y media horas, tiempo aproximado que dura el proceso de la donación de sangre.

3. Ayuno mínimo de 6 horas (6 horas previo a la donación no consumir alimentos que contengan grasa)

3.1 Antes de presentarse a donar debe de ingerir jugos, frutas, té, café, ya que no es necesario ayuno total.

4. Peso mayor a 50 kilos.

5. Edad de 18 a 65 años.

6. Estar sano, incluso también al momento de la donación (no padecer gripe, fiebre o alguna infección en los 7 días anteriores a la infección.

7. No estar tomando medicamentos incluyendo aspirinas o analgésicos. (en las últimas 72 horas).

8. No ser diabético, hipertenso o padecer enfermedades crónicas.

9. No haber estado en tratamiento de acupuntura, endodoncia o haberse practicado tatuajes o perforaciones en los últimos 12 meses.

10. No presentarse enfermo de gripe, tos, diarrea, infección dental o haber estado enfermo de lo anterior en los últimos 7 días.

11. No haber padecido hepatitis.

12, No haber sido operado en los últimos 12 meses (excepto cirugías ambulatorias; 6 meses)

13 Mujeres: No estar menstruando ni tener hijos menores de un año.

ANEXO C

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 Fortaleza, Brasil en 2014. Quien establece los siguientes lineamientos:

1. El objetivo principal de la investigación médica en humanos consiste en mejorar los procedimientos de diagnóstico, terapéuticos y profilácticos, así como también, la comprensión de la etiología y patogénesis de la enfermedad. Aún los métodos profilácticos, de diagnóstico y terapéuticos más probados deben ponerse a prueba de modo continuo a través de la investigación para su efectividad, eficacia, accesibilidad y calidad.
2. Constituye el deber del médico en una investigación médica el proteger la vida, la salud, la privacidad y la dignidad del ser humano.
3. En cualquier investigación sobre seres humanos, cada paciente potencial debe estar debidamente informado respecto a los objetivos, métodos, fuente de los fondos, cualquier conflicto de interés, afiliaciones institucionales del investigador, beneficios anticipados y peligros potenciales del estudio, así como también, de la incomodidad que el mismo pueda implicar. Se le debe de informar que tiene plena libertad de rehusarse a participar en el estudio y que dicha libertad también alcanza la facultad de retirarse su consentimiento para participar en el estudio en cualquier momento sin ningún tipo de represalia. Luego de asegurarse que el paciente ha entendido la información, el médico deberá obtener el consentimiento informado otorgado voluntariamente por el paciente, de preferencia por escrito. Si el consentimiento no se puede obtener por escrito, el consentimiento no escrito debe documentarse de modo formal y se debe dar testimonio del mismo.

ANEXO D

Asociación de los polimorfismos Thr147Ala y Thr325Ile en el gen del inhibidor de la fibrinólisis activada por trombina (TAFI) en pacientes jóvenes mexicanos. Comparación de dos territorios arteriales (Cerebral y coronario)

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre: _____

No. Afiliación: _____ No. Telefónico: _____

Hospital: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Peso: _____ Talla: _____

Diagnostico: EVC _____ IAM _____

IMC: _____ Sedentarismo: Sí _____ No _____ Tabaquismo: Sí _____ No _____

Alcoholismo: Sí _____ No _____ AHF: Sí _____ No _____

Anticonceptivos: Sí _____ No _____ DM: Sí _____ No _____

HAS: Sí _____ No _____ Cáncer: Sí _____ No _____ Cardiopatía: Sí _____ No _____

Trombofilia: Sí _____ No _____ Enfermedad renal: Sí _____ No _____

Valvulopatía: Sí _____ No _____ Anticoagulantes: Sí _____ No _____

Antihipertensivos: Sí _____ No _____ Hipoglucemiantes: Sí _____ No _____

Insulina: Sí _____ No _____ AAS: Sí _____ No _____ Otros: Sí _____ No _____

TAS: _____ TAD: _____ FC: _____ FR: _____ Arritmia: _____

Glucosa: _____ Urea: _____ Creatinina: _____ Hemoglobina: _____

Hematocrito: _____ Leucocitos: _____ Plaquetas: _____

Fibrinógeno: _____ TP: _____ TTP: _____ TT: _____ Albúmina: _____

TGO: _____ TGP: _____ DHL: _____ CK: _____ Globulina: _____

FA: _____ GGT: _____ LDL-C: _____ HDL-C: _____ CoIT: _____ Albúmina: _____

Triglicéridos: _____ Na: _____ K: _____ Cl: _____ AcidoÚrico: _____

TC: _____

RNM: _____

US Doppler Carotídeo: _____

Angio TC: _____

Angio RMN: _____

Ecocardiograma/Holter: _____

Polimorfismo

Genotipo

1. Thr147Ala _____

2. Thr325Ile _____

ANEXO E. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



CONSENTIMIENTO INFORMADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL

UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ALA147THR Y THR325ILE EN EL GEN DEL INHIBIDOR DE LA FIBRINOLISIS ACTIVADA POR TROMBINA (TAFI) EN PACIENTES JOVENES MEXICANOS CON ENFERMEDAD VASCULAR: COMPARACIÓN DE DOS TERRITORIOS ARTERIALES (CEREBRAL Y CORONARIO)"
Patrocinador externo (si aplica):	Ninguno
Lugar y fecha:	Ciudad de México,
Número de registro:	R-2017-3609-22. Autorizado por el comité local de investigación y ética en salud.
Justificación y objetivo del estudio:	Dado que los infartos del corazón y los infartos o embolias cerebrales son padecimientos poco frecuentes en jóvenes existen pocas condiciones que puedan explicar totalmente su causa, es decir, el tabaquismo, la diabetes, hipertensión, las grasas y otras condiciones muchas veces no son suficientes para condicionar una enfermedad de este tipo, por lo que es de nuestro interés determinar la posible influencia que tenemos cada uno desde el nacimiento para desarrollar estos padecimientos. Teniendo en cuenta que nuestros genes son nuestro código de barras o nuestro instructivo de cómo estamos diseñados, que pueden condicionar que tengamos un color de piel o un color de ojos, de la misma forma pueden condicionarnos cierta protección o riesgo de desarrollar una enfermedad. Por tal motivo nuestro objetivo es determinar la influencia genética (condición de nacimiento) que puede favorecer la variación de factores que participan en la coagulación y que posiblemente se asocien en el desarrollo de infarto cerebral o cardiaco en jóvenes.
Procedimientos:	Se realizará un breve cuestionario sobre los datos de su padecimiento de aproximadamente 30 minutos y se le tomará una muestra de sangre para extraer aproximadamente 3-4 tubos de laboratorio (3 cucharadas) en un espacio dentro de la unidad diseñado para toma de muestras, las cuales se planean almacenar por un lapso de 8-10 años con motivo de investigaciones futuras.
Posibles riesgos y molestias:	Dolor local de donde se tomo la muestra, un moretón en el lugar de la toma de muestra, un sangrado mayor a lo esperado, molestias que se resuelven por si solas y de ser necesaria se valorará por los médicos de la unidad y podrá enviarse a urgencias o dar un antiinflamatorio en la unidad si así lo requiere.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Usted no recibirá dinero o algún incentivo por su participación, sin embargo será evaluado (a) por un especialista en neurología y/o medicina interna, quienes podrán hacerle recomendaciones sobre su padecimiento.
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Los resultados se otorgarán a su medico tratante para anexarse a su expediente y el decidirá darle el valor necesario para el seguimiento de su caso.
Participación o retiro:	Su participación o retiro de la investigación es libre y voluntaria. La participación o retiro del estudio no afectará, repercutirá ni condicionará el tratamiento actualmente recibido o su seguimiento en la consulta o en estudios futuros.
Privacidad y confidencialidad:	Los datos personales serán codificados en una base de datos para no exponer los datos personales y serán resguardados de forma digital en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del IMSS.

En caso de colección de material biológico (si aplica):

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y se resguarde estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):

Beneficios al término del estudio:

Se ampliará el protocolo de estudio de su enfermedad para encontrar alguna causa o algún factor asociado.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Responsable:

Dr. Manuel Martínez Marino Tel: 56 3958 22 ext.1910 Cel: 5551446412 correo electrónico: manuelmtzm@hotmail.com

Colaboradores:

Dra. Irma Isordia Salas Tel: 56395822 ext. 1910 maissa1405@gmail.com

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión Local de Investigación y Ética del Hospital General Regional No 1 Numero 3609 del IMSS: Calle Gabriel Mancera 222 Col. Del Valle, Cd. de México, CP 03103. Teléfono 56395822.

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Clave: 2810-009-013

ANEXO F. DICTAMEN DE APROBACIÓN

 MÉXICO GOBIERNO DE LA REPÚBLICA		Dirección de Prestaciones Médicas Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud Coordinación de Investigación en Salud	 IMSS
---	---	---	---

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud **3609** con número de registro **13 CI 09 014 189** ante
COFEPRIS
H GRAL ZONA 1 CARLOS MC GREGOR, D.F. SUR

FECHA **24/07/2017**

DRA. IRMA ISORDIA SALAS

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ALA147THR Y THR325ILE EN EL GEN DEL INHIBIDOR DE LA FIBRINÓLISIS ACTIVADO POR TROMBINA (TAFI) EN PACIENTES JÓVENES MEXICANOS CON ENFERMEDAD VASCULAR: COMPARACION DE DOS TERRITORIOS ARTERIALES (CEREBRAL Y CORONARIO)

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2017-3609-22

ATENTAMENTE

DR.(A). FRANCISCO JAVIER PADILLA DEL TORO
Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3609

IMSS
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL