



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**POLIMORFISMO 4G/5G EN EL GEN DEL INHIBIDOR
DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR TIPO 1 (PAI-1) EN
PACIENTES CON INFARTO MIOCÁRDICO
CON UNA EDAD DE 45 A 65 AÑOS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS**

P R E S E N T A:

Q.F.B. MARÍA GUADALUPE VALADES MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Elba Reyes Maldonado.
Dra. Irma Isordia Salas.



México, Distrito Federal 2009

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

1. La Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA) del Hospital General Regional No. 1 “Dr. Carlos Mac Gregor” del Instituto Mexicano del Seguro Social.
2. El Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
3. El Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Bajo la dirección de las Doctoras:

Elba Reyes Maldonado e Irma Isordia Salas

DEDICATORIAS

A mi esposo, Mario porque gracias a su amor, apoyo, confianza y correcciones de estilo consigo otra de mis metas profesionales.

A mis hijos, Mario y Minerva, que con su paciencia, comprensión y amor logré realizar este trabajo.

A Raúl (el Negro) por contar con su apoyo incondicional en cualquier momento que necesité.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras de tesis:

Dra. Irma Isordia Salas, por la confianza que me brindó, por sus enseñanzas y por su amistad incondicional; pero sobre todo, por la oportunidad que me dio para realizar este trabajo.

Dra. Elba Reyes Maldonado, por su apoyo, sus valiosos consejos y ejemplo de trabajo.

También agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, en especial al personal de los Hospitales de Cardiología y de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su amistad y cooperación, ya que este es el resultado de un trabajo en equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de maestría como becaria durante el período de febrero de 2008 a diciembre de 2009 con el número de becario (CVU/Becario) 253753/216186.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social: A la Comisión Nacional Mixta de Becas del Instituto Mexicano del Seguro Social, por la beca otorgada durante el período del 1 de marzo de 2008 al 18 de diciembre de 2009

A mi comité tutorial y a mis sinodales, por su apoyo para llevar a cabo el proyecto y por sus oportunas aportaciones a mi formación como Maestra en Ciencias

Dra. Ethel A. García Latorre

Dr. Juan Carlos Cancino Díaz

Dra. Iris Estrada García

Dra. Laura Montiel Cervantes

Dr. César Zavala Hernández

CONTENIDO

Página

ABREVIATURAS-----	iii
ÍNDICE DE TABLAS-----	iv
ÍNDICE DE FIGURAS-----	v
RESUMEN-----	vi
ABSTRACT-----	vii
I. INTRODUCCIÓN-----	1
Infarto Miocárdico-----	3
Desarrollo aterotrombótico-----	3
Fases del desarrollo aterotrombótico-----	4
Inflamación y trombosis-----	6
Etiología del Infarto Miocárdico-----	7
Asociación de la presencia del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del Activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el desarrollo de IAMCEST-----	8
Influencia en la regulación de la concentración plasmática de PAI-1-----	10
Asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 en pacientes de ≤ 45 años con IAMCEST-----	15
Justificación-----	20
Planteamiento del problema-----	21
Pregunta de investigación-----	21
Hipótesis-----	21
Objetivo general-----	21

II.	MATERIAL Y MÉTODOS-----	22
	Diseño de la investigación-----	22
	Universo de trabajo-----	22
	Grupos de estudio-----	22
	Criterios de inclusión-----	22
	Criterios de no inclusión-----	22
	Tamaño de la muestra-----	22
	Especificación de las variables-----	23
	Definición operacional de las variables-----	23
	Procedimientos-----	24
	Análisis estadístico de los datos-----	27
	Aspectos Éticos-----	28
III.	RESULTADOS-----	30
IV.	DISCUSIÓN-----	36
V.	CONCLUSIONES-----	39
VI.	PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS-----	40
VII.	ANEXOS-----	41
	Anexo 1. Definición conceptual de las variables-----	41
	Anexo 2. Hoja de consentimiento informado-----	42
	Anexo 3. Hoja de recolección de datos-----	43
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	44

ABREVIATURAS

CK	Creatinfosfocinasa
CK-MB	Creatinfosfocinasa fracción MB
DM	Diabetes Mellitus
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
F XII	Factor XII de la coagulación
F XIIa	Factor XII activado de la coagulación
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
HDL	Lipoproteínas de alta densidad del inglés high density lipoprotein
IC	Intervalo de Confianza
IM	Infarto Miocárdico
IMC	Índice de Masa Corporal
LDL	Lipoproteínas de baja densidad del inglés Low density lipoprotein
PAI-1	Inhibidor-1 del Activador del Plasminógeno tipo tisular del inglés Plasminogen Activator Inhibitor-1.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa del inglés Polymerase Chain Reaction.
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica, del inglés Restriction fragment Length Polymorphism)
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido del inglés single nucleotide polymorphism.
IMCEST	Infarto miocárdico con elevación del segmento ST
t-PA	Activador del plasminógeno tisular (Tissue plasminogen activator)
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad del inglés very low density lipoprotein

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores derivados del endotelio que favorecen la formación del trombo-----	2
Tabla 2. Comparación de las variables clínicas y demográficas Entre casos y controles de sujetos menores de 45 años-----	6
Tabla 3. Distribución del genotipo 4G/5G y la frecuencia alélica del Polimorfismo en el gen del PAI-1 entre casos y controles de sujetos menores de 45 años-----	17
Tabla 4. Odds ratio (OR) ajustado de infarto miocárdico para el alelo 4G en pacientes menores de 45 años.-----	17
Tabla 5. Comparación de la distribución genotípica y frecuencia alélica en el Polimorfismo 4G/5G entre otras poblaciones y la Mestiza Mexicana.-----	19
Tabla 6. Características clínicas y demográficas de pacientes con AMCEST y controles > 45 año.-----	31
Tabla 7. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plaminógeno tipo 1 (PAI-1) entre los grupos pacientes con IAMCEST y grupo control >45años.-----	33
Tabla 8. Análisis de regresión logística múltiple utilizando IAMCEST Como variable dependiente en pacientes de 45 a 65 años-----	34
Tabla 9. Comparación de la distribución genotípica y frecuencia alélica del Polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 entre los grupos de pacientes con IAMCEST < y > de 45 años.-----	35
Tabla 10. Comparación de los factores de riesgo entre los grupos de paciente con IAMCEST < y > de 45 años.-----	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1	Activación de la Coagulación-----1
Fig. 2	Desarrollo del Proceso aterotrombótico-----4
Fig. 3	Fases del desarrollo aterotrombótico-----6
Fig. 4	Esquema de la activación e inhibición del sistema fibrinolítico----- 10
Fig. 5	Participación del sistema fibrinolítico en la remodelación y evolución de la placa aterosclerosa----- 11
Fig. 6	Estructura del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1) y el sitio del polimorfismo 4G/5G, localizado en la región del promotor----- 12
Fig. 7	Relación entre la síntesis del PAI-1 y el síndrome de resistencia a la insulina----- 14
Fig. 8	Comparación de la integridad del DNA correspondiente a las muestras de los participantes----- 32
Fig. 9	Análisis del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 en un gel de agarosa correspondiente a la región polimórfica 4G/5G----- 32

RESUMEN

Introducción: La enfermedad cardiovascular es la primera causa de muerte en México (16.4%). La mayoría de los casos son debidos al Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST). Existen varios factores involucrados en la patogénesis del IAMCEST, principalmente factores genéticos y ambientales. El inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1), es el principal inhibidor fisiológico del sistema fibrinolítico. El polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1, tiene influencia en la regulación de la concentración plasmática de ésta proteína (PAI-1).

Objetivos: Determinar la participación del polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 y el desarrollo de IAMCEST en pacientes con edad de 45 a 65 años, y su asociación con otros factores de riesgo (hipertensión, *diabetes mellitus*, tabaquismo, obesidad y dislipidemia).

Métodos: En un estudio de casos y controles, se incluyeron 150 pacientes Mestizos Mexicanos, con edad de 45 a 65 años, con diagnóstico de IAMCEST, que ingresaron consecutivamente al servicio de urgencias del Hospital de Cardiología del CMN SXXI del IMSS (casos) y 150 sujetos sin IAMCEST (controles), apareados por edad y sexo. Se realizó la genotipificación del polimorfismo 4G/5G usando la técnica de PCR-RFLP (Polimerase chain reaction-restriction and fragment length polymorphism). Todos los pacientes firmaron hoja de consentimiento informado.

Resultados: No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica entre el grupo de pacientes con IAMCEST y el grupo control ($p=0.35$). Respecto a la frecuencia alélica tampoco encontramos diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.84$). Al realizar la comparación entre los grupos de pacientes con IAMCEST mayores y menores de 45 años, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica entre ambos grupos ($p<0.001$), así como en la frecuencia alélica ($p<0.03$). Las variables asociadas con IAMCEST fueron, *diabetes mellitus* (52.6%), hipertensión (56.6%), tabaquismo (61.3%), dislipidemia (53.3%) y, los antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular (30%).

Conclusiones: En pacientes con edad de 45 a 65 años, el alelo 4G no representa un factor de riesgo independiente para el desarrollo de IAMCEST. Sin embargo, los factores modificables de tabaquismo, hipertensión y *diabetes mellitus*, sí representan factores de riesgo independientes para el desarrollo de IAMCEST en la población de 45 a 65 años. La exposición prolongada a los factores de riesgo tradicionales, determina en forma importante la aparición del proceso aterotrombótico, culminando con el desarrollo del IAMCEST.

Palabras clave: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1, polimorfismo. Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST, aterotrombosis.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular disease is the first cause of death in Mexico (16.4%), most of cases due to ST elevation Acute Myocardial infarction (STEMI). Several factors are involved in the pathogenic of STEMI mainly genetic factors and environmental factors. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene (PAI 1) is the main physiologic inhibitor of the fibrinolytic system. There is a polymorphism in the PAI-1 gene denominated 4G/5G, which has influence on regulation of the plasma concentration of this protein (PAI-1).

Objectives: To determine the role of the 4G/5G polymorphism in the gene PAI-1 and the development of STEMI in patient with an age of 45 to 65 years, and their association with other risk factors (Hypertension, diabetes mellitus, smoking, obesity and dyslipidemia).

Methods: We conducted a case- control study, and 150 patients Mexican Mestizos were included, from 45 to 65 years of age, with a diagnostic of STEMI, whom were admitted to cardiovascular intensive care unit, the Hospital Cardiology of National Medical Center (cases) and 150 individuals without STEMI (controls), matched by age and sex. Participants were genotyped for the 4G/5G polymorphism using the polymerase chain reaction-restriction and fragment length polymorphism analysis. All patients signed informed consent.

Results: There was not significant difference in genotype distribution between group of patient with STEMI and the group control ($p=0.35$). We did not find a significant difference in allele frequency between both groups ($p=0.84$). We found significant statistical differences in genotype distribution between the groups of patient with STEMI < and > of 45 years between both groups ($p <0.001$), as well in allele frequency ($p <0.03$). The variables associated with STEMI were, diabetes mellitus, (52.6%), hypertension (56.6%), smoking (61.3%), dyslipidemia (53.3%) and family history of cardiovascular disease (30%).

Conclusions: In patient with age of 45 to 65 years, the 4G allele did not represent risk factor for acute myocardial infarction. However the traditional factors such smoking, hypertension, diabetes, and dyslipidemia, represented independent risk factors for STEMI development in population with 45 to 65 years old. The interaction of those risk factors, will determines the appearance of the atherothrombotic process culminating with the development of STEMI.

Key words: Plasminogen activator inhibitor -1, polymorphis. ST Elevation Acute Myocardial Infarction, atherothrombosis.

1. INTRODUCCIÓN

La hemostasia se lleva a cabo por un delicado equilibrio entre los procesos protrombótico y antitrombótico, los cuales son mediados por componentes celulares, proteínas solubles del plasma y factores derivados del endotelio (Fig. 1). Existen diversas anomalías que comprometen la producción, actividad o metabolismo de ciertos factores específicos que alteran este balance fisiológico en favor del desarrollo de trombosis, predisponiendo a eventos trombóticos prematuros de origen arterial o venoso.

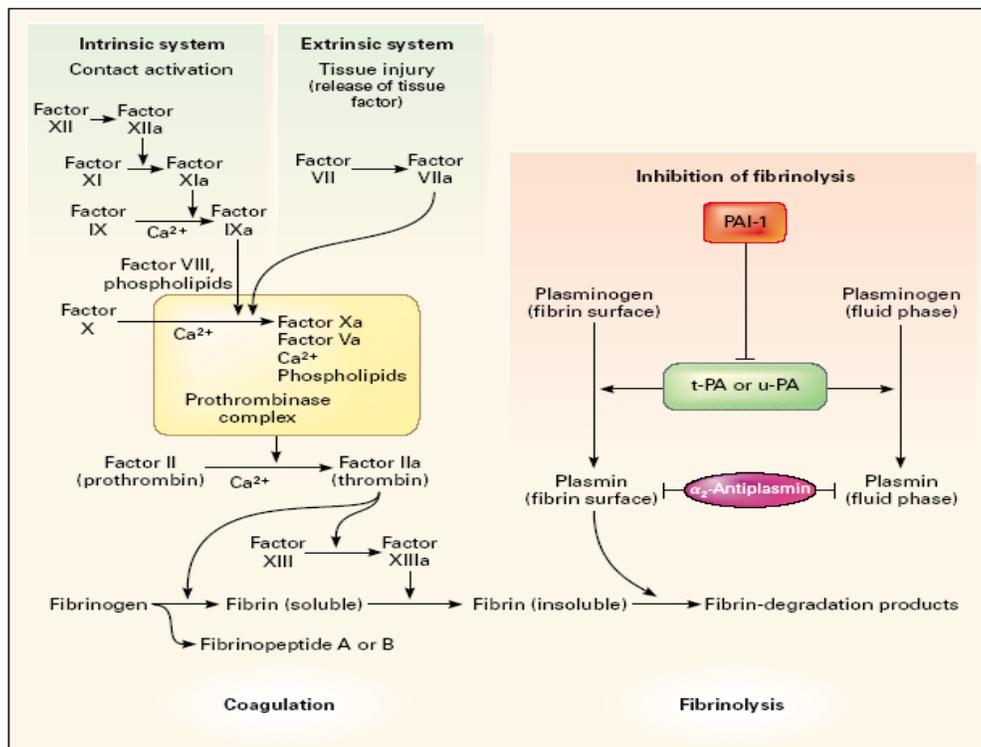


Figura 1. Activación de la coagulación. La hemostasia está constituida por los sistemas de la coagulación y el fibrinolítico. La activación del sistema de la coagulación se lleva a cabo por la formación de un complejo formado por el factor VII y el factor tisular, el cual es liberado después de un daño tisular. Algunas de estas reacciones dependen de la presencia de iones calcio. La trombina es formada por un complejo enzimático denominado protrombinasa constituida por los factores X, factor V, fosfolípidos, las cuales están cargadas negativamente, y iones calcio. La activación de los factores de la coagulación permite la formación de la trombina, la activación de fibrinógeno, y la liberación de fibrinopéptidos, la formación de fibrina soluble y finalmente, la formación de fibrina insoluble mediante la acción del factor estabilizador de la fibrina (factor XIII). Las principales reacciones que se llevan a cabo por el sistema fibrinolítico son: La inhibición de la fibrinólisis por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y α_2 antiplasmina. La fibrinólisis se inicia por el activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA), y el activador del plasminógeno tipo urinario (u-PA), y la plasmina. La plasmina se une a la superficie de la fibrina iniciando la lisis de la misma con la formación de productos de degradación de la fibrina.

La fisiopatología de la trombosis arterial involucra interacciones complejas entre la superficie endotelial, las plaquetas y diversos activadores de la coagulación (Tabla 1). En 1856 Rudolf Virchow, describió tres condiciones fundamentales para el desarrollo de trombosis y que aún en la actualidad siguen vigentes. Dichas condiciones son: alteración en el sistema de la coagulación sanguínea, en el flujo sanguíneo y en la superficie endotelial del vaso. Estos factores interactúan entre sí para formar un coágulo localizado.

Tabla 1. Factores derivados del endotelio que favorecen la formación del trombo.

Factores protrombóticos
Factor Tisular (FT)
Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)
Factor de von Willebrand (vWF)
Factores antitrombóticos
Trombomodulina
Sulfato de Heparán
Activadores del plasminógeno tipo tisular y urokinasa (t-PA/u-PA)
Prostaciclina (PGI ₂)
Oxido Nítrico (ON)

La enfermedad arterial coronaria representa la causa más importante de morbi-mortalidad en el mundo. Diversos estudios han demostrado que en los Estados Unidos más de un millón de personas presentan infarto miocárdico (IM), y más de 500,000 mueren por esta causa anualmente. En México, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), reportó un total de 494 471 fallecimientos durante el año 2007, de los cuales el 16.4% se debió a IM, colocando a la enfermedad arterial coronaria (EAC) como la primera causa de muerte en nuestro país (1).

Infarto Miocárdico.

El infarto miocárdico es un fenómeno multifactorial, resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales relacionados con el desarrollo de aterosclerosis y trombosis (2, 3). El IM se caracteriza por la formación de la placa ateromatosa, culminando con una lesión arterial obstructiva, lo cual produce daño tisular (necrosis). La ruptura de la placa aterosclerótica, la cual está constituida principalmente por lípidos, se considera un evento precipitante en la transición de la forma estable o subclínica de la enfermedad aterosclerosa denominada angina estable, a la presencia de la forma clínica representada por el infarto miocárdico (IM).

Desarrollo aterotrombótico

Se caracteriza por el desarrollo de un proceso inicial de aterosclerosis, originado en las etapas iniciales de la vida, continuando su desarrollo hasta la edad adulta. Los principales componentes en la formación del trombo arterial son: la formación de trombina, la generación de fibrina y la acumulación de agregados plaquetarios, los cuales, también se ha demostrado que participan en la formación y progresión de la placa aterosclerótica, constituida por la acumulación de células y lípidos en la capa íntima endotelial de las arterias de gran calibre, como la aorta, carótida y arterias periféricas. En etapas avanzadas de la enfermedad, el proceso ateroscleroso también involucra a las capas media y adventicia del vaso originando la formación del ateroma, constituido por células musculares lisas y colágeno. La expresión fisiopatológica de la EAC está representada por los síndromes coronarios agudos (SCA) como son: la angina estable, la angina inestable e infarto agudo al miocardio con o sin elevación del segmento ST (Fig. 2).

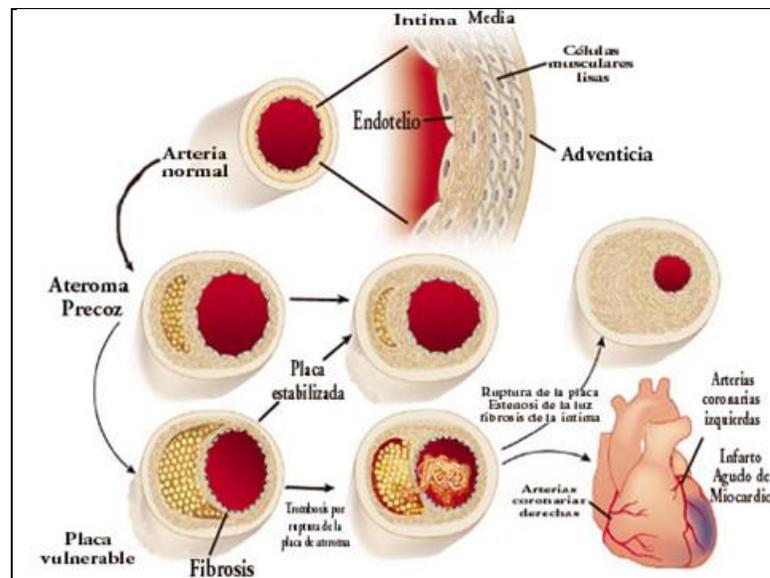


Fig. 2 Desarrollo del proceso aterotrombótico. Formación y progresión de la placa ateroesclerótica constituida por células y lípidos en la capa íntima endotelial de las arterias, originando: angina estable, angina inestable e infarto agudo de miocardio.

Fases del desarrollo aterotrombótico: La progresión de la placa ateroesclerótica se subdivide en 5 fases desde el punto de vista clínico/patológico de acuerdo al Comité de Lesiones Vasculares de la Asociación Americana de Cardiología (American Heart Association).

Fase 1 (lesión temprana). La lesión es pequeña y se presenta más frecuente en gente joven, categorizada en tres tipos: Lesión tipo I, representada por un cúmulo de macrófagos con alto contenido lipídico en su interior (denominadas células espumosas); las lesiones tipo II, que contienen células espumosas, células musculares lisas y un depósito delgado de lípidos en la matriz extracelular, y las lesiones de tipo III, constituidas por células musculares lisas rodeadas de tejido conectivo y lípidos.

Fase 2 (lesión avanzada). Las lesiones aunque no son estenóticas, quizá favorezcan la ruptura de la placa debido a su alto contenido lipídico, inflamación y capa fibrosa delgada. Las placas se caracterizan desde el punto de vista morfológico como variante tipo 1 y 2, la lesión tipo IV, representada por un alto contenido celular y un importante depósito de lípidos localizado en la capa íntima endotelial, lo que constituye una capa externa y las lesiones tipo Va que poseen un contenido lipídico extracelular denominado core, cubierta por una capa fibrosa (fase 3 y 4).

Fase 3. Esta fase se caracteriza por la lesión tipo VI, (representada por la ruptura de las lesiones de tipo IV o Va), produciendo una lesión no obstructiva del tipo trombótico. Éste proceso es silente, pero en ocasiones puede ocasionar la aparición de angina.

Fase 4. Ésta fase está representada por la complicación de la lesiones tipo VI, con la sobreposición de un cuadro oclusivo de origen trombótico. Éste proceso se manifiesta clínicamente mediante la aparición de los síndromes coronarios agudos (SCA), aunque en algunas ocasiones son silentes. En las fases 3 y 4 se producen cambios en la geometría de las placas rotas, así como la formación de un trombo mural oclusivo formado por tejido conectivo, el cual permite la oclusión o una estenosis significativa.

Fase 5. Este tipo de lesiones se caracteriza por la presencia de abundantes calcificaciones que pueden producir la aparición de un cuadro clínico de angina (vasoespasmos). Sin embargo, la célula miocárdica puede ser protegida con el desarrollo de circulación colateral (formación de nuevos vasos), por lo que en ocasiones estas lesiones se presentan sin manifestaciones clínicas.

Fase 6. Se caracteriza por la presencia de una lesión isquémica originada por la ruptura de la placa aterosclerosa, provocando la aparición de la máxima expresión aterotrombótica definida como Infarto Agudo del Miocardio.(Fig.3)

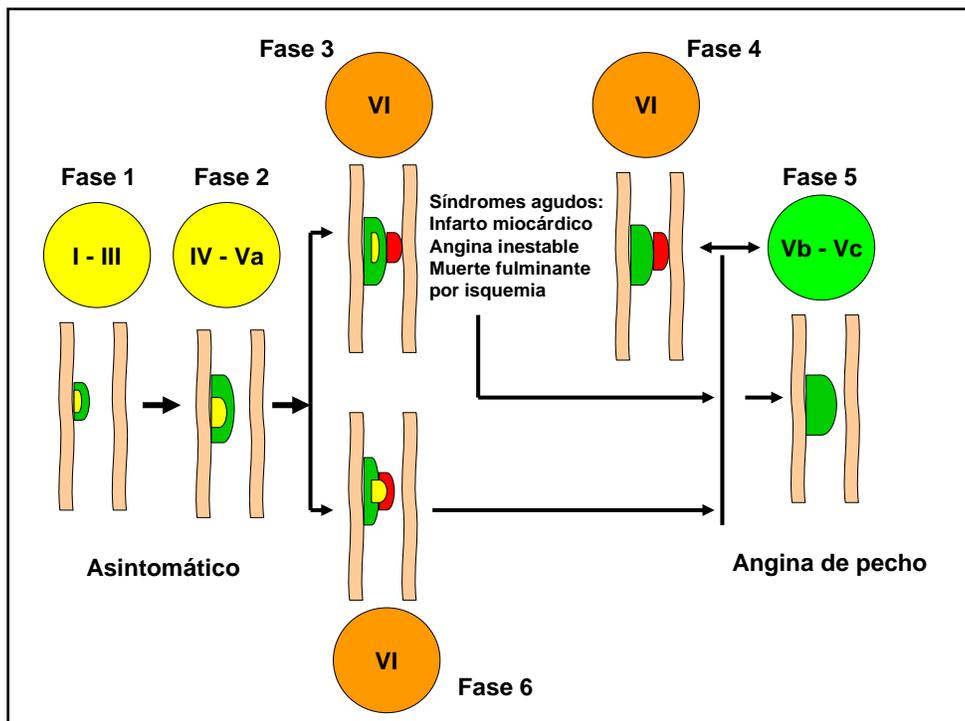


Fig. 3 El esquema representa las diferentes fases del desarrollo aterotrombótico. Fase 1 corresponde a la etapa inicial del proceso o lesión temprana. Fase 2 representa a una lesión avanzada del proceso que favorece la ruptura de la placa por su alto contenido lipídico en su interior. Fase 3 corresponde a las lesiones tipo VI caracterizada por ser una lesión no obstructiva del tipo trombótico (proceso silente). Fase 4 se caracteriza por complicaciones de las lesiones tipo VI originando un cuadro oclusivo de origen trombótico. Fase 5 caracterizada por la presencia de calcificaciones originando vasoespasmo o angina de pecho, en ocasiones sin manifestaciones clínicas. Fase 6 Se presenta la ruptura de la placa aterosclerosa originando Infarto Agudo del Miocardio. P, Theroux P. 2005

Inflamación y trombosis.

Previamente se pensó que el ateroma era una acumulación de lípidos, tejido conectivo y calcio, pero actualmente las evidencias apoyan una participación preponderante del proceso inflamatorio en la génesis del ateroma y sus complicaciones. La respuesta inflamatoria involucra no sólo a las células del endotelio arterial y musculatura lisa, sino también a las moléculas de adhesión y leucocitos sanguíneos. En la actualidad se reconoce la participación de los linfocitos T así como de macrófagos en el proceso aterogénico y la desestabilización de la placa. Podemos concluir que los procesos de inflamación y coagulación, son fundamentales en la patogénesis del proceso aterotrombótico (4).

Etiología del infarto miocárdico: Muchas enfermedades (diabetes, asma, IM, etc.) son el resultado de una compleja interacción entre los factores ambientales y alelos de susceptibilidad de múltiples genes, que se hacen presentes cuando estos factores se combinan. Aunque estas enfermedades complejas tienden a presentarse dentro de una misma familia, no se segregan en forma mendeliana, por lo que la presencia de un alelo de susceptibilidad no es suficiente para causar la enfermedad, sino que únicamente confiere incremento en el riesgo de padecerla. Una forma de investigar factores genéticos que contribuyen a la susceptibilidad hacia una enfermedad, es demostrando la asociación entre un marcador génico y la misma en una muestra al azar de pacientes no relacionados y sujetos testigo. Con el proyecto del genoma humano, se han establecido polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes candidatos. Estos SNPs pueden contribuir a la definición y caracterización de marcadores más promisorios. Los SNPs ocurren aproximadamente cada 200 pb en el genoma humano y tienen el potencial de ser usados en estudios de susceptibilidad genética, para enfermedades. Sin embargo, únicamente alrededor del 1% de los SNPs resultan en una alteración en la proteína, a nivel de aminoácidos. El polimorfismo genético puede ser revelado por enzimas de restricción que dan como resultado fragmentos de tamaños variables. (5)

En la actualidad se reconocen diversas alteraciones genéticas en los factores que constituyen el sistema hemostático, denominados polimorfismos, que contribuyen al desarrollo de IM, cuya importancia en su detección es que, ante la presencia de estos, se deben de modificar los factores de riesgo adyacentes (tabaquismo, dislipidemia, obesidad, hipertensión, diabetes), con la finalidad de que el fenotipo no se manifieste y el individuo no presente la enfermedad. La alteración denominada polimorfismo se define como: la presencia de una variación en la secuencia del DNA (alelo), en un gen determinado, ocurrida en un porcentaje mayor al 1% en la población general. 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 (6, 7,8,). Jorde y cols (9), demostraron que el antecedente familiar de IM es un factor de riesgo independiente, y dicho factor

genético fue mayor cuando el IM se presentó en pacientes jóvenes (10). Los estudios para evaluar la influencia hereditaria de algún genotipo específico, son particularmente relevantes cuando se llevan a cabo en gemelos univitelinos (11). En un estudio realizado en 21,004 parejas de gemelos, el riesgo de presentar IAM fue significativamente más alto en 7,310 gemelos monocigotos que en 13,694 gemelos dicigotos, este efecto fue disminuyendo conforme se presentó el IM en pacientes de edad más avanzada. En otro estudio, llevado a cabo también en gemelos, Berg (12) y Sorensen (13) obtuvieron resultados similares. Aunque ya se ha establecido la participación genética en el IM, la mayor parte de los estudios se han enfocado a analizar el efecto de los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis como son: el metabolismo de los lípidos y carbohidratos, así como la presión sanguínea. Sin embargo, las alteraciones genéticas que ocurren en los sistemas de la coagulación y fibrinolítico que favorecen el desarrollo de trombosis arterial, no se han investigado ampliamente.

Entre los diversos polimorfismos que se han descrito como asociados al desarrollo de enfermedad arterial coronaria se encuentran: el inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) (14), el gen del receptor de la glicoproteína plaquetaria IIIa (PIA2) (15) y el gen que codifica para la enzima 5, 10 metilen tetrahidrofolato reductasa (16). En algunos casos, estos polimorfismos provocan alteraciones en las funciones de las proteínas del sistema hemostático o alteración en la pared endotelial, produciendo estados pretrombóticos.

Asociación de la presencia del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y el desarrollo de IAMCEST.

La lisis del coágulo sanguíneo se lleva a cabo mediante la acción del sistema fibrinolítico, el cual está constituido por una proenzima inactiva denominada plasminógeno, éste se activa mediante la acción de dos activadores, el activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo urokinasa (u-PA), convirtiéndose en su forma activa denominada plasmina. La plasmina lleva a cabo la degradación de la fibrina transformándola en productos solubles de fibrina. El t-PA esta involucrado principalmente en la disolución de la fibrina circulante, mientras que el u-PA

se une a su receptor específico u-PAR, incrementando la activación del plasminógeno unido a la célula, regula la adhesión y migración celular. La inhibición del sistema fibrinolítico ocurre a nivel de la plasmina mediante la acción de la α_2 - antiplasmina y la α_2 -macroglobulina, o también a nivel de los activadores del plasminógeno como el PAI-1 (Fig. 4) (17).

El PAI-1 es una glicoproteína compuesta por 379 aa, y un peso molecular de 50 kDa (18), con actividad enzimática, el cual se une al tPA de una y dos cadenas, pero no reacciona con el uPA de cadena sencilla. De igual manera que otras serpinas, el PAI-1 lleva a cabo su acción inhibitoria sobre el t-PA mediante la formación de un complejo estequiométrico reversible 1:1 (19). El PAI-1 se elimina de la circulación por las células hepáticas (20). Éste se sintetiza por diversos tipos celulares como son: las células endoteliales, plaquetas, placenta, hepatocitos, células del músculo liso vascular y monocitos/macrófagos. El PAI-1 se almacena únicamente en la plaqueta, sin embargo, es secretado en forma rápida posterior a su síntesis. Se ha demostrado que exhibe un ritmo circadiano por lo que la concentración plasmática es mayor en la mañana y más baja durante la tarde o noche. La plaqueta es uno de los principales contribuyentes en la formación del trombo (21) a nivel del territorio vascular arterial, por lo que el PAI-1 representa un mecanismo importante para controlar la actividad de t-PA y con ello, proteger al coágulo sanguíneo formado por la plaqueta, de una lisis prematura (22). La síntesis de PAI-1 se estimula por la trombina a nivel de las células endoteliales (23). La regulación de los activadores del plasminógeno (tPA y uPA), constituyen un hecho crítico de muchos eventos fisiológicos y patológicos (24).

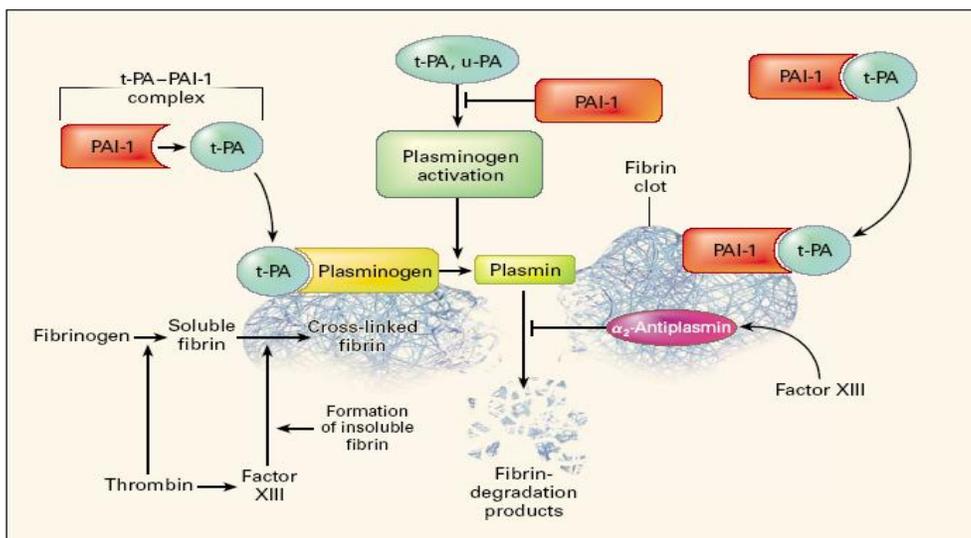


Figura 4. Esquema de la activación e inhibición del sistema fibrinolítico. Normalmente el activador del plasminógeno tisular (t-PA) circula en el plasma como un complejo con el inhibidor del activador del plasminógeno tisular (PAI-1) en forma estequiométrica 1:1. Las reacciones se llevan a cabo sobre la superficie del coagulo de fibrina. El plasminógeno se activa por el activador tipo tisular (t-PA) o tipo urinario (u-PA). El complejo plasminógeno, t-PA y fibrina promueven la formación de plasmina y la subsecuente lisis de la malla de fibrina en fragmentos de bajo peso molecular, denominados productos de degradación de la fibrina. El PAI-1 también se une a la fibrina logrando retener su actividad inhibitoria sobre t-PA.

Influencia en la regulación de la concentración plasmática de PAI-1

Existen diversas entidades fisiopatológicas, en las que se ha demostrado un incremento en la concentración plasmática de PAI-1 como son: estrés crónico (25), asma (26), glomerulonefritis (27), choque séptico (28), en diversos estados tromboticos (enfermedad arterial coronaria) en pacientes jóvenes, así como en eventos isquémicos cerebrales desarrollados en individuos con aterosclerosis preexistente. También se ha demostrado una asociación directa entre la concentración de PAI-1 y el grado de severidad de las lesiones ateroscleróticas, es decir a mayor cantidad de PAI-1 circulante, mayor extensión de las lesiones ateroscleróticas presentes (Fig.5)(29).

Los determinantes genéticos y ambientales que regulan la expresión del PAI-1 aún no se han entendido en su totalidad. Se ha postulado que las respuestas del PAI-1 a diferentes estímulos *in vivo*, quizá sean determinadas por cambios en la velocidad de transcripción del gen y de la secuencia de sus elementos dentro de la región promotora que controla esta respuesta, por lo que se han llevado a cabo diversos estudios en modelos animales. Uno de ellos se realizó en ratones transgénicos, los cuales

presentaron un nivel plasmático elevado de PAI-1, con incremento en el desarrollo de enfermedad trombótica arterial durante los primeros 4 meses de vida y, a los 6 meses, más del 90% de los ratones presentaron oclusión arterial espontánea (30, 31), lo que demuestra que la elevación crónica de los niveles plasmáticos de PAI-1 se asocia con trombosis arterial coronaria, lo cual es dependiente del tiempo de exposición al efecto trombotico del PAI-1. En otro estudio también realizado en ratones, se indujo infarto miocárdico mediante el ligamiento coronario, se demostró que las células miocárdicas contribuyeron al incremento en la expresión de PAI-1, resultando en el desarrollo de fibrosis intersticial y perivascular cardiaca. Además, la inhibición de los activadores del plasminógeno en ratones previno la ruptura cardiaca, pero disminuyó el proceso terapéutico angiogénico, causando falla cardiaca y la muerte (32).

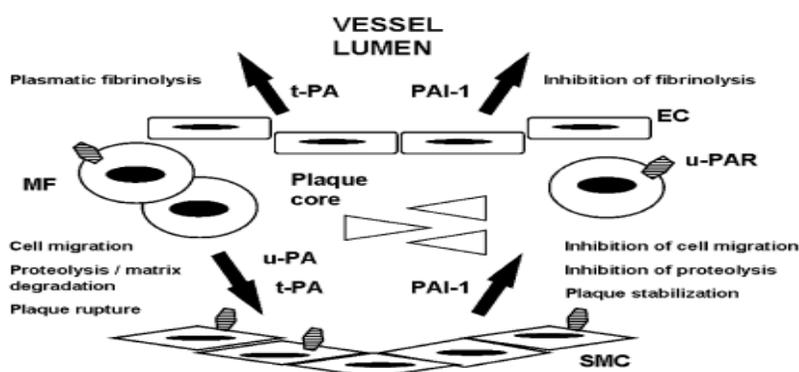


Figura 5. Participación del sistema fibrinolítico en la remodelación y evolución de la placa aterosclerótica. En la etapa avanzada del desarrollo de la placa aterosclerótica, existe una expresión incrementada del activador tanto tisular del plasminógeno (t-PA), como del tipo urokinasa (u-PA), así como del receptor de la urokinasa (u-PAR), los cuales están involucrados en el proceso de migración celular y proteólisis, lo que contribuye a la ruptura de la placa. Mientras que el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) posee un efecto antagónico mediante la inhibición de la proteólisis, contribuyendo así a la estabilización de la placa.

Debido a la importancia del sistema fibrinolítico como un regulador del depósito de fibrina en la pared del vaso sanguíneo, un desequilibrio en dicho sistema favorece el desarrollo de la enfermedad vascular. Diversos estudios han demostrado que un decremento en la fibrinólisis debido a concentraciones plasmáticas altas de PAI-1, produce un incremento en el depósito de fibrina y subsecuentemente, la formación del trombo. En el humano, el incremento en la concentración del PAI-1, se ha asociado al desarrollo de trombosis (33, 34).

Los avances en las áreas de biología molecular han permitido identificar un polimorfismo en la región promotora del gen del PAI-1, el cual se ha asociado con un incremento en la concentración plasmática de PAI-1 y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria. En el humano el gen del PAI-1 está localizado en el cromosoma 7 y contiene 9 exones y 8 intrones. Se han descrito diversos polimorfismos en dicho gen. El polimorfismo más importante se encuentra localizado en la región promotora 675 bp corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (4G/5G). El incremento en la transcripción genética del PAI-1 está asociado con 4 bases de guanina (el alelo 4 G), lo cual da como resultado la unión a una proteína del activador de la transcripción del PAI-1, mientras que el de 5 bases de guanina (el alelo 5 G), se une a una proteína receptora que disminuye la unión del activador (Fig.6). Los individuos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G genotipo) tienen concentraciones 25% más altas de PAI-1 que los sujetos que son homocigotos para el alelo 5G (5G/5G genotipo). Los estudios llevados a cabo *in vitro*, han permitido identificar diferencias en la capacidad de unión a este sitio de las proteínas reguladoras de la transcripción.

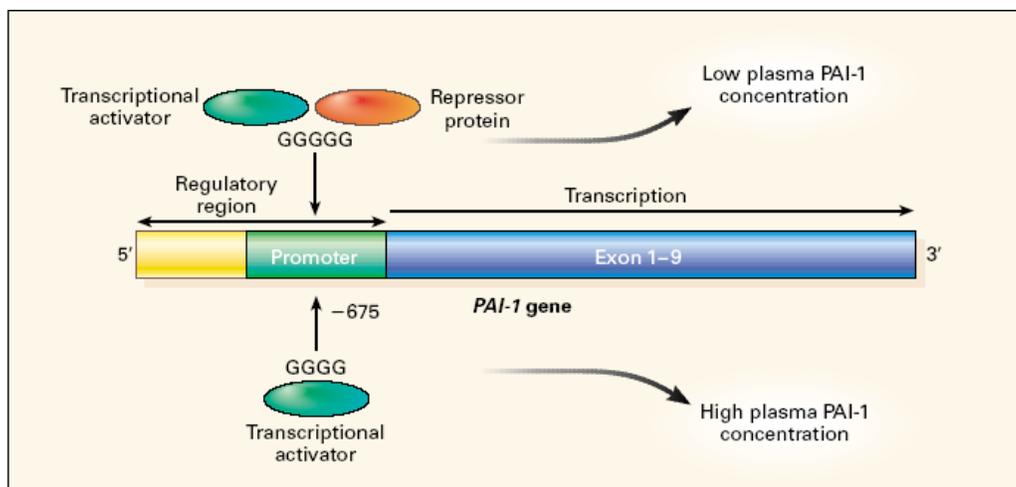


Figura 6. Estructura del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y el sitio del polimorfismo 4G/5G, localizado en la región del promotor. El polimorfismo 4G/5G en la posición -675 incrementa la transcripción y, por lo tanto, la concentración plasmática de PAI-1. Se ha identificado una diferencia en la capacidad de unión de las proteínas reguladoras de la transcripción a este sitio. El alelo 4G con 4 bases de guanina se asocia a un incremento en la transcripción del gen, resultando en la unión a un activador de la transcripción, mientras que el de cinco bases de guanina (alelo 5G) está unido a un represor de la proteína y, por tanto, disminuye su unión al activador.

Diversos estudios han demostrado una asociación entre el incremento de los niveles de PAI-1 y el desarrollo del síndrome de resistencia a la insulina, así como los parámetros del índice de masa corporal, niveles de triglicéridos, de insulina y presión sistólica sanguínea (35). Se ha demostrado que el tratamiento del síndrome de resistencia a la insulina mediante dieta, hipoglucemiantes orales y ejercicio, produce una disminución en los niveles plasmáticos de PAI-1. Además, en pacientes con síndrome de resistencia a la insulina en los cuales se logró una disminución en los niveles de lípidos, se demostró un incremento en los niveles de la actividad fibrinolítica como resultado de la reducción de los niveles de PAI-1. Los mecanismos por los cuales existe un incremento en los niveles de PAI-1 en el síndrome de resistencia a la insulina, aún no han sido totalmente esclarecidos. Diversos estudios *in-vitro* demuestran que la síntesis de PAI-1 por las células endoteliales y los hepatocitos, puede ser incrementada por la insulina, proinsulina y lipoproteínas aterogénicas. También se ha demostrado que las proteínas de muy baja densidad (VLDL) inducen un aumento en los niveles de la transcripción del promotor del PAI-1 a nivel de las células endoteliales, cuyo mecanismo se debe a la existencia de un elemento de respuesta de las VLDL denominado (VLDLRE), el cual está localizado en la región promotora del gen, y su actividad se incrementa por la presencia del polimorfismo 4G/5G, éste se encuentra localizado en un sitio adyacente a la región corriente arriba del sitio de unión del factor de transcripción de inducción de las VLDL. Estos hallazgos proveen una explicación molecular entre la asociación de las VLDL y el incremento en la actividad plasmática de PAI-1, así como para la interacción entre el polimorfismo 4G/5G y los niveles plasmáticos de triglicéridos (Fig. 7)(36).

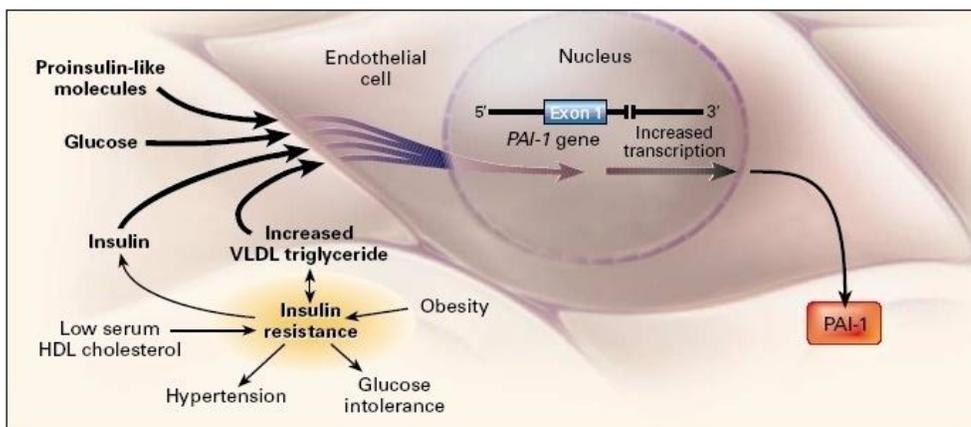


Figura 7. Relación entre la síntesis del inhibidor del plasminógeno tisular tipo1 (PAI-1) y el Síndrome de Resistencia a la Insulina. La característica principal del síndrome de resistencia a la insulina es la hiperinsulinemia, anomalías en el metabolismo de la glucosa, hipertrigliceridemia y baja concentración sérica de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertensión y obesidad. La insulina, las moléculas tipo proinsulina, y las lipoproteínas de muy baja densidad, directamente estimulan la transcripción y secreción del PAI-1 por las células endoteliales

En el estudio denominado Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS), se demostró un incremento en los niveles de la proteína C reactiva y PAI-1 en los sujetos con resistencia a la insulina quienes desarrollaron posteriormente *diabetes*, comparado con quienes no la desarrollaron (37). Entre otros factores, el incremento en el tejido adiposo y los niveles elevados de insulina, contribuyen a un aumento en los niveles plasmáticos de PAI-1, los cuales tienen un efecto protrombótico y proinflamatorio. En los pacientes con hipertrigliceridemia, el genotipo 4G/4G expresa concentraciones plasmáticas altas de PAI-1(38). Además, estudios *in vitro* han demostrado que los triglicéridos son un estímulo para el incremento en la producción de PAI-1 por los hepatocitos, cuyo efecto es mediado por los receptores de las moléculas VLDL, además, dicho efecto también produce incremento en la producción de insulina (39). Estas observaciones sugieren, que el síndrome de resistencia a la insulina, a través del efecto del incremento de los triglicéridos, altera la síntesis y secreción del PAI-1, lo que incrementa el riesgo ateromatoso y, por lo tanto, favorece el desarrollo de IM. En un estudio llevado a cabo en pacientes con enfermedad cardiovascular, cuyo grupo de población estaba constituido por individuos de raza negra, hispanos y blancos no hispanos, en los cuales se demostró la presencia del polimorfismo en 287 sujetos homocigotos para el alelo 4G, en 691 heterocigotos para el genotipo 5G. Los sujetos homocigotos para el 4G tuvieron el nivel más alto de PAI-1, los heterocigotos 4G/5G un nivel moderado y los homocigotos para el 5G/5G el nivel más bajo. En un estudio

llevado a cabo en 1179 sujetos normales y sus familiares en primer grado, los homocigotos para el alelo 4G fueron asociados con un riesgo significativo de IM (40). Otro estudio, con un grupo reducido de pacientes, demostró que el alelo 4G/4G estuvo relacionada al desarrollo de síndromes coronarios agudos (41). En un estudio en el cual se incluyeron 2565 sujetos a los que se les practicó angiografía coronaria como diagnóstico para confirmar IM, el genotipo 4G/4G estuvo relacionado con la presencia de ateroma y la etapa del desarrollo del mismo (42, 43).

Asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 en pacientes menores de 45 años con IAMCEST.

En un estudio previo de casos y controles realizado en la misma Unidad de Investigación, donde se realizó éste trabajo en el que se incluyeron 127 pacientes con IAMCEST todos menores de 45 años y 127 controles sin IAMCEST, ambos grupos pareados por edad y sexo; se determinó la participación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1. En éste estudio se demostró una elevada prevalencia de factores de riesgo convencionales en el grupo de casos. Las variables que encontraron asociadas al IAMCEST fueron el tabaquismo –OR=12.64 (IC del 95%, 6.46-25)-, hipertensión –OR =5.63 (IC del 95%, 2.68-12.01)-, diabetes mellitus- OR =5.58(IC del 95%, 2.52-12.63)-, dislipidemia -OR =5.79(IC del 95%, 2.69-12.68)- y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular –OR = 5.52(IC del 95%, 2.78-11.09) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las variables clínicas y demográficas entre casos y controles de sujetos menores de 45 años.

Variable	casos(n=127)	controles	p
Edad (años)	40±4.6	40±4.1	0.53
Varones (%)	83.3	82.6	NS
IMC	28.1±3.4	27.1±3.9	0.50
Tabaquismo(%)	65.8	13.3	<0.001
Hipertensión(%)	43.6	9.4	<0.001
Diabetes mellitus(%)	36	7.8	<0.001
Dislipidemia(%)	47.6	8.6	<0.001
Historia familiar de EAC	42.5	11.8	<0.001
Localización del infarto de miocardio(%)			
Pared anterior	38.6		
Pared inferior	59.8		
Posterolateral	1.6		
Tipo de infarto(%)			
Con elevación del ST	100		
Historia de angina de pecho	Ausente		
Creatinina	0.91±0.37	0.83±0.27	0.13

Isordia y cols. 2009

También demostraron que el alelo 4G es un factor independiente de riesgo de IAMCEST en pacientes jóvenes. En el grupo de los casos encontraron que el genotipo más frecuente fue el heterocigoto 4G/5G (50.4%), seguido del homocigoto 5G (42.5%); y el menor fue para el homocigoto 4G con (7.1%). La frecuencia alélica en el grupo de IAMCEST para el alelo 4G fue de (32.3%) y (67.7%) para el alelo 5G. En el grupo control el genotipo 4G/4G fue del 13.4%; el 4G/5G de 30%, y el 5G/5G de 56.6%. La frecuencia del alelo 5G fue de 71.6% en el grupo control. Demostraron una diferencia con significancia estadística para la distribución genotípica ($p < 0.002$), pero no para la frecuencia alélica entre los pacientes con IAMCEST y el grupo control ($p = 0.46$). En el análisis univariado demostraron un riesgo de IAMCEST en los sujetos portadores del alelo 4G (4G/4G + 4G/5G) comparado con los homocigotos para el alelo 5G(5G/5G), con $OR=1.77$ (IC del 95%,1.04-3) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución del genotipo 4G/5G y frecuencia alélica del polimorfismo en el gen del PAI-1 entre casos y controles sujetos menores de 45 años.

	Casos(n=127)	Controles(n=127)	p*
Genotipo, n(%)			
4G/4G +4G/5G	73(57.48)	55(43.3)	0.032
5G/5G	54(42.52)	72(56.7)	
4G/4G	9(7.1)	17(13.4)	0.024
4G/5G	64(50.4)	38(30)	
Frecuencia alélica, n(%)			
4G	82(32.3)	72(28.4)	
5G	172(67.7)	182(71.6)	

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.

Isordia y cols. 2009

*Prueba de la χ^2

En el análisis multivariado de regresión logística, demostraron que cuatro variables mantuvieron su independencia como factores de riesgo para IAMCEST. Se demostró un incremento en el riesgo para IAMCEST de 2.29 veces mayor en los portadores de por lo menos un alelo 4G (4G/4G + 4G/5G), el tabaquismo, antecedente de enfermedad cardiovascular e hipertensión arterial, también confieren incremento en el riesgo de padecer la enfermedad en este grupo de pacientes (Tabla 4).

TABLA 4. Odds ratio (OR) ajustado de infarto de miocardio para el alelo 4G en sujetos menores de 45 años.

Variable	OR(IC del 95%)	p
Diabetes mellitus	1.26(0.40-3.97)	0.69
Dislipidemia	0.87(0.27-2.77)	0.82
Alelo 4G	2.29(1.12-4.68)	0.022
Hipertensión	5.42(1.67-17.56)	0.005
Tabaquismo	23.23(8.92-60.47)	<0.001
Antecedente familiar	4.66(2.06-10.52)	<0.001

Isordia y cols. 2009

También demostraron que los sujetos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G) presentaron las concentraciones plasmáticas más altas de PAI-1, dicho incremento se ha asociado con IM, por lo que el alelo 4G es un factor independiente de aparición de IAMCEST en sujetos jóvenes, al igual que otros factores de riesgo tradicionales. Debido a los trabajos realizados anteriormente, aún existen datos contradictorios sobre la relación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen PA1-1 y el desarrollo de IM en nuestra población adulta mayor; algunos estudios han demostrado incremento y otros, disminución ó no han podido confirmar asociación alguna. Existen diferencias en las frecuencias alélicas del polimorfismo 4G/5G entre las diversas poblaciones del mundo, registrándose un porcentaje mayor del alelo 4G entre la asiática (59%), la caucásica (51%), la española (47%), india con (54%), mexicana (34%), mestiza mexicana (32%) y africana (25%)(Tabla 5). Esto contribuye a presentar diferencias en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades cardiovasculares entre los grupos poblacionales, siendo los porcentajes mayores en los caucásicos con un (20-25%) y los amerindios (15-20%) y la más baja en africanos (1-5%)(44).

Debido a la baja frecuencia del alelo 4G en nuestra población y a la variabilidad en la frecuencia del polimorfismo 4G/5G, decidimos evaluar también su participación en el desarrollo del IM en sujetos mayores de 45 años, y poder establecer interacciones entre los polimorfismos y el desarrollo de IM, así como su posible asociación con otros factores como son diabetes, hipertrigliceridemia y el denominado síndrome metabólico, por lo que un mejor entendimiento de las interacciones gen-ambiente contribuiría a mejorar el manejo terapéutico de los pacientes con enfermedad vascular coronaria (IM).

Tabla 5. Comparación de la distribución genotípica y frecuencia alélica en el polimorfismo 4G/5G entre otras poblaciones y la Mestiza Mexicana.

País	n	Genotipos de PAI-1			Alelos	
		4G/4G	4G/5G	5G/5G	4G(%) (n)	5G(%) (n)
México (Mestiza Mexicana)	127	7.08(9)	50.39(64)	42.51(54)	32.28(82)	68.26(172)
México	110	14.55(16)	39.09(43)	46.36(51)	34.09(75)	65.91(145)
USA (Indios Pima)	132	26.52(35)	48.48(64)	25.00(33)	50.76(134)	49.24(130)
USA	495	26.90(133)	49.90(247)	23.20(115)	51.82(513)	48.18(477)
China	103	35.90(37)	46.00(48)	17.50(18)	59.22(122)	40.78(84)
España	100	21.00(21)	52.00(52)	27.00(27)	47.00(94)	53.00(106)
Irlanda	65	26.15(17)	46.16(30)	27.69(18)	49.23(64)	50.77(66)
Francia	179	26.26(47)	49.72(89)	21.40(43)	51.12(183)	48.88(175)
Alemania	951	28.90(275)	49.40(473)	21.40(203)	53.79(1023)	46.21(879)
Inglaterra	89	27.00(24)	49.00(44)	24.00(21)	51.69(92)	48.31(86)
Holanda	137	26.00(35)	51.00(70)	23.00(32)	51.09(140)	48.91(134)
Holanada	131	27.00(35)	53.00(69)	21.00(27)	53.05(139)	46.95(123)
Italia	981	24.36(239)	50.26(493)	25.38(249)	49.49(971)	50.51(991)

Ruiz Quezada S. y cols. 2004

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad arterial coronaria representa una de las causas más importante de morbi-mortalidad en el mundo; y en México es una de las primeras causas de muerte, por lo que constituye un problema de salud pública. Sin embargo, en nuestro país sólo se consideran como factores de riesgo para el desarrollo de IM, a la presencia de factores ambientales o algunas enfermedades como son: la hipertensión arterial sistémica (HAS), *Diabetes mellitus* (DM), tabaquismo, sedentarismo, dislipidemia, obesidad y la hiperfibrinogenemia. Por otra parte, se ha establecido un tipo de alteraciones genéticas denominadas polimorfismos, las cuales, al ser heredadas, contribuyen al desarrollo del IM. Dichos polimorfismos están presentes en algunas proteínas que constituyen el sistema hemostático, como el localizado en el gen que codifica la proteína enzimática del inhibidor-1 del activador del plasminógeno (PAI-1), cuya molécula se encarga de llevar acabo la actividad fibrinolítica endógena del organismo y, por lo tanto, eliminar la presencia del coágulo que se ha formado en exceso, y cuya función deja de ser hemostática.

Debido a que en nuestro país sólo se cuenta con informes acerca de la prevalencia del polimorfismo 4G/5G en el gen PAI-1 en pacientes con IAMCEST menores de 45 años, pero no con informes de éste polimorfismo en población mayor de 45 años, sólo contamos con resultados generados en otros países, la mayoría de ellos genéticamente diferentes a nuestra población, es importante determinar la participación de dicho marcador genético en ésta población como posible contribuyente para el desarrollo de IAMCEST, así como su posible asociación con otros factores de riesgo establecidos y de ésta manera, tener un mejor entendimiento de la relación entre factores genéticos y ambientales.

Planteamiento del problema

Pregunta de investigación

1. ¿Cual es la asociación del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor-1 del activador del plasminógeno con el desarrollo de IAMCEST y factores de riesgo establecidos (hipertensión, diabetes, tabaquismo, obesidad y dislipidemia en pacientes con una edad de 45 a 65 años?

Hipótesis

Los pacientes con IAMCEST con una edad de 45 a 65 años, no presentan asociación con el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo1(PAI-1).

Objetivo general

Determinar la asociación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) y la presencia de IAMCEST en pacientes con edad de 45 a 65 años.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de la investigación

Estudio de casos y controles.

Universo de trabajo

Pacientes que ingresaron al servicio de Urgencias del Hospital de Cardiología del CMN Siglo XXI del IMSS, con diagnóstico clínico, electrocardiográfico y por laboratorio de infarto miocárdico de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Europea de Cardiología, el Colegio Americano de Cardiología y la Organización Mundial de la Salud.

Grupos de estudio

- A) Sujetos sin presencia de infarto miocárdico (controles).
- B) Pacientes con diagnóstico de Infarto Miocárdico (casos).

Criterios de inclusión

- 1.- Pacientes de ambos géneros.
- 2.- Mayores de 45 y menores de 65 años.
- 3.- Sujetos con y sin diagnóstico de IAMCEST.

Criterios de no inclusión

Pacientes con enfermedades trombofílicas conocidas, valvulopatías y cardiopatías congénitas asociadas conocida.

Tamaño de la muestra

- Valor delta (diferencia entre el grupo de pacientes con IAMCEST y el grupo control).
- Nivel alfa (error tipo 1) 0.05.
- Nivel beta (error tipo 2) 80%
- Intervalo de Confianza 95%.
- Se realizó un cálculo de 150 muestras de pacientes con diagnóstico de IAMCEST y 150 muestras de sujetos sin IAMCEST (controles) teniendo una frecuencia del 20% en el grupo expuesto.

Especificación de las variables

Dependiente

-Presencia de polimorfismo.

Independiente

-Presencia de IAMCEST.

Definición operacional de las variables

-**Diabetes mellitus:** Sujetos con una determinación de glucemia en ayunas mayor a 126 mg/dl o con tratamiento médico previo con hipoglucemiantes.

-**Dislipidemia:** Sujetos con una determinación de concentración de colesterol mayor a 200 mg/dl o tratamiento médico establecido.

-**Hipertensión arterial sistémica:** Sujetos con una cuantificación de presión arterial sistólica de 140 mmHg y diastólica de 90 mmHg o tratamiento médico antihipertensivo previamente establecido.

-**Tabaquismo:** La presencia del hábito de inhalar el producto de la combustión de tabaco. Puede ser activo o pasivo. Se medirá con la presencia o ausencia del mismo.

-**Polimorfismo:** La inserción/delección de una base guanina (G) en la región promotora en la posición 675, dando como resultado la presencia de los alelos 4G o 5G.

-**Antecedentes Heredo Familiares (AHF):** Positivo para enfermedad cardiovascular si un familiar de primer grado presentó la enfermedad arterial coronaria o muerte súbita. Si el familiar era del sexo femenino éste evento debió presentarse antes de los 65 años y se era del sexo masculino, antes de los 55 años de edad.

Procedimientos:

Se realizó una base de datos de todos los participantes, mediante la aplicación de un cuestionario que incluyó datos personales (dirección, teléfono, estado civil. etc.), posteriormente se les realizó un estudio clínico y la extracción de la muestra sanguínea, para la obtención de suero, plasma y células mononucleares para la extracción del DNA. Se tomaron 10 mL de sangre total de la vena antecubital (teniendo cuidado de que el torniquete no fuera aplicado con mucha tensión), la cual fue colectada en un tubo conteniendo EDTA, que se centrifugó a 2500 g por 10 minutos. Posteriormente, la capa superior (plasma) se retiró cuidadosamente tratando de no perturbar la siguiente capa, en donde se localiza el contenido de células mononucleares (buffy coat), la cual se transfirió con una pipeta de transferencia de plástico estéril a un tubo eppendorf de 1.5 mL libre enzimas (RNasas y DNasas). Finalmente el concentrado eritrocitario se desechó en un contenedor destinado para material infectocontagioso (residuos peligrosos).

Extracción de DNA: Para la extracción de DNA se utilizó un kit comercial de la marca Qiagen (QIAamp DNAMini Kit, Hilden Alemania), Las muestras se procesaron de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se descongelaron las muestras a 56° C en baño seco. En un tubo de plástico eppendorf estéril de 1.5 ml. libre de enzimas (RNasas y DNasas) se adicionó 40 µL del inhibidor de proteasas (hasta el fondo del tubo). Posteriormente se adicionaron 450 µL de la muestra de células mononucleares (buffy coat), previamente descongeladas, se agitó vigorosamente en vortex por 15 segundos, se adicionaron 450 µL de buffer de lisis (AL), nuevamente se mezcló vigorosamente en vortex por 15 segundos, se incubó en baño seco a 56° C por 10 minutos, después de la incubación se mezcló nuevamente vigorosamente en vortex por 15 segundos. Posteriormente se adicionó 450 µL de etanol (96-100%), se agitó la mezcla vigorosamente en vortex por 15 segundos, se transfirieron 500 µL de la mezcla anterior a una columna QIAamp, y se centrifugó por 4 minutos a 14,500 rpm, se desechó el filtrado y se adicionó el volumen restante de la mezcla a la columna, aproximadamente 450 µL, nuevamente se centrifugó por 4 minutos a 14,500 rpm y posteriormente se desechó el filtrado.

Se removió la columna a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, estéril. Se adicionaron 550 µL de regulador de lavado (AW1), y se centrifugó por 4 minutos a 14,500 rpm a temperatura ambiente, al terminar se desechó el filtrado. Posteriormente se removió nuevamente la columna a otro tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se adicionaron 550 µL de regulador (AW1), se centrifugó por 4 minutos a 14,500 rpm a temperatura ambiente y, se desechó el filtrado, (es necesario un tercer lavado con 400 mL de regulador AW1 si el filtrado aún no es totalmente transparente). Se transfirió la columna a otro tubo estéril de 1.5 ml y se adicionaron 600 mL de buffer AW2 y se centrifugó por 7 minutos a 14,500 rpm, posteriormente se transfirió la columna a otro tubo estéril de 1.5 mL, de fondo cónico, se adicionó 150 µL de regulador de eluido (AE) al centro de la membrana de la columna. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 8 minutos y posteriormente se centrifugó por 4 minutos a 14,500 rpm a temperatura ambiente. Finalmente el DNA eluido se colectó en dos tubos eppendorf estériles con, 75 µL cada uno y se conservó a -70° C hasta que se realizaron las pruebas de pureza e integridad del DNA y su posterior uso para la amplificación de los segmentos correspondientes.

Determinación de pureza del DNA:

Se realizó la medida de la absorbancia a dos longitudes de onda: UV 260 nm 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 DNA. Si este valor se encuentra entre 1.8 – 2.0, el DNA obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por debajo de 1.8, indican contaminación (Miller, 1988).

Determinación del genotipo del PAI-1: Una vez extraído el DNA, se llevó a cabo la amplificación, por medio del uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), bajo las siguientes condiciones para la búsqueda del polimorfismo 4G/5G el gen del PAI-1: Para la reacción de PCR se utilizó un oligonucleótido (sentido) [5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3'] y un oligonucleótido contrasentido [5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3'] (Margoglione M et al 1997). La amplificación de cada una de las reacciones se realizó, por corrimiento electroforético, en un gel de agarosa (Promega) al 4%; se visualizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta,

por medio del siguiente patrón de bandas 98 pb antes y después de la restricción con la enzima de restricción *Bst* I (New England Biolabs) si la muestra era positiva para el alelo 4G, dos bandas posteriores a la restricción de 98 pb y 77 pb si la muestra era positiva para la presencia del polimorfismo 4G/5G y sólo una banda posterior a la restricción de 77 pb si la muestra era homocigoto para el alelo 5G.

La PCR se realizó en una mezcla de reacción en un volumen de 50µL que contenía: 1µg de DNA, 0.06 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 1.25 U/L de la enzima Taq DNA polimerasa (Promega), regulador para la enzima de restricción 1X, MgCl₂ 1.5 mM (Promega) y 0.1 mM de cada uno de los dNTP (Promega). La mezcla de reacción se llevó a un termociclador (Applied Biosystem Thermal Cycler 2720) bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial de 1 ciclo a 94° C por 3 minutos, seguido de la amplificación durante 30 ciclos para la desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineación de 60° C por 30 segundos y una extensión de 72° C por 30 segundos, con una extensión final a 72° C por 1 min. El fragmento amplificado del polimorfismo 4G/5G del promotor del PAI -1 fue digerido por dos horas y 30 minutos a 55° C con 3 U de la enzima específica de restricción *Bst* I.

Para la identificación de los fragmentos polimórficos, se procedió a su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 4%; posteriormente se tiñó con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL; y se visualizó usando un transiluminador de luz ultravioleta, cuya imagen fue grabada en un film. Cada paciente fue clasificado en uno de los tres grupos: 4G/4G, 4G/5G o 5G/5G.

Los estudios bioquímicos de: glucosa, troponina, hematocrito, leucocitos, creatin fosfocinasa y su fracción MB (CK-MB), deshidrogenada láctica (DHL), fibrinógeno, plaquetas, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), se realizaron en el laboratorio clínico del Hospital de Cardiología de CMN SXXI del IMSS, mediante equipos automatizados, con técnicas establecidas y personal capacitado para la realización de dichas pruebas.

Análisis estadístico de los datos

Las variables continuas se expresan como medias \pm desviación estándar; las variables categóricas, en porcentajes. Las diferencias entre las variables continuas se determinaron mediante la prueba de t de Student y entre las variables categóricas, mediante la prueba de χ^2 ó prueba exacta de Fisher para proporciones. El riesgo independiente se estimó mediante el uso de la prueba estadística del análisis multivariado de regresión logística (Razón de momios e intervalo de confianza (IC) del 95% entre los factores de riesgo cardiovasculares convencionales, y la presencia del IAMCEST. Se consideró que había diferencia estadística cuando el valor de p fue \leq 0.05. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 13 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Estados Unidos) y EpiInfo versión 3.3.2. 2005.

Aspectos éticos

Con relación a los aspectos éticos, a todos los participantes se les explicó y entregó la Hoja de Consentimiento Informado antes de ser incluidos en el estudio. El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación del Hospital de Cardiología del CMN SXXI, conforme a los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los principios éticos para la investigación que involucra sujetos humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964), modificada en Tokio, Japón (1975). Dicha declaración 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 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, proteger la vida, la salud y la dignidad del ser humano.
3. En cualquier investigación con seres humanos, cada paciente potencial debe estar debidamente informado respecto de los objetivos, métodos, fuente de los fondos, cualquier conflicto de intereses, afiliaciones institucionales del investigador; del mismo modo, de los beneficios anticipados y peligros potenciales del estudio; también de la incomodidad que el estudio pueda implicar. Se le debe informar que tiene plena libertad de rehusarse a participar en el estudio, y que dicha libertad alcanza la facultad de retirar su consentimiento para participar en el estudio en cualquier momento, sin ningún tipo de represalias. 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 se debe documentar de manera formal y se debe dar testimonio del mismo.

4. El médico deberá informar al paciente acerca de los aspectos de la atención profesional que se relaciona con la investigación. La negativa del paciente a participar en un estudio nunca ha de interferir con la relación médico-paciente.

III. RESULTADOS

Se estudiaron 150 pacientes con diagnóstico de IAMCEST con una edad de 45 a 65 años, que ingresaron consecutivamente al servicio de urgencias del Hospital de Cardiología del CMN SXXI, y 150 muestras de sujetos sin IAMCEST que formaron el grupo control. Se realizó la descripción de las características demográficas de las variables estudiadas en ambos grupos, obteniendo los siguientes resultados: Ambos grupos fueron apareados por edad y sexo por lo que no se encontró diferencias estadísticamente significativas en estas variables. El género predominante fue el masculino en ambos grupos. Respecto al índice de masa corporal, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas. Respecto a las variables clínicas estudiadas, el porcentaje de *diabetes mellitus* en el grupo control fue de 13.8% y en el grupo de estudio de 52.6% obteniendo una diferencia significativa de $p < 0.0001$. El porcentaje de sujetos hipertensos en el grupo control fue de 28.0%, mientras que el grupo con IAMCEST fue de 56.6% obteniendo diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.0001$. El porcentaje de tabaquismo en el grupo control fue de 44.6% y en el grupo de estudio fue de 61.3% con un valor de $p < 0.001$. En relación a la dislipidemia en el grupo control se obtuvo un porcentaje de 36.0% mientras que en el grupo con IAMCEST fue de 53.3% con una diferencia estadística significativa de $p < 0.001$. El porcentaje de antecedentes heredo familiares para enfermedad arterial coronaria en el grupo control fue 18.3%, y en el grupo con IAMCEST fue de 30.0% obteniendo un valor de $p < 0.02$. La localización más frecuente del IAMCEST en éstos pacientes, correspondió a la pared anterior con un 54.7%, todos estos resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Características clínicas y demográficas de pacientes con IAMCEST y controles > 45 años.

	Pacientes con IAMCEST (n=150)	Controles (n=150)	Valor de p
Edad, años	57.3 ±3.2	55.4 ±4.6	NS ^a
Sexo, masculino (%)	132 (88)	121 (84.6)	NS ^b
Femenino (%)	18 (12)	29 (19.4)	
IMC (kg/m ²)	31.5± 1.2	29.7 ± 1.7	NS ^a
Diabetes Mellitus n (%)	79 (52.6)	45 (13.8)	<0.0001 ^b
Hipertensión n (%)	85 (56.6)	42 (28.0)	<0.0001 ^b
Tabaquismo n (%)	92 (61.3)	67 (44.6)	<0.001 ^b
Dislipidemia n (%)	80 (53.3)	54 (36.0)	<0.001 ^b
HF de EAC	45 (30)	28 (18.3)	<0.02 ^b
Localización del Infarto %			
Pared anterior	54.7	--	
Pared posterior	41.7	--	
Posterolateral	3.6	--	

^aPrueba de t de student para variables continuas

^bX² o Prueba exacta de Fisher para proporciones

IMC=Índice de masa corporal

HF de EAC=Historia familiar de Enfermedad Arterial Coronaria

NS= No Significativo

Se determinó la pureza e integridad del DNA (presencia o ausencia de degradación del DNA), mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%(Fig.8).

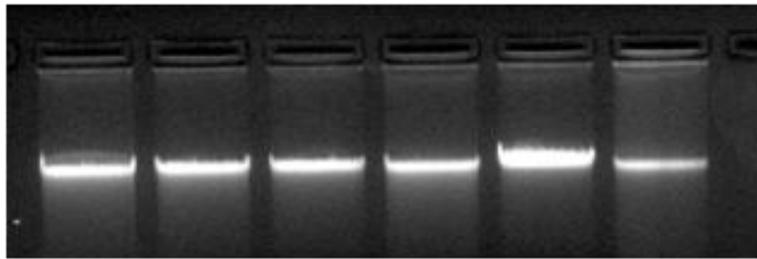


Fig. 8 La imagen nos muestra la integridad del DNA después de su extracción, cuyas bandas representan a seis sujetos incluidos en el estudio.

Se identificó la presencia de los tres genotipos diferentes 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G correspondientes a la inserción/delección 4G/5G del polimorfismo que codifica el gen para la molécula de PAI-1 en ambos grupos (Fig.9).

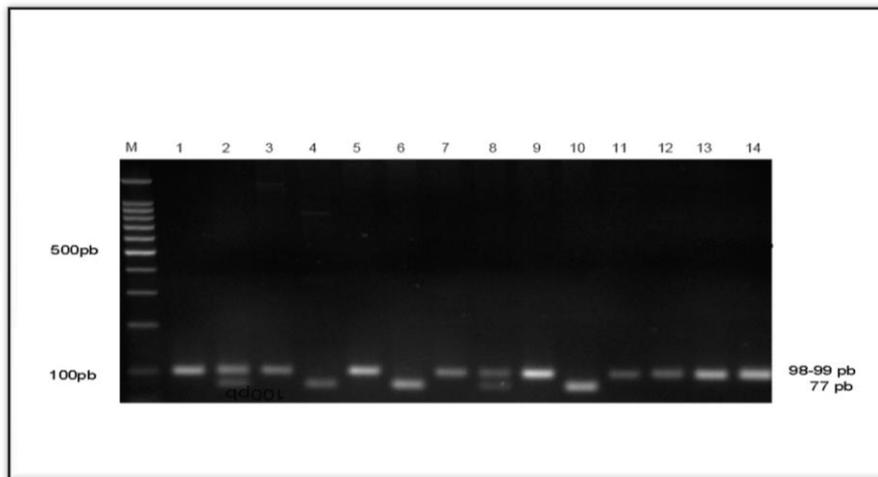


Fig. 9 Análisis del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 en un gel de agarosa correspondiente a la región polimórfica 4G/5G. M representa el Marcador de peso molecular 100 pb; los carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 representan el fragmento amplificado correspondiente a 98-99 pb. Los carriles 4, 6 y 10 representan fragmentos de DNA después de la restricción con la enzima específica Bsl I (77 pb) correspondientes al genotipo 5G/5G; los carriles 2 y 8 representan fragmentos del producto amplificado digeridos (98 y 77 pb) correspondientes al genotipo 4G/5G y los carriles 12 y 14 representan fragmentos del producto amplificado (98 pb) correspondientes al genotipo 4G/4G.

Respecto a la distribución genotípica observada, los resultados fueron los siguientes: En el grupo control el genotipo 4G/4G fue de 9.3%, el 4G/5G (28.0%) y el 5G/5G (62.7%) . La frecuencia alélica para éste grupo control fue el siguiente: para el alelo 4G (23.30%), mientras que el alelo 5G (76.70%). En el grupo de los pacientes con IAMCEST, los resultados obtenidos fueron los siguientes: el genotipo 4G/4G (7.3%), el heterocigoto 4G/5G (33.3%) y el homocigoto 5G/5G (59.4%). La frecuencia alélica en los pacientes con IAMCEST fue: para el alelo 4G (23.95%) mientras que para el alelo 5G (76.05%). No se obtuvo diferencia estadísticamente significativa en relación a la distribución genotípica entre los dos grupos, obteniendo un valor de $p=0.35$. La distribución alélica fue prácticamente igual en ambos grupos por lo que tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p=0.84$. (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución Genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del Plasminógeno tipo1 (PAI-1) entre el grupo de pacientes con IAMCEST y el grupo control.

	Pacientes con IAMCEST n=150 (%)	Controles n=150 (%)	Valor de p
Genotipo			0.35*
4G/4G	11 (7.3%)	14 (9.3%)	
4G/5G	50 (33.3%)	42 (28.0%)	
5G/5G	89 (59.4%)	94 (62.7%)	
Frecuencia Alélica			0.84**
4G	72 (23.95%)	70 (23.30%)	
5G	228 (76.05%)	230 (76.70%)	

*Prueba de Chi cuadrada, la cual se utilizó para determinar la diferencia genotípica entre los grupos de pacientes con IAMCEST, menores y mayores de 45 años.

** Prueba de Chi cuadrada utilizada para la determinación de la frecuencia alélica entre los grupos de pacientes con IAMCEST, menores y mayores de 45 años

En el análisis multivariado de regresión logística, se incluyeron las variables que fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de las cuales persistieron, como factores de riesgo independiente para la presencia de IMACEST: hipertensión arterial OR= 2.53 (IC95%1.08-6.90, $p=0.03$), dislipidemia OR=3.75 (IC95%, 2.15-7.18, $p=0.02$), tabaquismo OR=2.79(IC95%1.76-13.01, $p=0.03$),diabetes mellitus OR=3.78(IC95%1.68-9.64, $p=0.03$) y a antecedentes heredo familiares para enfermedad cardiovascular OR=1.82 (IC95%1.02-3.23, $p=0.04$). El polimorfismo 4G/5G no fue incluido debido a que no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en el análisis univariado (Tabla 8).

Tabla 8. Regresión Logística Múltiple utilizando IAMCEST como variable dependiente en pacientes con edad de 45 a 65 años

Variable	OR (IC 95%)	Valor de P*
Hipertensión	2.53 (1.08-6.90)	0.03
Dislipidemia	3.75 (2.75-7.18)	0.02
Tabaquismo	2.79 (1.76-13.01)	0.03
Diabetes Mellitus	3.78 (1.68-9.64)	0.03
Historia Familiar de ECV	1.82 (1.02-3.23)	0.04

*Chi cuadradas; OR: Riesgo relativo ajustado; EVC= Enfermedad cardiovascular

En relación con la comparación entre la distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en el gen del (PAI-1) entre los grupos de pacientes con IAMCEST menores y mayores de 45 años; encontramos que en el grupo de pacientes con IAMCEST menores de 45 años, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto 4G/5G (50.4%), seguido del homocigoto 5G/5G (42.5%); y el menor para el homocigoto 4G/4G (7.1%). Para el grupo de los pacientes con IAMCEST mayores de 45 años, el genotipo más frecuente fue para el homocigoto 5G/5G (59.4%), seguido del heterocigoto 4G/5G (33.3%) y el más bajo para el 4G/4G (7.3%), encontrando una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con un valor de $p=0.01$. La frecuencia alélica mas baja para el grupo de pacientes con IAMCEST menores de 45 años fue para el alelo 4G (32.30%) y mayor para el alelo 5G (67.70%); mientras que para el grupo de los pacientes con IAMCEST mayores de 45 años la frecuencia más baja fue para el alelo 4G (23.95%) y para el alelo 5G (76.05%) obteniendo diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p=0.03$ entre ambos grupos (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de la distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 entre los grupos de pacientes con IAMCEST menores y mayores de 45 años.

	IAMCEST <45 años n=127 (%)	IAMCEST >45 años n=150 (%)	Valor de p
Genotipo			0.01*
4G/4G	9 (7.1%)	11 (7.3%)	
4G/5G	64 (50.4%)	50 (33.3%)	
5G/5G	54 (42.5%)	89 (59.4%)	
Frecuencia Alélica			0.03**
4G	82 (32.30%)	72 (23.95%)	
5G	172 (67.70%)	228 (76.05%)	

*Prueba de Chi cuadrada, la cual se utilizó para determinar la diferencia genotípica entre los grupos de pacientes con IAMCEST, menores y mayores de 45 años.

** Prueba de Chi cuadrada utilizada para la determinación de la frecuencia alélica entre los grupos de pacientes con IAMCEST, menores y mayores de 45 años

Se realizó la comparación de los factores de riesgo entre los grupos de pacientes con IAMCEST menores y mayores de 45 años, observando que en el grupo de pacientes menores de 45 años el tabaquismo fue de 65.8%, la hipertensión de 43.6%, la *diabetes mellitus* de 36.0%, dislipidemia con 47.6% y los antecedentes heredo familiares de enfermedad arterial coronaria de 42.5%. Mientras que en el grupo de los pacientes mayores de 45 años el tabaquismo registró un 61.3%, la hipertensión un 56.6%, la *diabetes mellitus* un 52.6%, la dislipidemia un 53.3% y los antecedentes heredo familiares con un 30.0% (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de los factores de riesgo entre los grupos de pacientes con IAMCEST menores y mayores de 45 años.

Variable	Casos <45 años (n=127)	Casos >45 años (n=150)
Tabaquismo(%)	65.8	61.3
HAS(%)	43.6	56.6
DM(%)	36.0	52.6
Dislipidemia(%)	47.6	53.3
Historia Familiar de EAC(%)	42.5	30.0

EAC=enfermedad arterial coronaria.

n =número de pacientes.

IV. DISCUSIÓN:

La enfermedad arterial coronaria representa la primera causa de morbi-mortalidad en todo el mundo. En México, el INEGI reportó en el 2007 al Infarto Agudo del Miocardio (IAM) como primera causa de muerte (1). En jóvenes, aproximadamente el infarto agudo del miocardio con elevación del segmento ST (IAMCEST) representa hasta un 10% del total de los infartos registrados. El IAM es una enfermedad multifactorial debida a la interacción entre factores genéticos y ambientales. Los factores de riesgo denominados modificables o ambientales están representados por la *diabetes mellitus*, hipertensión arterial, dislipidemia, tabaquismo, obesidad y sedentarismo (3). Existen diversas variantes genéticas denominadas polimorfismos que han sido identificadas como factores de riesgo para IAMCEST, entre las cuales se encuentra la inserción/delección 4G/5G localizada en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (14).

Un estudio previo en México identificó al polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 como un factor de riesgo independiente en sujetos con IAMCEST menores de 45 años; en dicho estudio se demostró un incremento de riesgo para IAMCEST de 2.29 en los sujetos portadores de por lo menos un alelo 4G (4G/4G + 4G/5G contra 5G/5G) (44). Lo que concuerda con lo previamente demostrado en algunos estudios (45, 46,47). Otros investigadores no han podido demostrar una asociación entre el polimorfismo y el desarrollo de IAMCEST (48,49). Además, demostraron diferencias en las frecuencias de los alelos 4G y 5G. En la mayoría de las poblaciones estudiadas a nivel mundial, la frecuencia mayor corresponde al alelo 4G en comparación con el alelo 5G. Sin embargo, en los sujetos de nuestro grupo control, pudimos observar una frecuencia del alelo 4G del 28%, siendo una de las más bajas reportadas en comparación con las identificadas en otras series, pero similar a la descrita en la población Afro-Americana (25%)(50) y Japonesa (30 %)(51). La baja frecuencia del alelo 4G obtenida en nuestro estudio en el grupo control, concuerda con los resultados previamente obtenidos por Ruiz-Quezada y cols. (52). La población incluida en nuestro estudio (Mestiza Mexicana) es una mezcla de razas indígena, negra y española, lo que podría explicar la diferencia obtenida entre la frecuencia alélica en nuestra población y las otras poblaciones estudiadas.

En el grupo de sujetos con IAMCEST mayores de 45 años, el alelo 4G no representó un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad. No obstante, se registró una alta frecuencia de los factores de riesgo tradicionales como diabetes, tabaquismo, dislipidemia e hipertensión. Esto concuerda con lo publicado previamente por Brscic y cols. (53), quienes demostraron que existen diferencias en la influencia de los factores de riesgo modificables entre los grupos de sujetos jóvenes y adultos mayores, siendo más frecuentes la *diabetes mellitus* y la hipertensión para el desarrollo de enfermedad cardiovascular en las personas mayores, en tanto que, en los jóvenes son el tabaquismo, la dislipidemia y los antecedentes heredo familiares. Lo que podría explicar el mecanismo fisiopatológico de la formación de la placa vulnerable en el joven, la cual tiende a la ruptura, formación del trombo y obstrucción de la luz de la arteria coronaria, debido a un estado de hipofibrinolisis generada por un incremento en el nivel circulante de PAI-1 en los sujetos portadores del alelo 4G. Además, los niveles altos de PAI-1 disminuyen la migración de células musculares lisas lo cual favorece el desarrollo de una placa delgada con un punto de ruptura denominada vulnerable.

La importancia de realizar este estudio en pacientes mayores de 45 años y realizar la comparación entre los dos grupos de edad (menores y mayores de 45 años de edad) radica en esclarecer la participación y posible interacción entre los factores de riesgo ambientales y genéticos donde, como es sabido, éstos últimos cobran mayor importancia en los sujetos jóvenes, como se puede ver en la tabla número 9, donde se demuestra que no existe una significancia estadística cuando se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas en cada uno de los grupos. De igual manera, los factores de riesgo modificables como son hipertensión arterial OR= 2.53 (IC95%1.08-6.90, p=0.03), diabetes mellitus OR=3.78 (IC95%1.68-9.64,p=0.03), tienen más influencia en los adultos mayores; motivo por el cual el diagnóstico, pronóstico y tratamiento deben ser dirigidos de forma diferente en cada grupo de pacientes. Este trabajo permite dilucidar que el desarrollo prematuro de un proceso aterotrombótico, es favorecido por un estado hipofibrinolítico (aumento de la concentración plasmática de PAI-1), en los sujetos portadores del alelo 4G.

También se demuestra que, en forma contraria a los sujetos jóvenes, en los sujetos mayores de 45 años, la exposición prolongada de los factores de riesgo como hipertensión y *diabetes mellitus*, determinan en forma importante la aparición del proceso aterotrombótico, culminando con el desarrollo de IAMCEST. Por otro lado se corrobora que el antecedente de enfermedad cardiovascular, cobra mayor importancia en los sujetos jóvenes en comparación con los adultos mayores, por lo que el establecimiento de las bases fisiopatológicas de la enfermedad coronaria en ambos grupos de edad es importante para poder diseñar nuevas estrategias de tratamiento y con ello mejorar el pronóstico del paciente.

V. CONCLUSIONES:

1. El alelo 4G no representa un factor de riesgo independiente para el desarrollo de IAMCEST en la población Mestiza Mexicana con edad de 45 a 65 años.
2. Los factores de riesgo modificables como tabaquismo, hipertensión, *diabetes mellitus* y dislipidemia representan factores de riesgo independiente para el desarrollo de IAMCEST en población Mestiza Mexicana con edad de 45 a 65 años.
3. En los pacientes con una edad de 45 a 65 años con IAMCEST, los factores de riesgo modificables se presentan en una frecuencia mayor en comparación con lo observado en sujetos menores de 45 años.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

I. Debido a que es el primer estudio en el que se exploró la posible asociación del polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 en forma comparativa entre dos grupos de edad (mayores y menores de 45 años), y en donde se encontró una participación diferente entre los factores de riesgo genéticos y ambientales como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Infarto Agudo del Miocardio con elevación del segmento ST), proponemos las siguientes perspectivas.

1. Complementar la evaluación de la participación del polimorfismo 4G/5G en sujetos con enfermedad aterotrombótica cerebral mayores y menores de 45 años.
2. Realizar la determinación de la concentración plasmática de PAI-1 y genotipificación del polimorfismo 4G/5G en sujetos de alto riesgo como son hipertensos y diabéticos, en tanto que elemento preventivo y diagnóstico en estos pacientes.
3. Investigar en familiares directos la presencia del genotipo 4G/5G como posible factor de riesgo.
4. Evaluar en esta cohorte de pacientes con IAMCEST menores y mayores de 45 años como posible factor de riesgo en el desarrollo de eventos futuros como reinfarto, cuadros de angina, y muerte, ya que seguiremos la evolución de dichos pacientes para establecer un criterio pronóstico.

VII. Anexos

Anexo 1

Definición conceptual de las variables

-Diabetes mellitus: Es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y participación de factores ambientales, la cual se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y grasas.

-Dislipidemia: son una serie de diversas condiciones patológicas cuyo único elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.

-Hipertensión Arterial Sistémica: Enfermedad crónica que se define como la elevación de los niveles de tensión arterial mayor o igual 120 mmHg para la presión arterial Sistólica y 80 mmHg para la presión arterial Diastólica. En el 90% de los casos de etiología desconocida con o sin daños en órganos blancos según la evolución de la historia natural de la enfermedad.

-Tabaquismo: Se conoce como tabaquismo a la práctica de fumar o consumir tabaco en sus diferentes formas y posibilidades. Considerado hoy en día como una adicción y enfermedad, se caracteriza por el consumo abusivo y exagerado del tabaco.

-Polimorfismo: El término Polimorfismo genético se refiere a la presencia de una variación en la secuencia de DNA (alelo) en un gen determinado, ocurrida en una frecuencia mayor al 1% en la población general.

-Antecedentes Heredo Familiares (AHF): La existencia de familiares cercanos o distantes con trastornos génicos los cuales pueden aparecer con diferentes frecuencias en las distintas regiones del mundo.

Anexo 2

HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CMN S.XXI

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha_____

Por medio de la presente yo _____ doy mi autorización a la Dra. Irma Isordia Salas y colaboradores para participar en el estudio de investigación titulado "POLIMORFISMO 4G/5G EN EL GEN DE INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TISULAR TIPO 1 (PAI-1) EN PACIENTES CON INFARTO MIOCÁRDICO MAYORES DE 45 AÑOS Y MENORES 65 AÑOS", mismo que consiste en la toma de muestra sanguínea (10ml) para la determinación de la presencia de dichos polimorfismos mediante técnicas de biología molecular, y forma parte de un estudio integral. Mi participación es voluntaria.

Se me ha explicado ampliamente el procedimiento y debido a que no implica ningún riesgo, firmo de conformidad.

Edad: _____ Sexo: _____ Tel: _____

Peso: _____ Talla: _____ Sedentarismo: _____

DM: _____ HAS: _____ Tabaquismo: _____

ALCOHOLISMO: _____

ANTECEDENTES HEREDITARIOS ATEROTROMBÓTICOS:

EVC: _____ IAM: _____ OTROS: _____

Firma del voluntario _____

HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CMN SIGLO XXI
HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

PROTOCOLO: “ POLIMORFISMO 4G/5G EN EL GEN DE INHIBIDOR 1 DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO (PAI-1) EN PACIENTES CON INFARTO MIOCÁRDICO MAYORES DE 45 AÑOS Y MENORES DE 65 AÑOS”.

Nombre: _____

No. Afiliación: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Tel: _____

Peso: _____ Talla: _____ Sedentarismo: _____

DM _____ HAS: _____ Tabaquismo: _____

CK _____ CK-MB _____ DHL _____

Troponina _____ HDL _____ VLDL _____

Micro albuminuria _____ LDL _____

Glucosa: _____ Colesterol: _____

Triglicéridos: _____ Fibrinógeno: _____

Hemoglobina: _____ Hematocrito: _____

Leucocitos _____ Plaquetas _____

Presión diastólica _____ Presión sistólica _____

Medicamentos antihipertensivos: _____

Medicamentos hipoglucemiantes: _____

Otro tipo de medicamentos _____

Colocación de stent: _____

Realización de angioplastía: _____

Polimorfismo en el gen del PAI-1: Presente Ausente

4G/4G

4G/5G

5G/5G

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Dirección General de Información y Desempeño. Base de datos sobre mortalidad general. INEGI/SSA. Principales causas de mortalidad nacional 2007. Secretaría de Salud.
2. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med*. 1999; 340: 115-126.
3. Kullo IJ, Gau GT, Tajik A. Novel risk factor for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 369-380.
4. Ambrose JA, Weinrauch M Thrombosis in ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 1996;156:1382-1394.
5. Gullan, CL, Todd J: Strategies in complex disease mapping. *Curr Opin Genet Dev*. 2000, 10; 330-334.
6. Thordarson O, Fridriksson S. Aggregation of deaths from ischemic heart disease among first-and second-degree relatives of 108 males and 42 females with myocardial infarction. *Acta Med Scand* 1977; 205: 493-500.
7. Rose G. Familial patterns in ischemic hearts disease. *Br J Prev Soc Med*. 1964; 19: 75-80.
8. 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.
9. Jorde LB, Williams RR. Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variabl. *Am J Cardiol* 1988; 62: 708-713.
10. Rissanen AM. Familial occurrence of coronary heart disease: Effect of age at diagnosis. *Am J Cardiol* 1979; 44: 60-66.
11. 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.
12. Berg K. The genetics of the hyperlipidemias and coronary artery disease. *Prog Clin Biol Res* 1982; 103: 111-125.
13. Sorensen TI, Nielsen G, Andersen OK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptee. *N BNG J Med*. 1988; 318: 727-732.

14. Ericsson P, Tallin B, van' Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 1851-1855,
15. Scaglione L, Bergeroe S, Gaschino G, Imazio M, Maccagnani A, Gambino R, Cassader M, Di Leo M, Macchia G, Brusca A, Pagano G, Cavello-Perin P. Lack of relationship between the PI^{A1/A2} polymorphisms of platelet glycoprotein IIa and
16. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
17. Sprengers ED, Kluft C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood* 1987; 69: 381-387.
18. Kruithof EKO. Plasminogen activator inhibitors-a review. *Enzyme* 1988; 40: 113-121.
19. Lindhal TL, Ohlsson PI, Wiman B. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem J* 1990; 265: 109-113.
20. Owensby DA, Morton PA, Wun TC, Schwartz AI. Binding of plasminogen activator type-1 to extracellular matrix of Hep G2 cells: evidence that the binding protein is vitronectin. *J Biol Chem* 1991; 266: 4334-4340.
21. Kruithof EKO, Nicolosa G, Bachmann F. Plasminogen activator inhibitor 1: development of a radioimmunoassay and observations on its plasma concentrations during venous occlusion and after platelet aggregation. *Blood* 1987; 70: 1645-1653.
22. Sprengers ED, Akerman JWN, Cansen BG. Blood platelet plasminogen activator inhibitor; two different pools of endothelial cell type plasminogen activator inhibitor in human blood. *Thromb Haemost* 1986; 55: 325-329.
23. Gelehrter TD, Sznycer-Laszuk R. Thrombin induction of plasminogen-activator-inhibitor in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; 77: 165-169.
24. Yepes Manuel, David J. Loskutoff, Daniel A. Lawrence: Plasminogen activator (Chapter 19) 2005; 365-375.
25. Raikkonen K, Lassila R, Kelitkangas-Jarvinen L, Hautanen A. Association of chronic stress with plasminogen activator inhibitor-1 in healthy middle aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16: 363-367.
26. Cho SH, Ryu CH, Oh CK. Plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of asthma. *Exp Biol Med* 2004; 229: 138-146.

27. Kitching AR, Kong YZ, Huang XR, Davenport P, Edgton KL, Carmeliet P, Holdsworth SR, Tipping PG. Plasminogen activator inhibitor is a significant determinant of renal injury in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: 1487-1495.
28. Mesters RM, Florke N, Ostermann H, Kienast J. Increase of plasminogen activator inhibitor levels predict outcome of leukocytopenic patients with sepsis. *Thromb Haemost* 1996; 75: 902-907.
29. Cimminiello C. Tissue type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1993; 342:48-49.
30. Lijnen HR, Van Hoef B, Umans K, Collen D. Neointima formation and thrombosis after vascular injury in transgenic mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). *J Thromb Haemost* 2004; 2: 16-22.
31. Eren M, Painter CA, Atkinson JB, Declerck PJ, Vaughan DE. Age dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation* 2002; 106: 491-496.
32. Heymans S, Luttmann A, Nuyens D, Theilmeier G, Cremers E, Moonen L, Dypersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Kheshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevent cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999; 10: 1135-1142.
33. Wiman B, Ljunberg B, Chmielewska J, Urden G, Blomback M, Jahnsson H. The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. *J Lab Clin Med* 1985; 105:265-270.
34. Thøgersen AM, Janson JH, Boman K. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998; 89: 2241-2247.
35. Juhan-Vague I, Alessi MC, Vague P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 1991; 34: 457- 462.

36. Nilsson L, Gafvels M, Musakka L. VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor. *J Lipid Res* 1999; 40: 913-919.
37. Festa A, D' Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes; The Insulin Resistance Atherosclerosis study. *Diabetes* 2002; 51: 1131-1137.
38. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very low density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 20-26.
39. Sironi L, Mucconi L, Prati L. Plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis and mRNA expression in HepG2 cells are regulated by VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 89-96.
40. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 18: 152-156.
41. Iwai N, Shimoike H, Nakamura Y, Tamaki S, Kinoshira M. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 1998; 126: 109-114.
42. Ye S, Green FR, Scarabin PY. The 4G/5G genetic polymorphisms in the promoter of the plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1995; 74: 837-841.
43. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpainter K, Stampfer MJ, Miletich IP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphisms in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene a large cohort of US men. *Circulation* 1997; 95: 59-62.
44. Isordia-Salas, Irma; Leños-Miranda, Alfredo; Sainz, Irma M; Reyes-Maldonado, Elba; Borrayo-Sanchez, Gabriela: Asociación entre el polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el infarto agudo de

- miocardio con elevación del ST en pacientes jóvenes. *Rev Esp Cardiol.* 2009; 62(4): 365-372.
45. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1998;80:1029-30.
 46. Hamsten A, Wiman B, De Faire U, Blomback M Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl Med.* 1985;313:1557-63.
 47. Nilsson JB, Boman K, Jansson JH, Nilsson T, Naslund U. The influence of acute-phase levels of hemostatic factors on reperfusion and mortality in patients with acute myocardial infarction treated with streptokinase. *J Thromb Thrombolysis.* 2008;26:188-95.
 48. Collet JP, Montalescot G, Vicaute E, Ankriv A, Walylo F, Lesty C, et al. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation.* 2003;108:391-4.
 49. Ding J, Nicklas BJ, Fallin MD, D Rekeneire N, Kritchevsky SB, Pahor M, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene polymorphisms and haplotypes are associated with plasma plasminogen activator inhibitor type 1 levels but not with myocardial infarction or stroke. *Am Heart J.* 2006;152:1109-15.
 50. Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, et al. The role of the t-PAI/D and PAI 4G/5G polymorphisms in Africa-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2000;99:223-30.
 51. Sugano T, Tsuji H, Masuda H, Nakagawa K, Mishimura H, Kasahara T, et al. Plasminogen activator inhibitor-promoter 4G/5G genotype is not a risk factor for myocardial infarction in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998;9:201-204.
 52. Ruiz-Quezada S, Vázquez-Del Mercado M, Parra-Rojas I, Rangel Villalobos H, Best-Aguilera C, Sanchez-Orozco LV, et al. Genotype and allele frequency of PAI-1 promoter polymorphism in healthy subjects from the west of Mexico. Association with biochemical and hematological parameters. *Ann Genet.* 2004;47:155-62.

53. Brscic E, Bergerone S, Gagnor A, Colajanni E, Matullo G, Scaglione L, Cassader M, Gaschino G, Di Leo M, Brusca A, Pagano GF, Piazza A, Trevisan GP. Acute myocardial infarction in young adults: prognostic role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type I receptor, apolipoprotein E, endothelial constitutive nitric oxide synthase, and glycoprotein IIIa genetic polymorphisms at medium-term follow-up. *Am Heart J.* 2000 Jun;139:979-984.