

meses a partir del periodo de hospitalización. Sin embargo, dos no pudieron localizarse durante el seguimiento a los 3 y 6 meses y a los 12 meses otros dos se perdieron. Estos 4 pacientes no se localizaron porque no contestaron las llamadas telefónicas, ni los telegramas enviados. Si cambiaron de domicilio, no nos fué notificado.

Los eventos adversos seguidos en este proyecto fueron: isquemia recurrente, re-IAM, choque y muerte, de los cuales el tiempo y el número de eventos de los pacientes se observan en la Figura 29.

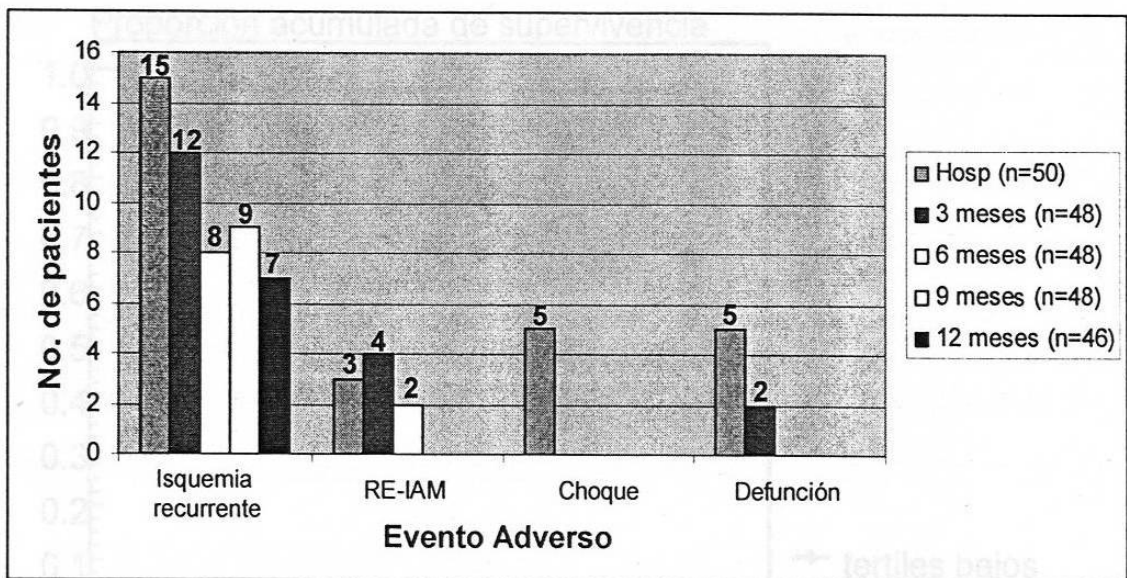


Figura 29.- Gráfica de seguimiento de los pacientes con SCA. El evento Isquemia recurrente fue el más frecuente. Por ejemplo: Tuvieron izquemia: quince pacientes en hospitalización, doce a los 3 meses de seguimiento, ocho a los 6 meses, nueve a los 9 meses y siete a los 12 meses.

Correlaciones estadísticas entre: las variables dependientes (eventos adversos como isquemia recurrente, infarto, etc.) y las variables independientes (hallazgos bioquímicos, hematológicos y genéticos).

La primera correlación que se hizo fue la de analizar la influencia de las variables clínicas, bioquímicas y genéticas en el tiempo de supervivencia de los pacientes con SCA. Encontrando los niveles de fibrinógeno plasmático mayores a 450 mg/dl (Figura 30) y los niveles de leucocitos mayores a 8,500 cel/mm³ (Figura 31), como marcadores de mal pronóstico de supervivencia a un año de seguimiento en estos pacientes.

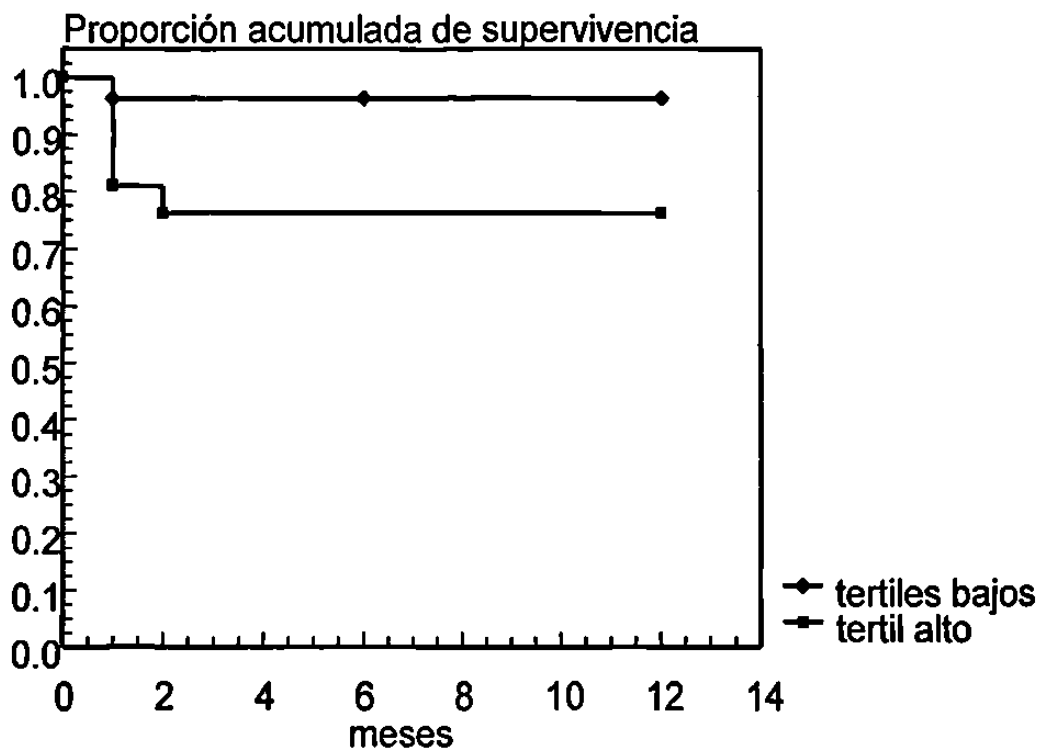


Figura 30. Grafica de Supervivencia de los pacientes con SCA al comparar los niveles del Fg. Se compararon los tertiles de Fg: alto (>450 mg/dl) contra los tertiles bajos (450 a 350 y <350 mg/dl) ($p=0.03$), observándose una menor proporción de supervivencia en los pacientes con los tertiles más elevados.

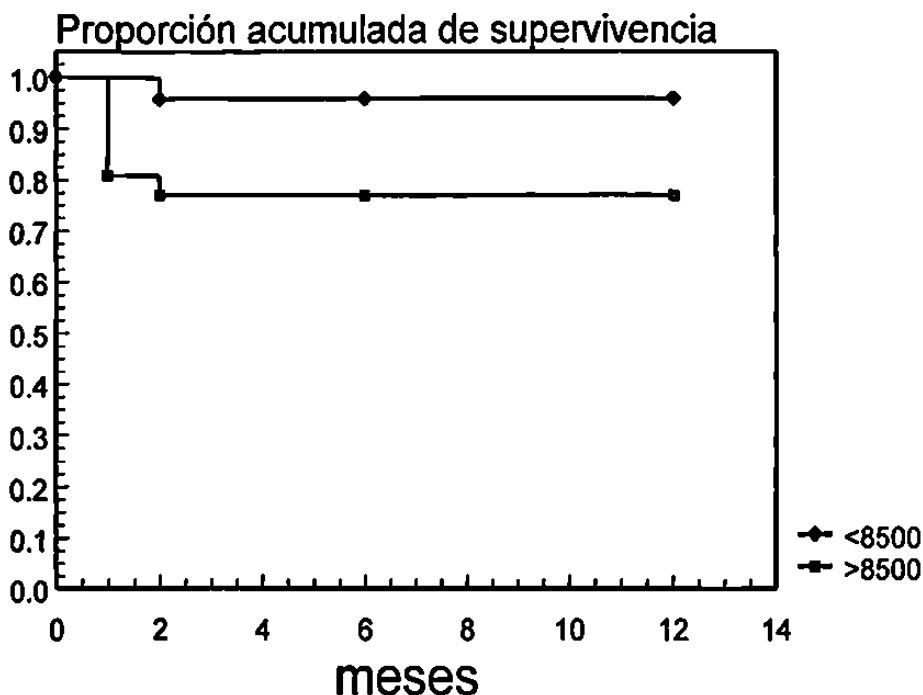


Figura 31. Gráfica de supervivencia de los de los pacientes con SCA al comparar los niveles de leucocitos. Se compararon los niveles mayores de 8,500 cel/mm³ contra niveles menores de 8, 500 cel/mm³ (p=0.05). En contrando menor proporción de supervivencia en los pacientes con leucocitos mayores a 8,500 cel/mm³.

La segunda correlación se realizó usando regresiones logísticas simples, comparando las variables dependientes (angina, re-IAM, Choque y Muerte) contra las variables independientes clínicas, bioquímicas y genéticas, a un año de seguimiento. Encontrándose como marcadores para: a) angina después del SCA, a la carga genética -148 CT/TT del Fg y -717 AG/GG de la CRP; b) re-IAM, a la carga genética del 1691GA+AA; c) Choque, a los niveles de neutrófilos elevados; d) Muerte, al daño del ventrículo derecho; y d) en los eventos adversos totales, a la severidad de la enfermedad (representado por el CATT) (Figura 32).

Var. Independ.	Isquemia OR, P	Re-IAM OR, P	Choque OR, P	Defunción	EAT
-148 CT+TT	2.0, 0.04	---	---	---	---
-717 AG+G	2.0, 0.04	---	---	---	---
1691 AG+GG	---	2.4, 0.01	---	---	---
Neutrofilos	---	---	2.0, 0.04	---	---
Vent. Derecho	---	---	---	1.9, 0.05	---
CATT	---	---	---	---	2.0, 0.04

Figura 32.- Regresión Logística Simple de las variables dependientes a un año de seguimiento de los pacientes con SCA.

Además de estas variables estadísticamente significativas, todas las variables que tuvieron una $p < 0.15$ se utilizaron para hacer los modelos de regresión multivariada logística de cada uno de los eventos adversos de manera individual y en conjunto (EAT).

En el evento angina, la carga genética del -148CT/TT permaneció estadísticamente significativa, mientras que el -717AG+GG no se mantuvo la significancia. Otras variables, como la presencia de CATT y la carga genética del PLA1/PLA2+PLA2/PLA2 que no fueron significativas en la regresión simple en el modelo, adquirieron evidencia estadísticamente significativa en la regresión logística multivariada (Tabla 15).

Para el evento re-IAM y choque, la carga genética del FV(1691AG+GG) y neutrófilos no permanecieron estadísticamente significativos y ningún modelo fue significativo para ellos.

Tabla 15.- Modelo de regresión multivariada logística de isquemia recurrente a un año de seguimiento (p=0.002).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
Hipertensión	0.43	0.58	0.55
CATT	1.81	2.13	0.03
Fg(-455 GA+AA)	-0.42	0.49	0.62
Fg(-148 CT+TT)	1.88	2.03	0.04
GpIIIa (PLA1/PLA2+ PLA2/PLA2)	2.80	2.28	0.02
CRP(-717 AG+GG)	1.44	1.66	0.09

En el evento muerte, el daño en el ventrículo derecho no permaneció estadísticamente significativo, pero la FE y el genotipo Alu I/I, que no fueron significativos en el modelo la regresión simple, adquirieron evidencia estadísticamente significativa en la regresión multivariada (Tabla 16).

Tabla 16.- Modelo de regresión multivariada logística de muerte a un año de seguimiento (p=0.001).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
SCA +ST	2.22	0.96	0.33
Ventric. Der.	1.25	0.73	0.46
FE	-0.02	-1.96	0.04
Neutro >6,500	-2.26	-1.33	0.18
Leucos >8,500	9.45	0.98	0.32
Fg >450	-0.96	-0.97	0.33
Alu I/I	3.37	2.16	0.03

Para los eventos adversos totales (EAT), el CATT no permaneció estadísticamente significativa, pero la carga genotípica del Fg(-148CT/TT) que no fue significativo en el modelo de la regresión simple, adquirió evidencia estadísticamente significativa en el modelo multivariado (Tabla 17).

Tabla 17.- Modelo de regresión multivariada logística de EAT a un año de seguimiento (p=0.04).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
Hipertensión	0.47	0.67	0.49
CATT	1.73	1.31	0.18
Obstrucción >70%	-0.50	-0.38	0.69
-148 CT/TT	1.45	1.91	0.05
Alu I	1.45	1.68	0.09

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron tres cohortes (SCA, ECE, y sujetos sanos) para investigar marcadores genéticos que pudieran ser utilizados como posibles predictores de la evolución clínica a mediano plazo, de sujetos que llegan al servicio de urgencias, con la enfermedad aguda (SCA).

Analizando los datos obtenidos, encontramos que antecedentes familiares (diabetes, SCA y hipertensión), tabaquismo y dislipidemia son marcadores de enfermedad coronaria, lo cual ha sido ya reconocido mundialmente.^{17,184-188}

Las investigaciones epidemiológicas y clínicas demuestran un incremento en las complicaciones trombóticas asociadas a ciertos factores de riesgo cardiovascular, como DM, hiperlipemia y tabaquismo.^{189,190} Algunos estudios clínicos y experimentales han establecido que los factores de riesgo pueden promover el desarrollo de un estado hipercoagulable que actúa como desencadenante de la trombogenicidad sanguínea.^{191,192} Concretamente, se ha descrito en pacientes con SCA, que las cifras elevadas de lípidos predisponen a la ruptura de placas vulnerables, mientras que el tabaquismo predispone a la trombosis aguda.¹⁹³

Se encontraron que las variables bioquímicas como los leucocitos, neutrófilos, fibrinógeno y creatinina están relacionadas a enfermedad coronaria, y para el riesgo de un nuevo evento de SCA sólo leucocitos y neutrófilos se mantuvieron significativos. Además, leucocitos $>8500 \text{ cel/mm}^3$ y Fg $>450 \text{ mg/dl}$ son predictores de mala evolución a un año, a pesar de que estos niveles (con excepción del Fg) se encuentran por debajo de los valores normales de referencia.¹⁹⁴⁻²⁰⁰ Por lo que nos hace pensar en la re-valoración de los niveles normales en estos marcadores. Proponiendo, como ha sucedido para otros factores de riesgo (como el colesterol, glucosa, IMC y medida de la cintura), que éstos tendrían que ser más estrictos (más bajos). Toda esta evidencia nos indica un proceso inflamatorio elevado, con problemas en la función renal, lo que se traduce a un mayor daño en el endotelio con placas ateromatosas más vulnerables, repercutiendo en un mayor riesgo de enfermedad coronaria, nuevos SCA y mal pronóstico de evolución.

Las distribuciones genotípicas de los genes estudiados en la enfermedad coronaria son las primeras que se reporta en el país, encontrando que polimorfismos que son muy importantes para el riesgo cardiovascular en poblaciones caucásicas (principalmente europeas), como el G20210A del FII y G1691A del FV, no representan ningún riesgo e inclusive son muy raros en nuestra población, como se ha demostrado en poblaciones americanas, asiáticas y africanas.²⁰¹⁻²⁰⁵

Tal vez el hallazgo más relevante de este trabajo es el riesgo de sufrir un evento cardiovascular adverso, angina y muerte en los siguientes a doce meses post-SCA, cuando están presentes algunos polimorfismos de la hemostasis. Siendo éste el primer trabajo que reporta esta asociación, según los descritos en la literatura a esta fecha.

Los polimorfismos del Fg(-148C/T y -455G/A) y del FXIII(V34L) son marcadores de enfermedad coronaria, mientras que los de FXIII(V34L) y t-PA(Alu I/D) son marcadores de nuevo evento de SCA. Además, la carga genética del polimorfismo Fg(-148T) y la del GpIIIa (PLA2) son marcadores independientes de isquemia recurrente, y de muerte el t-PA(Alu I/I).

En el caso de los polimorfismos en el promotor del Fg, éstos se correlacionaron con el fenotipo al encontrar asociación independiente al resto de los factores como tabaquismo, dislipidemia, diabetes, edad y sexo. Estos niveles de la proteína son superiores a los reportados por otros trabajos en los que se utiliza el método de Clauss para medir el Fg.^{206,207} En todo caso, las diferencias estadísticas observadas entre los grupos, sugieren estratificaciones fenotípicas que pudieran estar asociadas a riesgo cardiovascular incrementado.

También se observa que los niveles de Fg fueron predictores de muerte durante el seguimiento a un año del grupo SCA y que los valores de esta proteína durante el evento agudo en los sujetos que fallecieron fueron de 468.3 mg/dl (± 185.8 mg/dl). Estos hallazgos se han reportado en poblaciones israelíes,²⁰⁵

japonesa–americana,²⁰⁹ estadounidense²¹⁰ y española.²¹¹ Más aún, al comparar el valor predictivo del Fg con la RCP en pacientes con enfermedad coronaria inestable sin elevación del ST y sin necrosis miocárdica, se observaron resultados similares en la tasas de mortalidad.²¹²

La comparación de cargas genéticas conteniendo a los alelos Fg(-455A y -148T) demuestran asociación con la enfermedad coronaria, siendo lógico pensar que los polimorfismos en el promotor de la cadena β , la cual es la responsable de la regulación de los niveles del Fg, están asociados a la enfermedad. Por ejemplo, el polimorfismo Fg(-455G/A) se ha encontrado asociado a la enfermedad en la mayoría de los grupos étnicos alrededor del mundo,²¹³⁻²¹⁶ aunque reportes como los de Tybjarg-Hansen²¹⁶ y Doggen²¹⁷ no encontraron asociación cuando estudiaron poblaciones danesa y holandesa, respectivamente.

Por otra parte para el polimorfismo Fg(-148C/T) no ha sido definitivamente asociado como determinante de riesgo cardiovascular, aunque recientemente se reportó asociación con IM²⁰⁸ y con la predicción de aterosclerosis en carótidas,³⁷ en una población Asiática. Por lo que este estudio apoya la asociación de este polimorfismo con los SCAs.

En conjunto, los resultados de este trabajo muestran que el alelo Fg(-148T) está íntimamente ligado a valores altos de Fg, a enfermedad coronaria en general y

a eventos adversos post-SCA, y que el alelo Fg(-455A) está asociado a valores altos de Fg y enfermedad coronaria. La asociación simultánea de los alelos Fg(-455A y -148T) concuerdan con la hipótesis de un posible desequilibrio de ligamiento entre estos dos polimorfismos, como se ha reportado para poblaciones caucásicas.^{219,220} Sin embargo el presente estudio no permite establecer esta conclusión.

Los dos polimorfismos que resultaron ser significativos, se ubican en la región promotora del gen FgB, muy cerca del elemento de respuesta a IL-6 y C/EBP y de los sitios HNF1 y HNF3.^{31,215,221-224} Los cuales son esenciales para una respuesta total del promotor a la IL-6, la cual es una citocina responsable de la respuesta inflamatoria, relacionada a niveles elevados de proteínas de fase aguda como el Fg y la Proteína C Reactiva. Por lo que es posible que estos polimorfismos estén involucrados a mayor respuesta del promotor de Fg a los estímulos como disfunción endotelial, trombosis, estrés oxidativo, etc. Lo que explicaría las asociaciones observadas en este estudio.

Con respecto a los hallazgos del polimorfismo del FXIII(V34L) es importante pensar en que el cambio de aminoácido está muy cerca de su sitio de anclaje a la trombina, por lo que es muy importante en la activación del factor. In vitro se ha reportado que el polimorfismo 34L forma coágulos más estables a la fibrinólisis endógena.⁸⁸ Pero que en la clínica es a la inversa, donde el 34V es el asociado a trombosis e IM.^{86,92} Esto se puede explicar debido a la interacción que tiene el FXIII con la estructura del coágulo de fibrina y la función del Fg.

Donde altas concentraciones de Fg, en muestras homocigotos para 34 L, forman coágulos con permeabilidad incrementada y una estructura más laxa, con fibras más densas que los coágulos formados por las muestras homocigotos para 34V. Por lo tanto, un efecto protector del FXIII emerge en presencia de concentraciones de Fg asociadas a riesgo cardiovascular (Figura 33).⁹⁵ En donde el coágulo formado por los niveles elevados de Fg y el alelo V34 del FXIII es menos accesible para la fibrinólisis endógena y exógena.

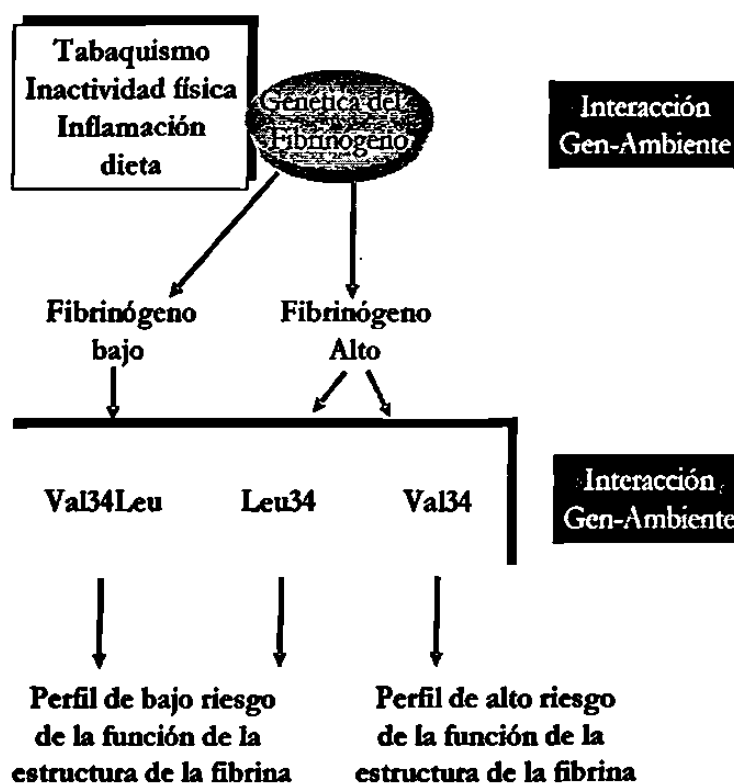


Figura 33.- Interacción niveles de Fibrinógeno y el polimorfismo V34L del FXIII. Se observa un estímulo en el gen del Fg el cual dependiendo de los polimorfismos en su promotor (-148, -455, etc.) los niveles de fibrinógeno serán bajos o altos. Si son bajos no importa el alelo que tenga el paciente, la fibrina formará coágulos más laxos y permeables. Para los niveles elevados de Fg: en presencia del alelo 34L, la fibrina formará coágulos laxos y permeables y con el alelo 34V el coágulo formado es más estable y la permeabilidad se ve disminuida.

Por otra parte los resultados del polimorfismo PLA2 del GpIIIa como marcador de Isquemia recurrente post-SCA, podría explicarse con el hecho que el polimorfismo está en el sitio más importante de unión a Fg, para que se lleve a cabo la adhesión y agregación plaquetaria.⁴⁰ Esto da pie a pensar que este alelo da una mayor hiperactividad a las plaquetas, sin embargo recientemente un estudio *in vitro* encontró que el alelo PLA2 está asociado con una deficiencia en la función de éstas.²²⁴ Lo cual nos hace suponer, como sucede en la interacción FXIII y niveles de Fg, en la hipótesis de que *in vivo* la presencia del alelo PLA2 y niveles elevados de Fg podrían dar como resultado una mayor actividad y estabilidad de las plaquetas con respecto al alelo PLA1. Lo que se traduce en una mayor trombogenicidad.

Por último, si nos basamos en la teoría de que las personas con una capacidad fibrinolítica disminuida están en un riesgo creciente de un MI, pensaríamos que la disminución de los niveles plasmáticos de t-PA, podrían ser un factor de riesgo, y así explicaríamos en nuestro trabajo que Alu I/I es un marcador de muerte post- SCA. En contraste, varios estudios han reportado que el genotipo no correlaciona con los niveles plasmáticos de t-PA.²²⁵⁻²²⁷ La naturaleza de la inserción de una repetición Alu en un intrón del gen t-PA, hace difícil pensar que esta mutación esté afectando los niveles de la proteína, aunque no puede hacerse ninguna aseveración hasta no demostrar si realmente afecta o no los niveles de la proteína,²²⁸ ya que dicho polimorfismo pudiera tener efecto en la estabilidad y/o procesamiento del mRNA.

Actualmente se ha demostrado que es mejor medir los niveles secretados de la proteína (t-PA) por las células endoteliales que medir los circulantes.²³⁰ Debido a que después de la secreción del endotelio vascular la actividad del t-PA se remueve extremadamente rápido de la circulación por la separación de la proteína a través de receptores del hígado, así como por la interacción con PAI-1. De modo que las concentraciones sistémicas del t-PA dependen de la secreción, separación y del complejo que forma con el PAI-1.²²⁹ Además, el t-PA es más potente en la lisis de la fibrina cuando el coágulo ya está formado^{231,232} y los niveles de la secreción por las células endoteliales es mayor a las que está circulante.

Dos estudios han encontrado una asociación entre el polimorfismo Alu I/D y la secreción de la proteína,^{233,234} lo cual nos hace suponer que los pacientes con este polimorfismo tienen una deficiencia en el sistema fibrinolítico, lo que a su vez induciría a una respuesta ineficiente a una trombosis aguda.

Por tanto, paralelamente al concepto establecido de «placa vulnerable» o de «alto riesgo», se puede establecer el concepto de «sangre vulnerable» o de «sangre de alto riesgo» para referirnos al estado pretrombótico asociado a la presencia de polimorfismos en los genes de las proteínas que participan en la hemostasis. Estos factores son capaces de iniciar el proceso aterotrombótico produciendo disfunción endotelial y activando los procesos inflamatorio y trombótico.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

De los resultados aquí presentados, se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- ✓ Los antecedentes familiares (diabetes, SCA y hipertensión), tabaquismo, dislipidemia son factores de riesgo de enfermedad coronaria.
- ✓ El fibrinógeno, Leucocitos, Neutrófilos, Creatinina, Fg(-148T y -455A) y FXIII(34V) son biomarcadores de riesgo de enfermedad coronaria.
- ✓ Los leucocitos, neutrófilos, FXIII(34V) y t-PA(AluI/I) son biomarcadores de riesgo de SCA.
- ✓ Los polimorfismos Fg(-148T y -455A) se asocian independientemente a niveles plasmáticos elevados del Fg.
- ✓ Los niveles >450 mg/dl del Fg y >8500 cel/mm³ de leucocitos son marcadores de mal pronóstico de supervivencia en pacientes con SCA.

- ✓ La enfermedad más severa y la carga genética del -148T del Fg y PLA2 del GPIIIa son marcadores independientes de Isquemia recurrente post-SCA a seguimiento de un año.

- ✓ La FE reducida y el polimorfismo Alu I/II del t-PA son marcadores independientes de muerte post-SCA a seguimiento de un año.

- ✓ La carga genotípica del polimorfismo Fg(-148T) es un biomarcador independiente de EAT.

- ✓ En conclusión, todos estos marcadores clínicos, bioquímicos y genéticos en conjunto podrían ser útiles para una mejor estratificación de riesgo de enfermedad coronaria y de mala evolución de los pacientes post-SCA en nuestra población. Además proporcionan la base para buscar marcadores de resistencia a tratamiento en los pacientes con enfermedad coronaria.

CAPÍTULO IX

PERSPECTIVAS

- Con base a los resultados encontrados en esta investigación, es primordial determinar niveles plasmáticos de RCP altamente sensible, IL-6 y t-PA, para correlacionar los hallazgos genéticos encontrados con los fenotipos, como se realizó con el Fg.
- Analizar un mayor número de pacientes con SCA para poder tener mayores cifras de pacientes en cada uno de los eventos adversos y poder establecer modelos de riesgos para re-IAM y Choque, ya que en este estudio no se pudieron realizar, debido al número tan reducido de casos en cada uno de estos eventos adversos.
- Analizar estos polimorfismos en otras poblaciones mexicanas para ver su comportamiento y establecer si funcionarían como marcadores de eventos adversos y mal pronóstico.
- Analizar las otras rutas metabólicas involucradas en la patofisiología de la enfermedad, como las que implican genes que participan en la disfunción endotelial e inflamación, para poder generar un cardiograma genético de riesgo para la enfermedad coronaria de la población mexicana.

- Y por último se necesita que la detección de los polimorfismos analizados en este estudio y que fueron estadísticamente significativos se realicen con una metodología que permita la identificación rápida de los poliorfismos, como es la tecnica con sondas TaqMan (Q-PCR).

CAPÍTULO X

REFERENCIAS

1. O'Rourke RA, Hochman JS, Cohen MC, Lucore CL, Popma JJ, Cannon CP: New approaches to diagnosis and management of unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Arch Intern Med* 2001;161(5): 674-682.
2. Wiggins BS, Wittkowsky AK, Nappi JM: Clinical use of new antithrombotic therapies for medical management of acute coronary syndromes. *Pharmacotherapy* 2001; 21(3):320-337.
3. Estadísticas demográficas cuaderno número 14, edición 2002, pag 134 [homepage on the Internet]. MEXICO: INEGI. 2004 02/07/04. Available from: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/cuad13/cua-pob14.pdf?
4. Libby P. Atherosclerosis: the new view. *Sci Am.* 2002 May;286:46-55.
5. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. european concerted action on thrombosis and disabilities angina pectoris study group. *N Engl J Med* 1995; 332(10):635-641.
6. Cannon CP, McCabe CH, Diver DJ, Herson S, Greene RM, Shah PK, et al: Comparison of front-loaded recombinant tissue-type plasminogen activator, anistreplase and combination thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 4 trial. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24(7):1602-1610.
7. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. the GUSTO angiographic investigators. *N Engl J Med* 1993; 329(22):1615-1622.
8. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina).: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000; 51(4): 505-521.
9. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3): 970-1062.
10. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000; 102(10): 1193-1209.

11. Kennon S, Price CP, Mills PG, Ranjadayalan K, Cooper J, Clarke H, et al: The effect of aspirin on C-reactive protein as a marker of risk in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(5): 1266-1270.
12. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, Sparks CE, Oakes D, Greenberg H, et al: Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999; 99(19): 2517-2522.
13. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M: Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(4): 1210-1216.
14. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L: Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. *fragmin during instability in coronary artery disease*. *N Engl J Med* 2000; 343(16): 1139-1147.
15. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J; American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. 2004;109:2617-2625.
16. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med*. 2003;253:120-127.
17. Navarro-Lopez F. [Genes and coronary heart disease] *Rev Esp Cardiol* 2002. 55:413-31.
18. Jerjes-Sánchez, Díaz C, Comparan-Núñez A, Ibarra-Flores M, Decanini-Arcaute H, Archondo T. Marcadores Hemostáticos y de Inflamación en Síndromes Coronarios Agudos y su relación con eventos cardiovasculares adversos. *Chest* 2002. 122:177S.
19. Doolittle RF, Spraggon G, Everse SJ. Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8:792-798.
20. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:741-746.
21. Haidaris PJ, Francis CW, Sporn LA, Arvan DS, Collichio FA, Marder VJ. Megakaryocyte and hepatocyte origins of human fibrinogen biosynthesis exhibit hepatocyte-specific expression of gamma chain-variant polypeptides. *Blood*. 1989;74:743-750.
22. Koenig W: Fibrin (ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost* 2003; 89:601-609.
23. Kamath S, Lip GY: Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 2003; 96:711-729.
24. Young E, Prins M, Levine MN, Hirsh J: Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost* 1992; 67:639-643.
25. Cohen M, Arjomand H, Pollack CV Jr: The evolution of thrombolytic therapy and adjunctive antithrombotic regimens in acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Emerg Med* 2004; 22:14-23.
26. Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW: Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet* 1987; 1:1452-1455.
27. Hamsten A, Iselius L, de Faire U, Blombäck M: Genetic and cultural inheritance of plasma fibrinogen concentration. *Lancet* 1987; 2:988-991.

28. Kant JA, Fornace AJ, Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR: Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:2344-2348.
29. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM: Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. *J Biol Chem* 1984; 259:10574-10581.
30. Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, Wilkes HC, Brennan PJ, Meade TW, et al: Variation in the promoter region of the beta fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb Haemost* 1991; 65:487-490.
31. Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M: Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001; 38:1199-1203
32. Fellowes AP, Brennan SO, George PM: Identification and characterization of five new fibrinogen gene polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:536-541.
33. De Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, et al: -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:265-271.
34. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al: Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde. Circulation* 1996; 93:440-449
35. Scarabin PY, Bara L, Ricard S, Poirier O, Cambou JP, Arveiler D, et al: Genetic variation at the beta-fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen concentrations and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:886-891.
36. Berg K, Kierulf P: ADN polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentration. *Clin Genet* 1989; 36:229-235.
37. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K et al. Beta-fibrinogen gene polymorphism (C148T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:487-492.
38. Connor JM, Fowkes FG, Wood J, Smith FB, Donnan PT, Lowe GD. Genetic variation at fibrinogen loci and plasma fibrinogen levels. *J Med Genet* 1992; 29:480-482.
39. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455-> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest* 1997; 99:3034-3039.
40. Beutler E, Lichman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology. Sixth Edition, McGrawHill.* 2001; pag:1418-1419.
41. Kalafatis M, Mann KG. Factor V Leiden and thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:620-627.
42. Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry.* 1992; 31:3777-3785.
43. Kane WH, Davie EW. Cloning of a cADN coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:6800-6804.

44. Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufmann RJ, Mann KG. Complete cADN and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4846-4850.
45. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 1994;269:31869-31880.
46. Nesheim ME, Mann KG. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. *J Biol Chem.* 1979;254:1326-1334.
47. Esmon CT. The subunit structure of thrombin-activated factor V. *J Biol Chem.* 1979;254:964-973.
48. Suzuki K, Dahlbäck B, Stenflo B. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem.* 1982;257:6556-6564.
49. Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Nature.* 1990;29:1118-1128.
50. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:516-530.
51. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68:1370-1373.
52. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest.* 1984;74:2082-2088.
53. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95:1517-1532.
54. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, vander Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
55. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998;91:1135-1139.
56. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 1;90(3):1004-1008.
57. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet.* 1993;342:1503-1506.
58. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1004-1008.
59. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis.* 1994;24:139-151.
60. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet.* 1994;343:1535-1536.
61. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1994;330:517-522.
62. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest.* 1994;94:923-927.

63. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995;346:1133-1134.
64. Chan LC, Bourke C, Lam CK, Liu HW, Brookes S, Jenkins V, Pasi J. Lack of activated protein C resistance in healthy Hong Kong Chinese blood donors--correlation with absence of Arg506-Gln mutation of factor V gene. *Thromb Haemost*. 1996;75:522-523.
65. Rabes JP, Trossaert M, Conard J, Samama M, Giraudet P, Boileau C. Single point mutation at Arg506 of factor V associated with APC resistance and venous thromboembolism: improved detection by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Thromb Haemost*. 1995;74:1379-1380.
66. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1995;332:912-917.
67. Ardissino D, Peyvandi F, Merlini PA, Colombi E, Mannucci PM. Factor V (Arg 506-->Gln) mutation in young survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1996;75:701-702.
68. Cushman M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, Tracy RP. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost*. 1998;79:912-915.
69. Longstreth WT Jr, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke*. 1998;29:577-580.
70. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT Jr, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*. 1997;89:2817-2821.
71. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation*. 1998;97:1037-1041.
72. Kiechl S, Muigg A, Santer P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J. Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Circulation*. 1999;99:614-619.
73. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:216-229.
74. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*. 1986;2:533-537.
75. Hunault M, Arbini AA, Lopaciuk S, Carew JA, Bauer KA. The Arg353Gln polymorphism reduces the level of coagulation factor VII: in vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 2825-2829.
76. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Kluff C, Benedetta Donati M. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 338: 79-85.

77. Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, Manzato F, Mazzucco A, Bernardi F, Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;343:774-780.
78. Lindman AS, Pedersen JI, Arnesen H, Hjerkin EM, Veierod MB, Prydz H, Seljeflot I. Coagulation factor VII, R353Q polymorphism, and serum choline-containing phospholipids in males at high risk for coronary heart disease. *Thromb Res.* 2004;113:57-65.
79. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 1997; 96: 1102-1108.
80. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet.* 1987;13:285-292.
81. Degen SJ, Schaefer LA, Jamison CS, Grant SG, Fitzgibbon JJ, Pai JA, Chapman VM, Elliott RW. Characterization of the cADN coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2. *ADN Cell Biol.* 1990;9:487-498.
82. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet.* 2001;28:389-392.
83. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 584-595.
84. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, von Eckardstein A. Lipoprotein(a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood.* 1999; 94: 3678-3682.
85. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood.* 1997; 90: 1747-1750.
86. Redondo M, Watzke HH, Stucki B, Sulzer I, Biasiutti FD, Binder BR, Furlan M, Lammle B, Wuillemin WA. Coagulation factors II, V, VII, and X, prothrombin gene 20210G-->A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: high factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1020-1025.
87. Inbal A, Freimark D, Modan B, Chetrit A, Matetzky S, Rosenberg N, Dardik R, Baron Z, Seligsohn U. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood.* 1999; 93: 2186-2190.
88. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation.* 1998;97:1037-1044.
89. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 2002; 100: 743-754.

90. Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 704.
91. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood.* 2000; 96: 988–995.
92. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998 Jan;79(1):8-13.
93. Kohler HP, Grant PJ. Clustering of haemostatic risk factors with FXIIIVal34Leu in patients with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998;80:862.
94. Kohler HP, Mansfield MW, Clark PS, Grant PJ. Interaction between insulin resistance and factor XIII Val34Leu in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 1999;82:1202-1203.
95. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet.* 2003; 361: 1424–1431.
96. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood.* 2000; 95: 586–591.
97. Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA. Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica.* 2000; 85: 67–71.
98. Dardik R, Solomon A, Loscalzo J, Eskaraev R, Bialik A, Goldberg I, Schiby G, Inbal A. Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1472–1477.
99. Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997;349:370-371.
100. Lanza F, Kieffer N, Phillips DR, Fitzgerald LA. Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor beta-subunit gene. *J Biol Chem.* 1990;265:18098-18103.
101. Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, van Tuinen P, Ledbetter DH, Nussbaum RL, Kaos FT, Schwartz E, Phillips D, Bennett JS, et al. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest.* 1988;81:1993-1998.
102. Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ. The impact of three-dimensional structure on the expression of PIA alloantigens on human integrin $\alpha 3$. *Blood.* 1995; 86: 234–242.
103. Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997; 349: 370–371.
104. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1090–1094.
105. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PIA polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet.* 1996;348:485-486.

106. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997;349:385-388.
107. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F. The Leu33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde. Thromb Haemost*. 1997;77:1179-1181.
108. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bb448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation*. 1997;96:1424-1431.
109. Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1997;33:693-697.
110. Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIA gene PLA2 polymorphism. *Thromb Haemost*. 1998 Aug;80(2):218-219.
111. Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG; Copenhagen City Heart Study. Platelet glycoprotein IIb/IIIa PI(A2)/PI(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:661-667.
112. Mamotte CD, van Bockxmeer FM, Taylor RR. Pla1/a2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1998;82:13-16.
113. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Association of the platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost*. 1998;80:214-217.
114. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1998;79:731-735.
115. Ludwig M, Wohn KD, Schleuning WD, Olek K. Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. *Hum Genet*. 1992;88:388-392.
116. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cADN in *E.coli*. *Nature*. 1983;301214-301221.
117. Jornvall H, Pohl G, Bergsdorf N, Wallen P. Differential proteolysis and evidence for a residue exchange in tissue plasminogen activator suggest possible association between two types of protein microheterogeneity. *FEBS Lett*. 1983;156:47-50.
118. Yang-Feng TL, Opdenakker G, Volckaert G, Francke U. Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *Am J Hum Genet*. 1986;39:79-87.

119. Degen SJ, Rajput B, Reich E. The human tissue plasminogen activator gene. *J Biol Chem.* 1986 25;261:6972-6985.
120. van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, de Jong PT, Hofman A, Klufft C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation.* 1997; 95: 2623–2627.
121. Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1687–1690.
122. Sartori MT, Saggiorato G, Spiezia L, Varvarikis C, Carraro G, Patrassi GM, Irolami A. Influence of the Alu-repeat I/D polymorphism in t-PA gene intron 8 on the stimulated t-PA release after venous occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9:63-69.
123. Bang CO, Park HK, Ahn MY, Shin HK, Hwang KY, Hong SY. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2001;11:294-299.
124. Booth NA, Bennett B. Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Clin Haematol.* 1994;7:559-572.
125. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Gelehrter TD. cADN cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1673-1680.
126. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart N, Stanislovitis P, Watkins P, Douglas R, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:8548-8552.
127. Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, Cousin E, Genton CY, Bachmann F, Kruthof EK. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1090-1100.
128. Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence. *Circulation.* 1998;97:2213-2221.
129. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1792-1801.
130. Wiman B, Ljungberg B, Chmielewska J, Urden G, Blomback M, Johnsson H. The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombosis. *J Lab Clin Med* 1985;105:265-270.
131. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1741-1745.
132. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241-2247.

133. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.
134. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blombäck M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1985;313:1557-1563.
135. Francis RB Jr, Kawanishi D, Baruch T, Mahrer P, Rahimtoola S, Feinstein DI. Impaired fibrinolysis in coronary artery disease. *Am Heart J* 1988;115:776-780.
136. Juhan-Vague I, Pyke SDM, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation* 1996;94:2057-2063.
137. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989;79:101-106.
138. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, et al. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988;65:635-637.
139. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 1991;11:183-190.
140. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:10739-10745.
141. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1851-1855.
142. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 1995;74:842-847.
143. 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.
144. Sironi L, Mussoni L, Prati L, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis and mRNA expression in HepG2 cells are regulated by VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:89-96.
145. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thromb Haemost* 1995;74:1032-1034.
146. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:33-37.
147. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:152-156.

148. Iwai N, Shimoike H, Nakamura Y, Tamaki S, Kinoshita 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;136:109-114.
149. Ye S, Green FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1995;74:837-841.
150. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.
151. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/5G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphisms is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999;82:1121-1126.
152. Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 1997;77:730-734.
153. 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;80:1029-1030.
154. Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer A C, Greenhough TJ. *Nat Struct Biol* 1996;3:346-354.
155. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure Fold Des.* 1999;7:169-177.
156. Whitehead AS, Bruns GA, Markham AF, Colten HR, Woods DE. Isolation of human C-reactive protein complementary ADN and localization of the gene to chromosome 1. *Science.* 1983;221:69-71.
157. Kushner I, Jiang SL, Zhang D, Lozanski G, Samols D. Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann N Y Acad Sci.* 1995;762:102-107.
158. Verma S, Yeh ET. C-reactive protein and atherothrombosis—beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R1253-R1256.
159. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation.* 2003;108:1917-1923.
160. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111:1805-1812.
161. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001;103:1813-1818.
162. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
163. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective

- analysis from the Women's Health Initiative Observational Study. *JAMA*. 2002;288:980–987.
164. Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation*. 2002;105:2595–2599.
165. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J*. 2000;21:1584–1590.
166. Koenig W, Sund M, Froelich M, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999;99:237–242.
167. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol*. 2002; 55: 445–451.
168. Verma S, Szmitko PE, Yeh ET. C-reactive protein: structure affects function. *Circulation*. 2004 ;109:1914-1917.
169. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 2001;154:681–689.
170. Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B. Genotype at a promotor polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res*. 2002;53:1029–1034.
171. MacGregor AJ, Gallimore J, Spector TD, Pepys MB. Genetic factors determine baseline levels of C-reactive protein and serum amyloid A. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:43.
172. Hengstenberg C, Broeckel U, Holmer S, Glockner C, Mayer B, Commuzie AG, Riegger GAJ, Schunkert H. Genetic linkage analysis for C-reactive protein in families with myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003;24(suppl):156.
173. Cao H, Hegele RA. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. *J Hum Genet*. 2000;45(2):100-101.
174. Zee RYL, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis*. 2002;162:217–219.
175. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RY. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):139-145.
176. Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GD, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(11):2063-2069.
177. Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GDO, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. 2003;23:2063–2069.

178. Zee RY, Hegener HH, Fernandez-Cruz A, Lindpaintner K. C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis*. 2004;176(2):393-396.
179. Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson CG, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):193-198.
180. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in molecular biology*. Fourth edition. 1999. Editorial Board.
181. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2001. Third Edition. Tomo III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
182. Bladbjerg EM, Gram J, Jespersen J, de Maat MP. Internal quality control of PCR-based genotyping methods: practical experiences. *Vascul Pharmacol*. 2002;39:127-129.
183. Carneiro AV. Coronary heart disease in diabetes mellitus: risk factors and epidemiology. *Rev Port Cardiol*. 2004;23(10):1359-1366.
184. Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB Sr, Wilson PW; Framingham Heart Study. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2004;27(3):704-708.
185. Leone A, Giannini D, Bellotto C, Balbarini A. Passive smoking and coronary heart disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(2):175-182.
186. Richey Sharrett A, Coady SA, Folsom AR, Couper DJ, Heiss G; ARIC Study. Smoking and diabetes differ in their associations with subclinical atherosclerosis and coronary heart disease-the ARIC Study. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):143-149.
187. Singh BK, Mehta JL. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2002;17(5):503-511.
188. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241:2035-2038.
189. Kuuslasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary events rates across the WHO MONICA Project population. *Lancet* 2000;335:675-687.
190. Morishita E, Asakura H, Jokaji H, Saito M, Uotani C, Kumabashiri I, et al. Hypercoagulability and high lipoprotein(a) levels in patients with type II diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1996;120: 7-14.
191. Rao AK, Chouhan V, Chen X, Sun L, Boden G. Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation during prolonged hyperglycemia in young healthy men. *Diabetes* 1999;48:1156-1161.
192. Burke AP, Farb A, Malcolm GT, Liang YH, Smialek J, Vimani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276-1281.
193. Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2001;154(8):758-764.

194. Brown DW, Giles WH, Croft JB. White blood cell count: an independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol.* 2001;54(3):316-322.
195. Haumer M, Amighi J, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Schlager O, Schwarzingler I, Wagner O, Minar E, Schillinger M. Association of neutrophils and future cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *J Vasc Surg.* 2005;41(4):610-617.
196. Home BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB; Intermountain Heart Collaborative Study Group. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(10):1638-1643.
197. Cremer P, Nagel D, Seidel D, van de Loo JC, Kienast J. Considerations about plasma fibrinogen concentration and the cardiovascular risk: combined evidence from the GRIPS and ECAT studies. Goettingen Risk Incidence and Prevalence Study. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Am J Cardiol.* 1996;78:380-381.
198. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation.* 1991; 83:836-844.
199. Schillaci G, Reboldi G, Verdecchia P. High-normal serum creatinine concentration is a predictor of cardiovascular risk in essential hypertension. *Arch Intern Med.* 2001;161(6):886-891.
200. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998 (4):706-708.
201. Donmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K, Demir M, Demirtas M, Cayli M, Alhan C, Baslamisli F. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *Jpn Heart J.* 2004 (3):505-512.
202. Franco RF, Santos SE, Elion J, Tavella MH, Zago MA. Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematol.* 1998;100(1):9-12.
203. Chan, W. P.; Lee, C. K.; Kwong, Y. L.; Lam, C. K.; Liang, R. :A novel mutation of arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998;91: 1135-1139.
204. Gregg, J. P.; Yamane, A. J.; Grody, W. W. :Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am. J. Med. Genet* 1997;73: 334-336.
205. Heinrich J, Ballseisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:54-59.
206. Stec JJ, Silbershatz H, Tofler GH, Matheney TH, Sutherland P, Lipinska I, Massaro JM, Wilson PF, Muller JE, D'Agostino RB Sr. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation.* 2000;102:1634-1638.
207. Benderly M, Graff E, Reicher-Reiss H, Behar S, Brunner D, Goldbourt U, for the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Group. Fibrinogen Is a

- Predictor of Mortality in Coronary Heart Disease Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1996;16:351-356.
208. Yano K, Grove JS, Chen R, Rodriguez BL, Curb JD, Tracy RP: Plasma fibrinogen as a predictor of total and cause-specific mortality in elderly Japanese-American men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1065-1070.
209. Acevedo M, Pearce GL, Kottke-Marchant K, Sprecher DL. Elevated fibrinogen and homocysteine levels enhance the risk of mortality in patients from a high-risk preventive cardiology clinic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1042-1045.
210. Arnaú Vives MA, Rueda Soriano J, Martínez Dolz LV, Osa Saez A, Almenar Bonet L, Morillas Blasco P, et al: [Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-q-wave myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:622-630.
211. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L: Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1997;96:4204-4210.
212. Pegoraro RJ, Ranjith N, Rom L. Coagulation gene polymorphisms as risk factors for myocardial infarction in young Indian Asians. *Cardiovasc J S Afr*. 2005;16:152-157.
213. de Maat M, Kastelein J, Jukema J, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, Brusckhe A, Kluft C, on behalf of the REGRESS Group. -455G/A Polymorphism of the β -Fibrinogen Gene is Associated With the Progression of Coronary Atherosclerosis in Symptomatic Men Proposed Role for an Acute-Phase Reaction Pattern of Fibrinogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;8:265-271.
214. Lam KS, Ma OC, Wat NM, Chan LC, Janus ED. -fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 1999;42:1250-1253.
215. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*. 1996;19:1265-1268.
216. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest*. 1997;99:3034-3039.
217. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Rosendaal FR. Fibrinogen polymorphisms are not associated with the risk of myocardial infarction. *Br J Haematol*. 2000;110:935-938.
218. Laffan MA. Fibrinogen polymorphisms and disease. *Eur Heart J*. 2001;22:2224-2226.
219. van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:3063-3070.
220. Verschuur M, de Jong M, Felida L, de Maat MP, Vos HL. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen beta promoter is important for interleukin 6-

- induced expression, and its activity is influenced by the adjacent -148C/T polymorphism. *J Biol Chem.* 2005;280:16763-16771.
221. Anderson GM, Shaw AR, Shafer JA. Functional characterization of promoter elements involved in regulation of human B beta-fibrinogen expression. Evidence for binding of novel activator and repressor proteins. *J Biol Chem.* 1993;268:22650-22655.
222. Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *Mol Cell Biol.* 1993;13:1183-1193.
223. Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T, Staels B. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem.* 2001;276:33471-33477.
224. Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A(2) in subjects with PI(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol.* 2000;110(4):911-918.
225. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, de Knijff de P, D'Orazio C, Kluff C, Donati MB. Alu-repeat polymorphism in the tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene, t-PA levels and risk of familial myocardial infarction (MI). *Fibrinolysis.* 1996;10(suppl 2):13-16.
226. van der Boom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, de Jong PTVM, Hofman A, Kluff C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction: the Rotterdam study. *Circulation.* 1997;95:2623-2627.
227. Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1687-1690.
228. Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet.* 1994;10:188-193.
229. Chandler WL, Levy WC, Stratton JR. The circulatory regulation of TPA and UPA secretion, clearance, and inhibition during exercise and during the infusion of isoproterenol and phenylephrine. *Circulation.* 1995;92:2984-2994.
230. Emeis JJ. Local fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2005;3(9):1945-1946.
231. Brommer EJ. The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting as a determinant of the rate of fibrinolysis, inefficiency of activators added afterwards. *Thromb Res* 1984; 34: 109-115.
232. Fox KA, Robison AK, Knabb RM, Rosamund TL, Sobel BE, Bergman SR. Prevention of coronary thrombosis with subthrombolytic doses of tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 1985; 72: 1346-1354.
233. Jern C, Ladenvall P, Wall U, Jern S. Gene polymorphism of t-PA is associated with forearm vascular release rate of t-PA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(2):454-459.
234. Sartori MT, Saggiorato G, Spiezia L, Varvarikis C, Carraro G, Patrassi GM, Girolami A. Influence of the Alu-repeat I/D polymorphism in t-PA gene intron 8 on the stimulated t-PA release after venous occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9(1):63-69.

ANEXO I

- **Forma de consentimiento informado**
- **Cuestionario**

**CENTRO MEDICO DEL NORTE
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

INFORME DE CONSENTIMIENTO

**PROTOCOLO
MARCADORES GENÉTICOS EN SINDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU
RELACIÓN CON EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS**

INVESTIGADOR: Dr. Carlos Jerjes Sánchez D

INSTITUCION: Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax
Centro Médico del Norte. IMSS.
Av. Lincoln y Patrimonio Familiar
Monterrey, NL.
Tel. 399-4300

INTRODUCCION:

- 1. Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación clínica, que se llevará a cabo bajo la supervisión del Dr. Carlos Jerjes y un grupo de médicos del Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax núm. 34 del IMSS**
- 2. Estoy enterado de que durante mi estancia en el servicio de urgencias se tomarán muestras de sangre para intentar determinar algunas sustancias que podrían ser útiles para entender mejor las enfermedades cardiovasculares.**
- 3. Estoy consciente que estas muestras se toman en forma cotidiana a todo paciente que ingresa con una enfermedad cardiaca como la mía y que no representa ningún riesgo, no retrasa mi tratamiento y no interfiere en la evolución de mi enfermedad**

Este estudio y sus procedimientos me han sido explicados a mi entera satisfacción, en mi propio idioma, y se me ha proporcionado una copia de este informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a mi entera satisfacción. Por lo tanto e decidido participar voluntariamente en este proyecto.

Nombre y firma del paciente

Fecha

Domicilio

Teléfono

Firma del Investigador (o quien él designe)

Fecha

Firma de un Testigo (1)

Fecha

Firma de un Testigo (2)

Fecha

PROTOCOLO:

**MARCADORES GENÉTICOS EN SINDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU RELACIÓN
CON EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS**

Clave del Paciente: _____

Fecha: _____

Nombre del Paciente: _____

Cedula _____

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

Dirección: _____

Teléfono: _____

Teléfono de amigo: _____

MOTIVO DE INGRESO:

Angina inestable: _____

IAM previo: _____

Angina crónica: _____

Sano: _____

Lugar de envío y tratamiento: _____

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES

Antecedentes de SCA (SI) (NO) Quién: _____

Diabetes _____ Quién: _____

Hipertensión _____ Quién: _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Tabaquismo (NO) (SI) N° de años _____ N° de cigarrillos/día _____ Activo (SI) Inactivo desde hace _____

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Enfermedad	Año de Diagnóstico	Tratamiento	Evolución	Respuesta
Diabetes				
Hipertensión				
Tabaquismo				
Dislipidemia				
Menopausia				
Artritis reumatoide				
Obesidad				
Sedentarismo				
Otras				

COMENTARIOS: _____

DIAGNÓSTICO

SCA desnivel neg del segmento ST: _____
 SCA con elevación del segmento ST: _____
 Infarto anterior: _____
 Infarto inferior: _____
 Ventrículo derecho: _____
 Kill y Kimball: _____

CUADRO CLÍNICO

Angina: _____ Equivalente: _____ Clase funcional: _____
 Presion arterial: _____ Frecuencia Cardiaca: _____ S3: _____
 Soplo: _____ Crepitos: _____

ECG

Normal: _____ Ritmo sinusal: _____
 ISQ Subepicardio: _____ ISQ Subendocardio: _____
 < SST: _____ >SST: _____ Anterior: _____
 Inferior: _____ Arritmia: _____ QS: _____
 Bloq de Haz de Hiss: _____

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Generales:	Normal	Resultado
HB		
HTO		
Glucosa		
Colesterol		
Coagulación		
Antitrombina III	80-120%	
Proteína C activa (PC)	60-140%	
Proteína S	60-140%	
Resistencia a la proteína C (RPC)	>2.0	
Fibrinógeno	<350 mg/dl	
TP		
TPT		
Plaquetas		
Fibrinolisis		
Plasminógeno	80-120%	
Alfa2-antiplasmina (A2AP)	80-120%	
Inflamación		
Leucocitos	<9,000	
Proteína C Reactiva (PCR)	<3 mg/dl	
Linfocitos (%)		
Monocitos (%)		
Necrosis:		
CPK		
CPK-MB		
Función renal:		
Creatinina		
Urea		

ECOCARDIOGRAFIA

DDVI: _____ DSVI: _____ FE: _____
DISF/DIAST: _____ OTROS: _____

CATETERISMO

CATT: _____ VASOS: _____ TCI: _____
DA: _____ CD: _____ CX: _____
Obstrucción menor 70%: _____ Obstrucción mayor 70%: _____
D2VI: _____ Otros: _____

TRATAMIENTO

ESTABLECIDO: _____

EVOLUCION	Hospit.	30	90	150	210	270	330	360
Angina rec.								
IAM/RE-IAM								
CHOQUE								
ARRITMIA								
ACTP								
QX REVASC								
DEFUNCION								

DIAS-Esta Hospit: _____ DIAS Unid Cuida Coro: _____

Reacciones de las digestiones de los PA de los genes:

Con respecto a las condiciones de los corte enzimáticos, estos fueron muy variados con respecto a lo planteado en un principio, ya que para cada polimorfismo las concentraciones óptimas de los reactivos de corte y de la enzima fueron diferente para cada uno de ellos.

Digestión de los fragmentos del Fg:

Reacción de digestión para los polimorfismos -455 G/A y 148 C/T.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB2 10X	2.5 μ l (1.6X)
<i>Hae</i> III o <i>Hind</i> III	0.5 μ l (0.67U)
H ₂ O miliQ	2.0 μ l
Volumen final	15 μl

Las enzimas estaban a una concentración de 20 U/ μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs). Las enzimas se inactivaron a 65°C (*Hae* III) y a 80°C (*Hind* III) por 20 min.

Reacción de digestión para el polimorfismo +1689 T/G.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB4 10X	1.5 μ l (1X)
<i>Ava</i> II	0.6 μ l (0.6U)
H ₂ O miliQ	2.9 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 15 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y la enzima se inactivó a 65°C (20 min).

Reacción de digestión para el polimorfismo Taq I.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 μ l
NEB2 10X	1.5 μ l (1X)
<i>Msp I</i>	0.3 μ l (0.4U)
BSA 100X	1.5 μ l (10X)
H ₂ O miliQ	1.7 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 65°C (12 hrs) y se inactivaron a 80°C (20 min).

Reacción de digestión para el polimorfismo Bcl-1.

Reactivos	Volumen μl
PA	20 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1X)
<i>Bcl-1</i>	0.5 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	2.0 μ l
Volumen final	25 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 50°C (12 hrs).

Digestión del polimorfismo G1691A:

Reacción de la digestión para el polimorfismo G1691A.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB2 10X	2.5 μ l (1.7X)
<i>Mnl I</i>	0.6 μ l (0.2U)
BSA 100X	1.0 μ l (6.7X)
H ₂ O miliQ	0.9 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 5 U/ μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo R353Q:

Reacción de la digestión para el polimorfismo R353Q.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB2 10X	2.5 μ l (1X)
<i>Msp I</i>	0.5 μ l (0.5U)
H ₂ O miliQ	7 μ l
Volumen final	20 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo G20210A:

Reacción de digestión para el polimorfismo G20210A.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1X)
<i>Hind III</i>	0.3 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	2.2 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo PLA1/PLA2:

Reacción de digestión para el polimorfismos PLA1/PLA2.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1.25X)
<i>Msp I</i>	0.3 μ l (0.3U)
H ₂ O miliQ	7.2 μ l
Volumen final	20 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs). La enzima se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión de los polimorfismos G1059C y -717A/G:

Reacción de digestión para el polimorfismo G1059C.

Reactivos	Volumen μ l
PA	20 μ l
Buffer MaeIII	12.5 μ l (1.25X)
Mae III	0.5 μ l (0.07U)
H ₂ O miliQ	2 μ l
Volumen final	35 μl

La enzima estaba a una concentración de 5 U/ μ l. La reacción se incubó a 55°C (12 hrs).

Reacción de digestión para el polimorfismo -717A/G.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
Neb 4	2.5 μ l (1X)
Sac II	0.5 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	12 μ l
Volumen final	25 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacción se incubó a 37°C (12 hrs) y la enzima se inactivó a 65°C (20 min).



