

**LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DEL PAI-1 MODULAN  
LOS CAMBIOS INDUCIDOS POR LA ALIMENTACIÓN  
SOBRE DICHA PROTEÍNA.**

Trabajo Presentado por Maria Dolores Adarraga Cansino, licenciada en  
Medicina y Cirugía para optar al grado de Doctor.

Fdo: Maria Dolores Adarraga Cansino.

Córdoba a 8 Junio de 2001.



**DON FRANCISCO PEREZ JIMENEZ, CATEDRÁTICO DE PATOLOGÍA Y CLÍNICA MÉDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.**

**DOÑA MARIA DE LOS ANGELES BLANCO MOLINA, PROFESORA ASOCIADA DE PATOLOGÍA Y CLÍNICA MÉDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.**

HACEMOS CONSTAR:

Que el trabajo titulado “Los polimorfismos del gen del PAI-1 modulan los cambios inducidos por la alimentación sobre dicha proteína” ha sido realizado por Doña Maria Dolores Adarraga Cansino bajo nuestra dirección, en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía.

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser presentado como Tesis Doctoral ante el tribunal correspondiente en la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba.

Lo que firmamos en Córdoba a 8 de Junio del dos mil uno.

Fdo. Dr. Francisco Pérez Jiménez.

Fdo. Dra. Ángeles Blanco Molina.



A mis Padres y a Pedro,  
por su apoyo constante.



## **AGRADECIMIENTOS:**

Este trabajo ha visto la luz gracias a la inestimable ayuda de numerosas personas a las que deseo mostrar mi agradecimiento:

Al Profesor Pérez Jiménez, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por introducirme en el apasionante mundo de la Investigación y la Medicina.

Quisiera agradecer a la Doctora Ángeles Blanco por su enseñanza fuera y dentro del trabajo, aunque es imposible expresar con palabras mi admiración y agradecimiento hacia ella.

Al Profesor Jiménez Perepérez, por sus consejos y el estímulo académico que me ha transmitido durante todos estos años. Escucho sus palabras, aunque "siga pisando charcos."

Al Dr. López Miranda por las hora extras dedicadas, su paciencia y comprensión en todo momento.

A mis compañeros de la Unidad de Lípidos por el apoyo prestado en la horas duras y los buenos ratos compartidos. En especial a la Doctora Carmen Marín Hinojosa, porque siempre tiene un SÍ y una sonrisa. A Purificación Gómez Cuenca, siempre dispuesta a enseñar y a Elier Paz Rojas por su capacidad de trabajo y preocupación ante los obstáculos. A todos ellos gracias de corazón por su compañía en las horas de laboratorio.

A mis compañeros de Residencia de los que he recibido en todo momento palabras de aliento.

A Dña. Carmen Rodríguez González y Dña. María Ángeles Gómez Pérez, por su apoyo y cariño en todo momento.

Al personal de la Unidad de Investigación del Hospital Reina Sofía. A la Dra. Julia Blanco Cerrada y a todo el personal del Laboratorio de análisis Clínicos del Hospital Reina Sofía, por su contribución en la realización de determinaciones bioquímicas.

A Pedro, "mi compañero de fatigas", siempre a mi lado apoyándome, el motor de mi trabajo.

A mis padres y a mi hermano por ser como son y soportarme día a día, siendo un constante estímulo en mi formación y un buen ejemplo a seguir.

**ÍNDICE.**



## **RESUMEN**

### **I. INTRODUCCIÓN.**

1. ATERTOTROMBOSIS.....	1
2. LA PLACA DE ATERTOMA: Formación y crecimiento.....	3
1. Participación de las plaquetas.....	13
2. Coagulación .....	16
3. Fibrinólisis.....	19
3.1 Activadores de la fibrinólisis.....	21
3.2 Inhibición de la fibrinólisis.....	25
a) PAI -1 .....	27
b) Otros inhibidores.....	51
3. FACTORES NUTRICIONALES Y ATERTOTROMBOSIS.....	53
a) Influencia de la alimentación sobre el metabolismo lipídico.....	55
b) Oxidación lipídica y factores nutricionales.....	60
c) Influencia de la alimentación sobre la tensión arterial.....	63
d) Influencia de la alimentación sobre la resistencia a la insulina.....	66
e) Alimentación y Trombosis.....	75
f) Alimentación y Fibrinólisis.....	87
<b><u>II. HIPÓTESIS DE TRABAJO y OBJETIVOS.</u></b> .....	93
<b><u>III. DISEÑO Y METODOLOGÍA.</u></b> .....	99
<b><u>IV. RESULTADOS</u></b> .....	119
1. Estudio de intervención dietética.	
a) Características basales .....	121
b) Composición de la alimentación.....	122
c) Influencia de la alimentación sobre los parámetros lipídicos y PAI -1	
1. Sobre los Lípidos plasmáticos.....	123
2. Sobre la concentración y actividad de PAI -1.....	124
3. Cambios de los lípidos plasmáticos según el sexo y el IMC.....	125
4. Cambios de la concentración y actividad del PAI -1 según el sexo, el IMC y el pliegue subescapular.....	132
2. Polimorfismo 4G5G de la región promotora del Gen del PAI -1	
a) Frecuencia.....	135
b) Características basales.....	136
c) Concentraciones de lípidos y lipoproteínas.....	139
d) Influencia de la alimentación sobre el PAI -1 según el polimorfismo 4G5G .....	141

3. Polimorfismo AG en la región promotora del Gen del PAI -1	
a) Frecuencia .....	145
b) Características basales.....	146
c) Concentración de Lípidos y lipoproteínas .....	149
d) Influencia de la alimentación sobre el PAI -1 según el polimorfismo AG.....	150
4. Test de supresión de insulina con Somatostatina.....	154
5. Correlaciones.....	157
6. Análisis de Regresión Múltiple.....	159
<b>V. <u>DISCUSIÓN</u></b> .....	161
<b>VI. <u>CONCLUSIONES</u></b> .....	179
<b><u>ABREVIATURAS</u></b> .....	183

## Resumen:

**Introducción:** El PAI -1 es el principal modulador de la fibrinólisis por su acción inhibitoria sobre el activador tisular del plasminógeno. La insulina, entre otros factores como la alimentación y los polimorfismos del gen que lo codifica, puede influir en su concentración plasmática.

**Hipótesis de trabajo:** Demostrar que las cifras plasmáticas de PAI -1 están determinadas por la existencia de una interacción entre los factores genéticos y la alimentación.

**Objetivos:** Estudiar si los niveles plasmáticos de PAI -1 resultan de la interacción entre el polimorfismo 4G/5G y el tipo de alimentación, analizando el comportamiento de los portadores de los distintos genotipos tras una alimentación rica en grasa saturada, otra rica en hidratos de carbono y otra tipo mediterránea. Investigar si la respuesta del PAI -1 a la alimentación depende de la influencia de ésta sobre la resistencia periférica a la insulina. Explorar la interacción entre la alimentación Mediterránea y la rica en hidratos de carbono con el polimorfismo A/G en la posición -844 de la región promotora del gen que codifica el PAI -1.

**Personas, Diseño y metodología:** Se seleccionaron 59 voluntarios sanos, 30 hombres y 29 mujeres, según las variaciones de actividad del PAI -1 en función del polimorfismo 4G/5G de la región promotora del gen que codifica esta proteína. Todos recibieron una alimentación de estabilización de cuatro semanas rica en grasa saturada y tras ésta se administró, de forma aleatorizada y cruzada, una alimentación típica Mediterránea rica en grasa monoinsaturada y otra pobre en grasa, y rica en hidratos de carbono. Al final de cada periodo se determinaron los lípidos plasmáticos, la actividad del PAI -1, el PAI -1 antigénico y se obtuvo la respuesta periférica a la acción de la insulina mediante el test de supresión de insulina con somatostatina.

**Resultados y Conclusiones:** Las cifras de glucosa media y las de PAI -1 descendieron tras la alimentación con alto contenido en grasa monoinsaturada y tras la pobre en grasa. Los portadores del alelo 4G presentaron mayores concentraciones de c-LDL, apo B y PAI -1 antigénico y funcional, descendiendo estos parámetros tras la alimentación Mediterránea. Los homocigotos para el alelo 5G mostraron cifras más bajas de PAI -1, independientemente de la alimentación recibida. Observamos también mayores cifras de PAI -1 en los genotipo AA y AG del polimorfismo A/G en la posición -844 del promotor, con un descenso de éstas tras la alimentación Mediterránea. En conclusión la interacción entre los polimorfismos 4G/5G y A/G del promotor del gen del PAI -1 y la nutrición determinan los valores plasmáticos de esta proteína. La alimentación Mediterránea además de mejorar el perfil fibrinolítico, mejora la resistencia periférica a la insulina.



## **I. INTRODUCCIÓN.**



## 1. ATEROTROMBOSIS.

La aterosclerosis y sus complicaciones son el resultado de una compleja interacción entre las células endoteliales, los monocitos/macrófagos, los linfocitos T, las células musculares lisas y los factores trombogénicos. Los procesos patológicos en los que se van a involucrar todos estos factores son varios. En primer lugar, la inflamación, con el aumento de la permeabilidad endotelial<sup>1,2</sup>, la activación del propio endotelio<sup>3,4,5</sup> y el reclutamiento de monocitos<sup>6,7</sup>. Más tarde, el crecimiento, con proliferación y migración de las células musculares lisas, junto a la síntesis de la matriz. Posteriormente, la degeneración con acumulo celular y extracelular de lípidos<sup>8,9</sup>. También participará la necrosis celular, posiblemente debida a los efectos citotóxicos de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas. Por último la trombosis, que involucra la adhesividad, la agregación y la degranulación plaquetaria, la coagulación con la generación de la trombina y la formación de fibrina<sup>10</sup>. Los sistemas fibrinolíticos se encargarán después de lisar el trombo y destruirlo.

---

<sup>1</sup> Valenzuela R, Shainoff JR, DiBello PM, et al. **Immuno-electrophoretic and immunohistochemical characterizations of fibrinogen derivatives in atherosclerotic aortic intimas and vascular prosthesis pseudointimas.** *Am J Pathol* 1992; 141: 861-880.

<sup>2</sup> Zhang Y, Cliff WJ, Schoefl GI, et al. **Plasma protein insudation as an index of early coronary atherogenesis.** *Am J Pathol* 1993; 143: 496-506.

<sup>3</sup> Van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, et al. **Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions.** *Am J Pathol* 1992; 141: 1427-1433

<sup>4</sup> Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, et al. **Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques.** *Am J Pathol* 1992; 140: 665-673

<sup>5</sup> Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, et al. **The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.** *J Pathol* 1993; 171: 223-229.

<sup>6</sup> Faruqi RM, Dicorleto PE. **Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation.** *Br Heart J* 1993; 69: S19-S29.

<sup>7</sup> Hansson GK. **Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis.** *Br Heart J* 1993; 69: S38-S41.

<sup>8</sup> Ross R. **The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s.** *Nature* 1993; 362: 801-809.

<sup>9</sup> Guyton JR, Klemp KF, Black BL, et al. **Extracellular lipid deposition in atherosclerosis.** *Eur Heart J* 1990; 11: 20-28.

<sup>10</sup> Witztum JL. **The oxidation hypothesis of atherosclerosis.** *Lancet* 1994; 344: 793-795.

El endotelio arterial sano es llamativamente resistente a la trombosis; por consiguiente, la clave para una mejor comprensión del proceso aterosclerótico y para su prevención, reside en la identificación de aquellos factores que dan lugar a la formación inicial de una placa.

El desarrollo de la oclusión vascular arterial puede dividirse en dos fases: el crecimiento y organización de una placa aterosclerótica, y la trombosis sobre dicha placa, como resultado, por lo general de la ruptura o fisura de la misma. A estos procesos, considerados en conjunto, se les da el nombre de aterotrombosis.

La enfermedad puede afectar a lechos vasculares en todo el organismo dando lugar al síndrome coronario agudo, accidente cerebrovascular isquémico, aneurisma aterosclerótico y a la enfermedad vascular periférica.

## 2. LA PLACA DE ATEROMA: FORMACIÓN Y CRECIMIENTO

La placa es considerada, en la actualidad, como una entidad con vida propia, en la que las células que la constituyen pueden influir en las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis y precipitar las complicaciones clínicas de la enfermedad. Su formación tiene un origen multifactorial. Se desarrolla muy lentamente, a lo largo de años, y su disposición en la pared de los vasos no sigue una distribución uniforme y difusa, sino excéntrica y focal. La placa ateromatosa es un proceso que afecta inicialmente a la capa íntima arterial y, secundariamente, a la capa media, generalmente de las arterias de mediano y grueso calibre. Su desarrollo anatomopatológico completo consta de varias fases hasta llegar a la placa madura.

La disfunción endotelial es el primer acontecimiento que tiene lugar en el desarrollo de la placa de ateroma, y va a favorecer la salida de lipoproteínas desde el torrente circulatorio al espacio subendotelial. Estas lipoproteínas, fundamentalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL), son atrapadas en la malla fibrilar tridimensional de dicho espacio<sup>11</sup> y, durante este proceso de transcitosis, pueden ser modificadas convirtiéndose en LDL mínimamente oxidadas. Además de las células endoteliales, los otros tipos celulares que componen la pared de los vasos y las lesiones ateroscleróticas, como las células musculares lisas y los macrófagos, son capaces de oxidar a la LDL<sup>12</sup>. Una vez que las lipoproteínas se oxidan, se

---

<sup>11</sup> Millan J, Alvarez Sala LA. **Génesis de la placa de ateroma.** En: de Oya M, Garcés C. eds. *Metabolismo Lipídico.* Madrid. España : Idepsa, 1997: 89-108.

<sup>12</sup> Valentin Fuster. **Elucidation of the Role of Plaque Instability and Rupture in Acute Coronary Events.** *Am J Cardiol* 1995; 76: 24c-33c.

modifica su comportamiento biológico. Las LDL modificadas y, particularmente las oxidadas, son citotóxicas y lesivas para el endotelio, quimiotácticas para los monocitos, e inhibitoras de la migración de los macrófagos, por lo que ocupan un lugar estratégico en los procesos de aterogénesis.

La LDL mínimamente modificada (LDLmm), como hemos dicho, juega un papel crucial en el reclutamiento de monocitos, al inducir la expresión de glicoproteínas adhesivas en la superficie de las células endoteliales, tales como E-selectina, VCAM-1 (vascular-cell adhesion molecule 1), o ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). La entrada de monocitos en la arteria se desencadena por la formación de agentes quimiotácticos específicos. Estos forman un gradiente de concentración, que lleva a la migración desde la superficie luminal del endotelio hasta el interior de la pared arterial. Estos monocitos, ya en el interior de la pared, se diferencian a macrófagos bajo la acción del factor estimulante de colonias de macrófagos. Son éstos últimos los que van a favorecer la conversión de la LDL mínimamente oxidada en LDL oxidada, que son captadas por los receptores scavenger de los macrófagos, convirtiéndose en células espumosas. Esta célula espumosa no es más que un monocito con mucha grasa oxidada en su interior. La grasa de la célula espumosa tiende a removerse, a salir, por influencia de la HDL. El papel fundamental de éstas es sacar ese exceso de grasa que se ha ido acumulando en los lugares con daño endotelial.

Los macrófagos, o células espumosas, pueden liberar un gran número de productos, incluyendo colesterol (oxidado y esterificado) que puede participar en la evolución de la placa aterosclerótica. Inicialmente los depósitos lipídicos extracelulares son escasos. En esta primera fase, la

lesión es conocida como *estría grasa*, y puede considerarse como la fase inicial de una placa ateromatosa. Es visible macroscópicamente como una zona de cierto relieve y de color más amarillento, que resalta sobre la superficie endotelial.

Cuando la estría grasa progresa se transforma en la *lesión fibrosa*. Ésta se compone de múltiples capas alternantes de células espumosas, que están rodeadas de tejido conectivo, con una disposición irregular y compleja. Si la lesión aumenta de tamaño, la íntima se hace más gruesa, blanquecina y sobreelevada en su aspecto macroscópico, apareciendo una capa que rodea el núcleo lipídico. Esta lesión más evolucionada contiene una cubierta fibrosa de tejido conjuntivo, con células musculares lisas entremezcladas con macrófagos derivados de los monocitos y linfocitos T, rodeados todos ellos de una matriz de densidad variable consistente en colágeno, proteoglicanos y pequeñas fibras elásticas. Con la evolución y progresión de la placa se acumulan lípidos extracelulares y restos necróticos en el centro de la misma, y se empobrece en su contenido celular, tomando una consistencia blanda y convirtiéndose en la *placa madura*.

La placa de ateroma en su última fase está formada por dos componentes: un núcleo ateromatoso y rico en lípidos, y un tejido escleroso duro y rico en colágeno. El componente esclerótico es el más voluminoso, formando el 70% de una placa coronaria estenosante, pero es relativamente benigno. Sin embargo, el núcleo ateromatoso es mucho más peligroso, ya que desestabiliza la placa, haciéndola vulnerable a la rotura,

con el riesgo elevado de la formación del trombo<sup>13</sup>. Se ha observado que la formación del trombo es seis veces más frecuente sobre el núcleo ateromatoso, que sobre los demás substratos de la placa, incluyendo la matriz rica en colágeno<sup>14</sup>.

La arteriosclerosis requiere décadas para desarrollar placas maduras responsables de los síndromes clínicos, aunque comienza precozmente en la vida. La proliferación de las células musculares lisas, la síntesis de la matriz y la acumulación de los lípidos pueden reducir gradualmente la luz de las arterias. Pero es necesario que aparezcan fenómenos de ruptura y de trombosis sobre la placa vulnerable, para que esta enfermedad, de curso crónico y de evolución lenta, produzca manifestaciones clínicas, como son la angina inestable, el infarto de miocardio y la muerte súbita. Sin embargo también es posible que sobre esta placa vulnerable, sin que sufra una rotura, y por fenómenos de denudación endotelial, aparezcan fenómenos de trombosis<sup>15</sup>. Este mecanismo es mucho menos frecuente que el de ruptura de la cápsula, con una proporción de uno a tres. Se debe a la pérdida de endotelio, de manera que queda expuesto el colágeno sobre el que se depositarán las plaquetas<sup>16</sup>. Es, por tanto, de vital importancia el conocimiento de todos los procesos relacionados con la aparición del trombo sobre una placa, y la posterior lisis u organización del mismo. Algunas placas permanecen resistentes a los trombos y son inofensivas, mientras que otras, tras años de crecimiento indolente, se convierten en propensas a la trombosis y ponen en peligro la vida. La composición de la

---

<sup>13</sup> Fuster V, Zahi A, Badimon JJ. **Acute coronary syndromes: biology**. Lancet 1999; 353: 5II-9II.

<sup>14</sup> Badimon L. **Trombogenesis**. Clin Invest Arterioscler 1997; 9: 21-27.

<sup>15</sup> Davies MJ. **Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White lecture 1995**. Circulation 1996; 94: 2013-2020.

<sup>16</sup> Davies MJ. **The composition of coronary- artery plaques**. N Engl J Med 1997; 336:1312-1314.

placa y su tendencia a fisurarse y trombosarse surgen como factores mucho más importantes que el tamaño de la placa o el grado de estenosis que produce<sup>16</sup>. Paradójicamente pueden ser las placas de menor tamaño de aspecto más inocente, las que sufran rotura causando la oclusión vascular trombótica.

Los factores de los que depende la tendencia de una placa a romperse, o sea, los factores que determinan la vulnerabilidad de la placa, son fundamentalmente tres:

La consistencia y el tamaño del núcleo ateromatoso: El tamaño del núcleo es crítico para la estabilidad de la placa, de forma que cuando el núcleo ocupa más de un 40% del área ésta se considera especialmente vulnerable y con alto riesgo de rotura y trombosis<sup>17</sup>. La consistencia del núcleo depende de la temperatura y de su composición. A la temperatura del cuerpo, el contenido del núcleo es algo más blando que la pasta de dientes<sup>18</sup>. Con relación a su composición, son los ésteres líquidos de colesterol los que lo reblandecen, mientras que el colesterol sólido (cristalizado) tiene un efecto opuesto. Parece ser que el tratamiento hipolipemiente depleciona a la placa de estos ésteres líquidos, con un aumento relativo del colesterol cristalizado, originando una placa más rígida y más estable<sup>19</sup>.

El espesor de la cápsula fibrosa: el adelgazamiento y la reducción del contenido de colágeno de la cápsula aumentan la tendencia a la

---

<sup>17</sup> Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, et al. **Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content.** *Br Heart J* 1993; 69: 377-381.

<sup>18</sup> Fuster V, Lewis A, Conner Memorial Lecture. **Mechanisms leading of myocardial infarction: insights from studies of vascular biology.** *Circulation* 1994; 90: 2126-2146.

<sup>19</sup> Falk E. **Why do plaques rupture?** *Circulation* 1992; 86: 30III- 42III.

rotura<sup>20</sup>. Ésta se produce en los puntos donde la cápsula es más fina y donde la cantidad de colágeno es menor. Debido a que el colágeno de las placas es sintetizado por las células musculares lisas, la pérdida de las mismas o la alteración en sus funciones, podrían debilitar la placa e incrementar el riesgo de rotura. Las cápsulas de las placas excéntricas son a menudo las más delgadas y las más infiltradas con células espumosas en las regiones más declives, donde se rompen más frecuentemente.

La inflamación de la cápsula: la actividad inflamatoria en las placas que se rompen es muy importante. Dentro de la placa, los monocitos se diferencian a macrófagos, que a continuación absorben grasa y se transforman en células espumosas. Las placas de ateroma que se han fisurado presentan unas cápsulas muy infiltradas con células espumosas macrofágicas<sup>21</sup>. Dichos macrófagos, que están activados, son marcadores de la actividad inflamatoria de la placa. La implicación de los macrófagos en la fisura de la placa está en relación con su capacidad para degradar la matriz extracelular, mediante la fagocitosis o la secreción de enzimas proteolíticas, como los activadores del plasminógeno y las metaloproteinasas<sup>22</sup>. Además los monocitos/macrófagos activados juegan un papel deletéreo después de la rotura de la placa, favoreciendo la generación de trombina y la trombosis luminal<sup>23</sup>. Los macrófagos junto a las metaloproteinasas, también sintetizan Factor Tisular (FT), que es muy

---

<sup>20</sup> Davies MJ, Thomas AC. **Plaque fissuring-the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina.** *Br Heart J* 1985; 53: 363-373.

<sup>21</sup> Van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al. **Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology.** *Circulation* 1994; 89: 36-44.

<sup>22</sup> Matrisian, LM. **The matrix degrading metalloproteinases.** *Bioessays* 1992; 14: 455-463.

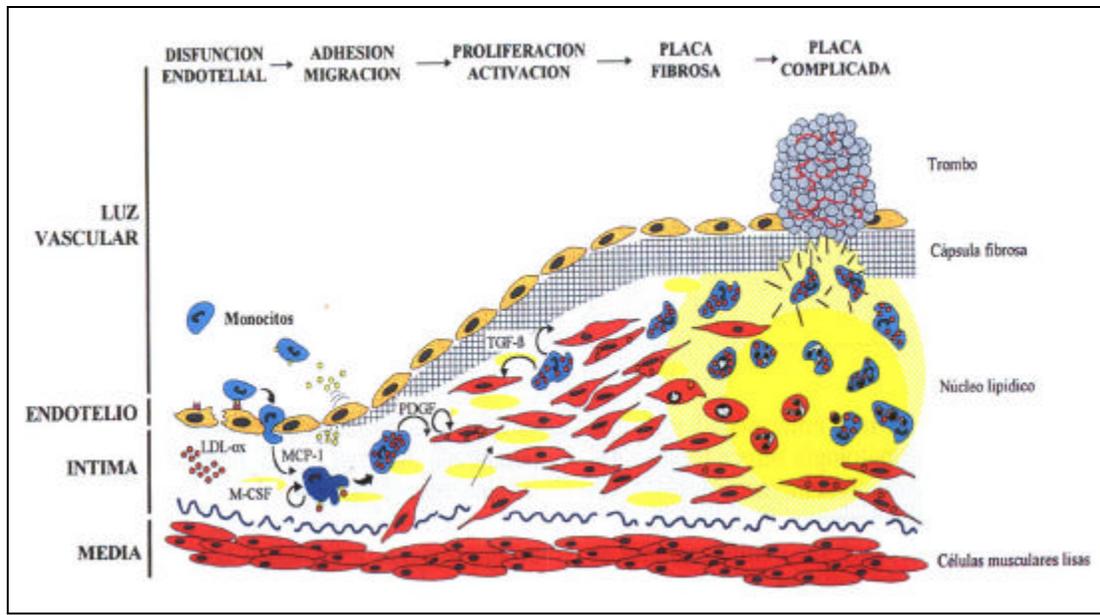
<sup>23</sup> Jude B, Agraou B, McFadden EP, et al. **Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina.** *Circulation* 1994; 90: 1662-1668.

importante en la formación del coágulo. El papel de los monocitos/macrófagos cargados de LDL -oxidada está cobrando cada día más importancia. Parece ser que cuando estas células almacenan LDL-oxidada en exceso, ponen en marcha mecanismos de apoptosis, durante los cuales se liberan metaloproteinasas y FT, conduciendo a la destrucción del tejido circundante y favoreciendo la formación del trombo. Este sería el denominado "suicidio del macrófago" propuesto por el Profesor Fuster<sup>24</sup>.

Todo este proceso se ve retardado por la presencia de lipoproteínas de alta densidad (HDL), que al mismo tiempo que inhiben la oxidación lipídica, retiran colesterol de la placa y protegen de la apoptosis.

---

<sup>24</sup> Fuster V. **Mecanismos que dan lugar a la enfermedad arteriosclerótica.** En San José JM, Vazquez de la Prada JA, Pajarón A eds. La aterotrombosis el gran desafío en el mundo de la medicina. España, 1999: 41-72.



**Figura 1:** Representación esquemática de la placa de ateroma. Tomada de Guijarro 1997<sup>25</sup>.

Junto a las características propias de la placa, los denominados “factores intrínsecos” que determinan su vulnerabilidad, existen otros factores, los extrínsecos, que también van a influir en el riesgo de rotura. Aunque estos factores son importantes, la presencia de una placa vulnerable es un requisito previo a la rotura. Si no hay placas vulnerables en las arterias coronarias, no hay sustrato con propensión a la rotura, en donde puedan actuar los factores desencadenantes. Estos últimos son la presión arterial, la presión del pulso, la contracción cardíaca, el espasmo arterial, el sangrado capilar en la placa y el estrés dinámico del flujo<sup>26</sup>.

Una vez que tenemos una placa vulnerable y que sobre ella han actuado los factores precipitantes, ésta se rompe. Tras la rotura se va a exponer el material trombogénico del interior de la placa al flujo sanguíneo,

<sup>25</sup> Guijarro C, Tuñón J, Bustos C, Hernández –Presa MA, Ortego M, Plaza JJ, Egado J. **La formación de la placa aterosclerótica: un proceso inflamatorio y fibroproliferativo.** Clin Invest Arterioscler 1997; 9: 3-14.

<sup>26</sup> Falk E. **Lesiones avanzadas y síndromes coronarios agudos: punto de vista del patólogo.** En : Fuster V ed. Síndromes de aterosclerosis. Barcelona España : Uriach, 1997: 54-69.

condicionando la formación del trombo. La mayoría de las placas que se rompen se sellan con trombos murales pequeños, y sólo algunas veces evolucionan a un trombo luminal mayor. El hecho de que se formen un trombo mural pequeño, o intraluminal grande que originará la obstrucción de la arteria, depende de tres determinantes: el carácter y la cantidad de sustancias trombogénicas expuestas en la placa (sustratos trombogénicos), el grado de estenosis y de irregularidad de la superficie (alteraciones locales del flujo), y el equilibrio trombótico/trombolítico de la placa (tendencia trombótica sistémica).

El sustrato trombogénico de la placa viene condicionado por el núcleo ateromatoso rico en lípidos y por los macrófagos de la placa, porque en ellos se localiza el FT, responsable de la respuesta trombótica que aparece tras la rotura de la misma<sup>27</sup>. El FT posee una potente actividad procoagulante, y cuando entra en contacto con la sangre desencadena la formación de trombina, que ocasionará la formación del trombo, mediante la agregación plaquetaria y la formación de las redes de fibrina.

Junto a los componentes propios de la placa, que constituyen el sustrato trombogénico, las modificaciones en el flujo local también van a influir en la trombosis de la placa. Cuanto mayor sea la estenosis y más áspera la superficie, más plaquetas se activan y depositan<sup>28</sup>.

Por último, la formación del trombo va a estar condicionada por el equilibrio trombosis/fibrinólisis de la placa. Los factores trombogénicos, como la hiperagregabilidad plaquetaria, la hipercoagulabilidad y una

---

<sup>27</sup> Falk E. **Lesiones avanzadas y síndromes coronarios agudos: punto de vista del patólogo.** En : Fuster V ed. Síndromes de aterosclerosis. Barcelona España : Uriach, 1997: 54-69.

<sup>28</sup> Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, et al. **Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture.** *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1562-1569.

fibrinolisis alterada se asocian a un aumento del riesgo de sufrir un infarto de miocardio<sup>29</sup>.

Hay que destacar que la respuesta trombótica a la rotura de la placa es dinámica. Se produce trombosis/retrombosis y trombolisis/embolización simultáneamente en muchos pacientes con síndromes coronarios agudos, causando obstrucciones intermitentes del flujo arterial<sup>30</sup>. La obstrucción inicial generalmente se debe a la agregación de las plaquetas, pero la fibrina es muy importante en la estabilización subsiguiente del trombo plaquetario que es muy frágil.

---

<sup>29</sup> Small DM. **Progression and regression of atherosclerotic lesions. Insights from lipid physical biochemistry.** *Atherosclerosis* 1988; 8:103-129.

<sup>30</sup> Falk E. **Coronary thrombosis: Pathogenesis and clinical manifestations.** *Am J Cardiol* 1991; 68: 28B-35B.

## 1. PARTICIPACIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA PROGRESIÓN DE LA LESIÓN ATEROSCLERÓTI CA.

Las plaquetas constituyen uno de los factores más importantes en el desarrollo de la clínica de la arteriosclerosis. Estudios experimentales han demostrado que éstas desempeñan un papel patogénico crucial en diferentes fases del proceso aterosclerótico. Están involucradas en los pasos iniciales de la aterogénesis, en la progresión de las lesiones ateroscleróticas y en las complicaciones trombóticas que puedan surgir.

Cuando la placa aterosclerótica se rompe, varias proteínas presentes en el subendotelio quedan expuestas a las plaquetas circulantes. Estas moléculas conocidas como proteínas adhesivas, son la fibronectina, la laminina, la vitronectina y el factor von Willebrand (FvW). Este último se une al receptor Ib de las plaquetas y es el que media la adhesión inicial de las plaquetas al endotelio. Tras esta fase cambian su forma de discos lisos a esferas con pseudópodos y, de forma concomitante a la adhesión, se inician los procesos de activación plaquetaria. Las plaquetas se extienden, liberan el contenido de sus gránulos y comienza la agregación, que consiste en la unión irreversible de las plaquetas entre sí, utilizando la molécula de fibrinógeno como anclaje entre ellas. Por lo tanto, el FvW juega un papel crítico en el crecimiento del trombo, con la consiguiente complicación de la enfermedad<sup>31</sup>.

La participación de las plaquetas y de material trombótico en el desarrollo de las placas se relaciona con la identificación de fibrina y

---

<sup>31</sup> Badimon L, Badimon J. **Interaction of platelet activation and coagulation.** En Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and artery disease.* Philadelphia:Lippincot Raven, 1996: 639-656.

material de origen plaquetario en la profundidad de la placa. En concreto Smith y Staples, aplicando técnicas de inmunohistoquímica, han demostrado dentro de la placa la presencia de protombina y de componentes plaquetarios específicos como la  $\beta$ -tromboglobulina, en asociación con los enlaces cruzados de fibrina<sup>32</sup>. Este material podría proceder, bien de trombos murales que quedasen incorporados a la placa durante el proceso de re-endotelización, o de hemorragias en el seno de la misma. Sea cual sea la vía de entrada de las plaquetas, es probable que éstas estimulen el crecimiento y la proliferación de la placa a través de la liberación de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet derived growth factor, PDGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ TGF), y otras sustancias de bajo peso molecular. El PDGF podría tener particular importancia, dado que estimula el crecimiento de células musculares lisas y fibroblastos, que son generadores de tejido fibroso en el seno de la placa<sup>33</sup>.

La relación existente entre las plaquetas y el endotelio vascular es un punto de arranque para el crecimiento de la placa aterosclerótica. Es evidente que las plaquetas normales no se adhieren al endotelio sano, de ahí que la lesión de éste se considere el estímulo inicial para la aterosclerosis. Se ha observado que la P-selectina, una molécula de adhesión que queda expuesta en la superficie del endotelio tras la activación de las plaquetas y de las células endoteliales, media el anclaje de estas células a los leucocitos. Cuando la P-selectina entra en contacto con su receptor en los monocitos, inicia la biosíntesis de citoquinas y de factor

---

<sup>32</sup> Smith EB, Staples EM. **Haemostatic factors in human aortic intima**. Lancet 1981; 1: 117-124.

<sup>33</sup> Badimon JJ, Fuster V, Chesebro, Badimon L. **Coronary atherosclerosis a multifactorial disease**. Circulation 1993; 87: II3-II6.

tisular. De este modo, los monocitos contribuyen al crecimiento de la placa aterosclerótica a través de la generación de citoquinas y de la aceleración de la generación de trombina<sup>34</sup>

Un componente clave para el proceso aterotrombótico es la liberación de difosfato de adenosina (ADP) por células dañadas, y en particular por eritrocitos, células endoteliales y plaquetas. El ADP está contenido en los gránulos densos de las plaquetas, y se libera cuando las plaquetas son estimuladas por agonistas tales como la trombina y el colágeno. Seguidamente el ADP activa los receptores de glucoproteínas (Gp) IIb/IIIa, con el resultado de la agregación plaquetaria<sup>35</sup>. La agregación plaquetaria inducida por el ADP es un factor primordial en la promoción y extensión de la trombosis<sup>36</sup>.

Existen evidencias considerables que apoyan el hecho que las plaquetas de pacientes con enfermedad aterotrombótica se encuentran en un estado de activación aumentado, en comparación con individuos sanos<sup>37</sup>. Es probable que una proporción considerable de la activación plaquetaria observada sea secundaria a la enfermedad vascular, predisponiendo al individuo a un ulterior desarrollo de aterosclerosis o trombosis.

---

<sup>34</sup> Crovello CS, Furie BC, Furie B. **Histidine phosphorylation of P-selectin upon ligand-induced stimulation of human platelets: a novel pathway for cell activation dependent signal transduction.** Cell 1995; 82: 279-86.

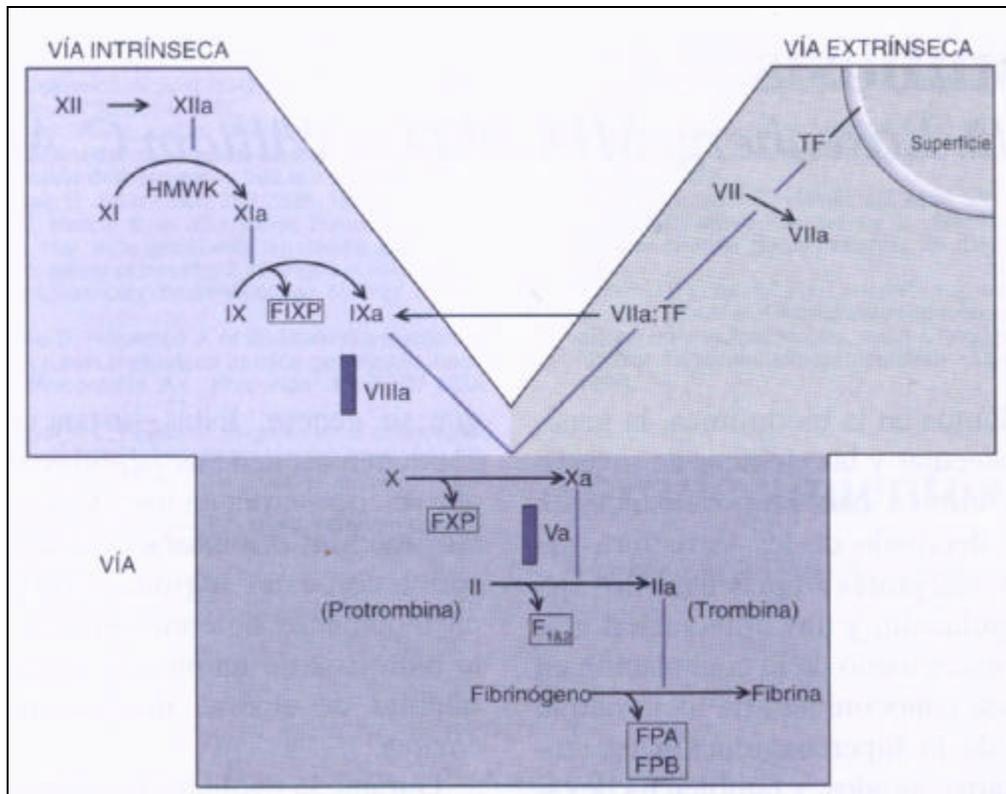
<sup>35</sup> Gatchet C, Hechler B, Leon C, Ohlmann E, Cazenave JP. **Activation of ADP receptors and platelet function.** Thromb Haemost 1997; 78: 271-275.

<sup>36</sup> Maffrand JP, Bernatt A, Delebasae D, Defreyn G, Cazenave JP, Gordon JL. **ADP plays a key role in thrombogenesis in rats.** Thromb Haemost 1988; 59: 225-230.

<sup>37</sup> Prentice CRM. **Plaquetas y aterosclerosis.** Eur Heart J Supplements 1999; 1: A3-A7

## 2. COAGULACIÓN

La coagulación sanguínea se desarrolla en un gran número de etapas y puede ser desencadenada, bien por sustancia liberadas cuando se producen lesiones en la pared vascular (vía extrínseca), bien por el contacto de la sangre con superficies cargadas negativamente (vía intrínseca). En la primera, el factor tisular se une al factor VII por mediación del calcio, formando un complejo que estimulará la coagulación; por ello a esta vía también se le conoce como la del factor tisular. La formación del complejo origina un cambio conformacional en el factor VII, que resulta en la exposición de su centro activo (FVII<sub>a</sub>). Como resultado, el factor X es activado sobre la superficie fosfolipídica y, por un mecanismo de retroalimentación positiva, activará el resto de los factores que participarán en el proceso de la coagulación (figura 2). En la vía intrínseca, todos los factores necesarios se hallan presentes en el torrente circulatorio; cuando el factor XII entra en contacto con una superficie cargada negativamente, por ejemplo, colágeno y membrana basal tras la denudación del endotelio, es absorbido sobre ella y sufre un cambio conformacional que lo hace más sensible a la proteólisis. El complejo circulante de precalicreína-cinínógeno de alto peso molecular (HMWR) también es absorbido sobre la superficie cargada. Ello produce una activación mutua entre las porciones libres de la calicreína y el factor XII, el cual a su vez activará al factor XI, originando por esta vía la puesta en marcha de la cascada proteolítica de la coagulación sanguínea.



**Figura 2.** Mecanismo de Coagulación de la sangre. Tomada de Rosenberg<sup>38</sup>.

Así, el sistema de la coagulación constituye en síntesis una cascada de reacciones que hacen intervenir a un conjunto de factores, y cuyo resultado es la transformación de una proteína circulante soluble, el fibrinógeno, en una proteína coagulada, la fibrina, cuyas tupidas redes contribuyen a detener el sangrado del vaso. Durante las etapas sucesivas de la coagulación, cada factor o proenzima es activado por el factor que le precede en la cascada de reacciones. La vía común de la coagulación comienza con la formación del factor X que convierte la protrombina en trombina. Tan pronto se forma la trombina libre, ésta actúa sobre la molécula de fibrinógeno para transformarla en fibrina. La molécula de

<sup>38</sup> Rosenberg RD, Aird WC. **Trombosis**. En Haber E. Editor. Medicina Cardiovascular Molecular. Barcelona : Medical Trends, 1998: 95-109.

fibrina interactúa con otras moléculas para formar polímeros que precipitan formando una malla que asegura el trombo plaquetario. Finalmente, el factor XIII o factor estabilizante de la fibrina, forma puentes entre cadenas vecinas que aumenta la firmeza del trombo y lo hacen menos sensible a la acción de la plasmina. Esta última etapa es el elemento principal de la coagulación sanguínea.

El factor tisular, presente en el núcleo lipídico de la placa, es el que inicia la cascada de la coagulación y la formación de trombina<sup>39</sup>. In vivo, las vías extrínseca e intrínseca de la coagulación se hallan estrechamente interconectadas, así, por ejemplo, el factor VIIa, unido al FT y al calcio pueden activar al factor IX, y a su vez el factor XIIa puede activar al factor VII<sup>40</sup>.

La potencia del sistema coagulativo, y la existencia en el mismo de mecanismos de retroalimentación aseguran la eficacia hemostática, pero también conllevan el riesgo de activación más allá de las necesidades de ésta, dando lugar al fenómeno trombótico.

---

<sup>39</sup> Rauch U, Osende J, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro J. **Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences.** Ann Intern Med 2001; 134: 224-238.

<sup>40</sup> Felez J **Nuevas perspectivas terapéuticas.** En: Rutlant ML y Artigas A Eds. Trastornos de la coagulación. Barcelona, España: Hoechst Iberica, 1991: 113-124.

### 3. FIBRINOLISIS

Como hemos comentado con anterioridad, existe un equilibrio trombosis/trombolisis en la placa de ateroma. De él va a depender que el trombo sea lo suficientemente grande como para ocasionar la obstrucción arterial y, por tanto el cuadro clínico agudo. En este equilibrio, la integridad del sistema fibrinolítico es crucial, para permitir la lisis del coágulo. La fibrinólisis es un mecanismo de defensa natural del organismo que limita la formación del coágulo, asegurando así la fluidez circulatoria. El sistema fibrinolítico es el encargado de eliminar la fibrina del lecho vascular y, para ello, emplea elementos procedentes del plasma, de las plaquetas, de otros tejidos y de otras células de la sangre. Su activación se lleva a cabo por la acción coordinada de activadores e inhibidores, estando en equilibrio dinámico con el sistema de coagulación para asegurar la permeabilidad vascular. La depresión del sistema fibrinolítico perpetuará la presencia de fibrina intravascular, es decir, el trombo, y por consiguiente favorecerá la trombosis. Hoy se sabe que este sistema interviene también en otros procesos en los que se produce proteólisis extravascular, por lo que desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios, en el crecimiento y diseminación tumoral y en la aterotrombosis<sup>41</sup>. El objetivo fundamental del sistema fibrinolítico es la lisis de la fibrina, que es insoluble, y su conversión en productos de degradación.

La formación de un entramado de fibrina resistente y estable es el último paso de la coagulación, y ocurre como resultado de la activación del

---

<sup>41</sup> Collen D, Lijnen HR **Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis**. Blood 1991;78: 3114- 3124.

fibrinógeno, inducido por la trombina. En este mismo punto tiene lugar la activación del factor XIII de la coagulación y se forman los enlaces cruzados de polímeros de fibrina. La importancia del riesgo trombogénico, además del aterogénico, viene demostrada por el papel de la fibrina en la patogénesis de los fenómenos aterotrombóticos. En las lesiones arterioscleróticas avanzadas de los vasos coronarios, la formación de los trombos mixtos de plaquetas y fibrina conduce a la clínica del síndrome coronario, angina inestable y/o infarto de miocardio<sup>42</sup>. Al crecer el coágulo, la red de fibrina que se forma sobre la placa se hace mucho más trombogénica<sup>43</sup>. Estudios "in vitro" han demostrado que las redes de fibrina procedentes de personas que han sufrido infarto de miocardio son mucho más rígidas y menos elásticas que las de personas sanas<sup>44</sup>.

El factor XIII de la coagulación facilita el entrecruzamiento de los monómeros de fibrina. El factor XIII activado tiene un papel crucial en la resistencia de la fibrina a la proteólisis. En experimentos realizados con perros, en los que se les inducía trombosis de las arterias coronarias, se ha demostrado que la inhibición del factor XIII conducía a la formación de trombos que eran lisados con mayor rapidez por el activador tisular del plasminógeno (t-PA)<sup>45</sup>.

---

<sup>42</sup> Falk E. **Coronary thrombosis: pathogenesis and clinical manifestations.** Am J Cardiol 1991; 68: 28B-35B.

<sup>43</sup> Blomback B, Carlsson K, Hessel B, Liljeborg A, Procyk R, Aslund N. **Native fibrin gel networks observed by 3D microscopy, permeation and turbidity.** Biochim Biophys Acta 1989; 997: 96-110.

<sup>44</sup> Fatah K, Silveira A, Tornvall P, Karpe F, Blomback M, Hamsten A. **Proneness to formation of tight and rigid fibrin gel structures in men with myocardial infarction at a young age.** Thromb Haemost 1996; 76: 535-540.

<sup>45</sup> Shebuski RJ, Sitko GR, Claremon DA, Baldwin JJ, Remy DC, Stern AM. **Inhibition of factor XIIIa in a canine model of coronary thrombosis: effect on reperfusion and acute reocclusion after recombinant tissue-type plasminogen activator.** Blood 1990; 75: 1455-1459.

### 3.1 Activadores de la fibrinólisis

Uno de los aspectos más importantes del sistema fibrinolítico viene dado por el conocimiento de que el plasma normal no tiene la capacidad de lisar la fibrina, a menos que él mismo, o los tejidos lesionados aporten un activador del sistema fibrinolítico.

Los principales componentes fibrinolíticos del plasma son el plasminógeno,  $\alpha_2$ -antiplasmina, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA).

La plasmina es la enzima proteolítica capaz de degradar la fibrina y existe en el plasma en forma de precursor inactivo, el plasminógeno. El gen que codifica el plasminógeno se localiza en el cromosoma 6. Éste es una glicoproteína de una sola cadena, que se sintetiza en el hígado y está distribuido por los tejidos y fluidos corporales como son la saliva, las lágrimas, el fluido de las vesículas seminales y el fluido prostático. Circula en el plasma a una concentración de 200 $\mu$ g/MI. Tiene una vida media de aproximadamente de dos días. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias en las que el sistema fibrinolítico es activado, su vida media disminuye considerablemente.

La activación del plasminógeno puede llevarse a cabo a través de tres mecanismos distintos, el sistema activador intrínseco (análogos del sistema de contacto de la coagulación), el sistema activador extrínseco (t-PA y u-PA) y los activadores exógenos<sup>46</sup>. Estos últimos incluyen agentes

---

<sup>46</sup> Collen D, Lijnen HR. **Basic and Clinical aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis**. Blood 1991; 78: 3114 – 3124.

farmacológicos. Vamos a centrarnos en breves líneas en la descripción de los activadores del sistema extrínseco.

El activador del plaminógeno tipo tisular (t-PA) es una enzima presente en las células endoteliales fundamentalmente. Los factores que regulan su síntesis y liberación desde el endotelio tiene importancia para la iniciación del proceso fibrinolítico. Entre éstos se incluyen: la histamina, la acetilcolina, las bradiquininas, la epinefrina, y las interleuquinas<sup>47</sup>. El t-PA se encuentra en el plasma humano a bajas concentraciones, aproximadamente de 0.1nm/l y tiene una vida media de unos seis minutos. Circula formando un complejo con su principal inhibidor, el inhibidor del plasminógeno tipo 1 (PAI -1), con menos de un 5% en forma libre. Tanto el t-PA como el complejo t-PA/PAI -1 son eliminados de la circulación por unos receptores específicos localizados en el hígado, que rápidamente internalizan y degradan la proteína. El t-PA manifiesta su mayor potencia catalítica cuando se une a la fibrina.

La liberación de t-PA desde las paredes del vaso es un paso importante en la regulación de la fibrinólisis<sup>48</sup>. No existe una relación entre la velocidad de destrucción del coágulo y la rapidez con que se secreta el t-PA desde el endotelio. Las plaquetas activadas sintetizan serotonina, de esta manera, inducen la liberación del t-PA desde las células endoteliales. Además éstas contienen en su superficie trombomodulina, una proteína que regula la activación de la proteína C. Esta última aunque por mecanismos no del todo aclarados, potencia la fibrinólisis.

---

<sup>47</sup> Collen D, Lijnen HR, Todd PA, Goa KL. **Tissue-type plasminogen activator. A review of its pharmacology and therapeutic use as a thrombolytic agent.** *Drugs* 1989; 38: 346 – 388.

<sup>48</sup> Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV. **Fluid flow stimulates tissue plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells.** *Science* 1989; 243: 1483–1485.

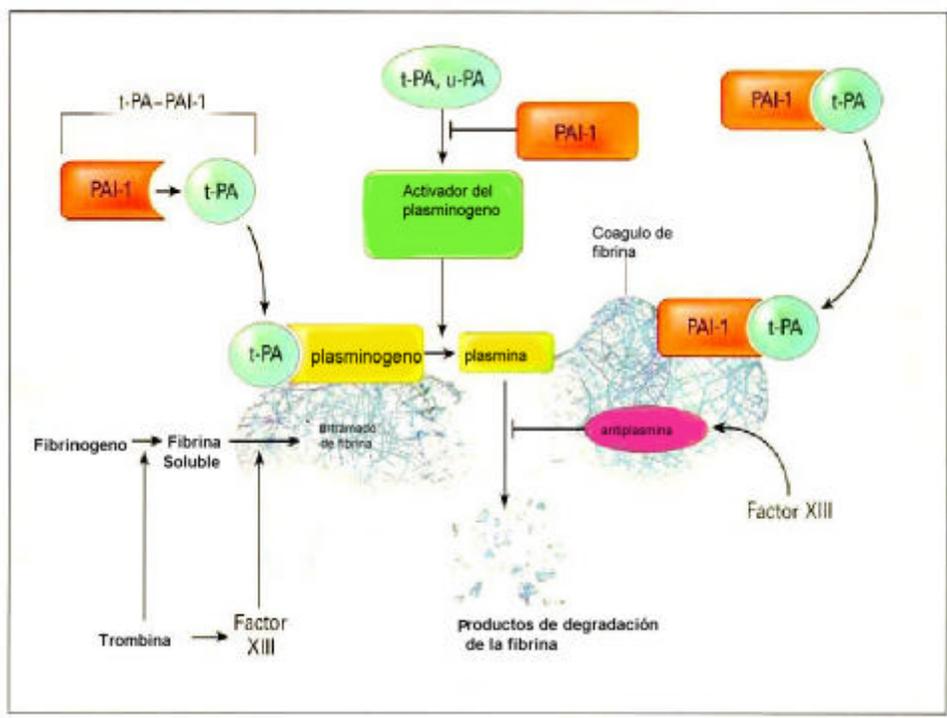
El activador tipo uroquinasa<sup>49</sup> (u-PA) fue identificado por primera vez en la orina. Se ha detectado en los cultivos de células endoteliales, células del riñón humano, células tumorales y en el plasma. Éste tiene una vida media corta, alrededor de cinco minutos, y es depurado de la circulación tanto por el hígado como por el riñón. Se sintetiza como una cadena simple que se conoce con el nombre de Prouroquinasa (scu-PA). El mecanismo por el que éste se convierte en u-PA está poco definido. Se ha postulado que en la superficie del trombo una pequeña cantidad de t-PA genera plasmina, que convierte el precursor (scu-PA) en u-PA, amplificando así el sistema fibrinolítico.

La degradación de la fibrina por parte de la plasmina ocurre de forma algo más lenta que la del fibrinógeno, su precursor. Los monómeros de fibrina, fibrinopéptidos A y B, son solubles. Forman fuertes enlaces covalentes entre sí, guiados por el factor XIII, pasando a ser insolubles. Este complejo entramado hace que los puntos de anclaje para la plasmina queden escondidos y sean menos accesibles. Tras la degradación de la fibrina se obtienen fragmentos de diferentes tamaños, los llamados productos de degradación. Los cuales también son digeridos a su vez por la plasmina.

En el siguiente esquema se ven en conjunto los procesos de activación e inhibición del sistema fibrinolítico.

---

<sup>49</sup> Collen D, Lijnen HR. **Basic and Clinical aspects of Fibrinolysis and Thrombolysis**. Blood 1991; 78: 3114 – 3124.



**Figura 3:** Activación e inhibición del sistema fibrinolítico. Tomada de Kohler 2000<sup>50</sup>.

<sup>50</sup> Kohler HP, Grant PJ, **Plasminogen activator inhibitor Type 1 and coronary artery disease.** New Eng J Med 2000; 342: 1792-1801.

### 3.2- Inhibición de la Fibrinólisis.

El sistema fibrinolítico que actúa como regulador de la coagulación, eliminando la fibrina no necesaria para la hemostasia, precisa, a su vez, un sistema de control que evite su activación excesiva.

Desde el momento en que el sistema fibrinolítico se pone en marcha sobre la superficie del coágulo de fibrina, la fibrinólisis está limitada localmente y no ocurre de forma sistémica. Plasminógeno, t-PA, y fibrina forman un complejo que promueve la formación de plasmina y consiguientemente la lisis de la fibrina. El plasminógeno y el t-PA están protegidos de la inactivación por sus respectivos inhibidores, la  $\alpha_2$ -antiplasmina y el PAI -1. Sin embargo el PAI -1 también tiene la capacidad de unirse a la fibrina, y cuando lo hace ésta frena su capacidad inhibitoria sobre el t-PA y el u-PA<sup>51</sup>. El ensamblaje del t-PA a la fibrina explica en parte el papel del PAI -1 en la fibrinólisis. La incorporación de anticuerpos monoclonales anti-PAI -1 en un trombo en formación aumenta la fibrinólisis y reduce la extensión del trombo, alumbrando la idea de que el PAI -1 promueve la estabilización y extensión del coágulo<sup>52</sup>. Después de que el PAI -1 ha sido activado en las plaquetas, es fijado en el interior del coágulo a través de su unión a la fibrina y frena su capacidad para inhibir al u-PA y t-PA, aumentando la resistencia del coágulo a la lisis<sup>53</sup>. En la circulación la

---

<sup>51</sup> Wagner OF, de Vries C, Hohmann C, Veerman H, Pannekoek H. **Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA): binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA.** J Clin Invest 1989; 84: 647-655.

<sup>52</sup> Levi M, Biemond BJ, van Zonneveld A-J, ten Cate JW, Pannekoek H. **Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity results in promotion of endogenous thrombolysis and inhibition of thrombus extension in models of experimental thrombosis.** Circulation 1992; 85: 305-312.

<sup>53</sup> Thorsen S. **The mechanism of plasminogen activation and the variability of the fibrin effector during tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis.** Ann N Y Acad Sci 1992; 667: 52-63.

mayoría del t-PA está unido al PAI-1 aunque una pequeña parte se encuentra libre o unida a la fibrina.

La inhibición del t-PA inducida por el PAI-1 desciende en un 80-90% en presencia de fibrina, porque tanto el complejo formado por el fibrinógeno unido a la trombina como la fibrina por sí sola, reducen la actividad del PAI-1<sup>54</sup>. Al tener la fibrina polimerizada una mayor complejidad estructural que los monómeros de fibrina, la accesibilidad del t-PA a la fibrina está más restringida. Según esto el t-PA aumentaría la fibrinólisis en los primeros estadios de la ruptura de la placa y formación de fibrina, mientras que cuando la fibrina esta completamente formada es más resistente a la fibrinólisis por el t-PA<sup>55</sup>. Por tanto, la regulación de la actividad fibrinolítica es llevada a cabo principalmente por el PAI-1, que es el factor en el que centraremos nuestra atención. No obstante hay que tener en cuenta que existen otros inhibidores de la fibrinólisis, a los cuales también nos referiremos brevemente.

---

<sup>54</sup> Levi M, Biemond BJ, van Zonneveld A-J, ten Cate JW, Pannekoek H. **Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity results in promotion of endogenous thrombolysis and inhibition of thrombus extension in models of experimental thrombosis.** *Circulation* 1992; 85: 305-312.

<sup>55</sup> Siddiqi F, Odrliin TM, Fay PJ, Cox C, Francis CW. **Binding of tissue-plasminogen activator to fibrin: effect of ultrasound.** *Blood* 1998; 91: 2019-2025.

a. PAI -1.

Se han identificado al menos hasta cuatro inhibidores del activador del plasminógeno. Éstos son el PAI -1, PAI -2, PAI -3 y una proteasa-nexina<sup>56</sup>. La molécula de PAI -1 representa el 60% del total de estos inhibidores del activador del plasminógeno y es en el que nos vamos a centrar a continuación.

a.1. Estructura del PAI -1.

El PAI -1 es una glicoproteína monocatenaria con un peso molecular de 48.000 Daltons, que contiene un péptido señal de 23 aminoácidos. La proteína madura está compuesta por 379 aminoácidos, con tres posibles lugares de N-glicosilación, presentando gran homología con otros inhibidores de la serinproteasas (serpinas)<sup>57</sup>. La estructura secundaria del PAI -1 consta de 6 hélices que se localizan en la región N- terminal, mientras que la estructura terciaria se parece a la de otras sérpinas, con el centro reactivo (Arg 346-Met347) localizado en la región carboxiterminal, con forma de lazo constituyendo un sustrato o "cebo" ideal para la proteinasa (sustrato suicida)<sup>55</sup>.

---

<sup>56</sup> Kruithof EK. **Plasminogen activator inhibitors. A review.** Enzyme 1988; 40: 113–121.

<sup>57</sup> Van Meijer M, Pannekoek H. **Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update.** Fibrinolysis 1995; 9: 263-276.

### Conformación latente y activa

El PAI-1 presenta tres formas inmunológicas con distinta reactividad hacia los activadores del plasminógeno (PA): la forma activa, que inhibe a los PA formando complejos inactivos; la forma latente o inactiva, que puede ser reactivada parcialmente mediante agentes desnaturalizantes como el sulfato dodecil sódico (SDS), guanidina-HC y urea, e "in vivo" por fosfolípidos, y la forma sustrato o proteolíticamente degradada e inactiva que no puede ser reactivada<sup>58</sup>. El PAI-1 es secretado por las células endoteliales en la forma activa y pasa espontáneamente a la forma latente o inactiva, debido a un cambio conformacional en la estructura terciaria de la proteína, que oculta el centro activo e impide la unión de las serínproteasas<sup>59</sup>.

Del total del PAI-1 antigénico, un 8% se encuentra en el plasma en forma activa y el 92 % restante se almacena en las plaquetas, donde se encuentra en forma latente. Se ha estimado que la concentración de PAI-1 plaquetario es de 0,1- 0,3  $\mu\text{g}/10^9$  plaquetas, y que durante el proceso de agregación plaquetaria se produce un aumento de este inhibidor (2-5 veces la actividad funcional y 6-10 veces las concentraciones de PAI-1 antigénico). Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 activo en las personas sanas varían entre 0-40 U/ml, mientras que las de PAI-1 antigénico oscilan entre 5-100 ng/ml, con valores medios de 20 ng/ml. La forma activa del PAI-1 es inestable con una vida media que no llega a los 20

---

<sup>58</sup> Orbe J, Montes R y Paramo JA. **Papel del PAI-1 en los procesos trombóticos**. Med Clin 1999; 113: 63-69.

<sup>59</sup> Sancho E, Declercq PJ, Price NC, Kelly SM, Booth NA. **Conformational studies on plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in active, latent, substrate and cleaved forms**. Biochemistry 1995; 34: 1064-1069.

minutos. Este se une rápidamente al t-PA y al u-PA, formando un complejo estable que es eliminado de la circulación por el hígado<sup>60</sup>.

El PAI -1 se une en el plasma a la vitronectina, glucoproteína con un peso molecular de 75KD que se encuentra como una proteína dimérica, y que al ligarse al PAI -1, estabiliza la molécula en su forma activa, formando un complejo estequiométrico 1:1, lo que prolonga la vida media del PAI -1 unido a esta proteína transportadora. Además la vitronectina facilita la permanencia del PAI -1 activo en la matriz subendotelial extracelular, por lo que inhibe la fibrinólisis a nivel local, favoreciendo la inhibición de la trombina a ese nivel<sup>61</sup>. La heparina potencia la inhibición de la trombina por el PAI -1. Se ha demostrado que en presencia de heparina, la especificidad del PAI -1 por la trombina aumenta considerablemente<sup>62</sup>. La interacción del PAI -1 con la fibrina es específica, reversible y saturable. Se ha demostrado la presencia de PAI -1 no solo en la superficie del coágulo, sino también en las plaquetas activadas que se extienden sobre la superficie de la fibrina, por lo que las plaquetas deben tener un papel importante en esta interacción. Varios agentes pueden promover la inactivación del PAI -1. La liberación de oxidantes por diversas células puede conducir a la degradación local de este inhibidor. También la proteína C es capaz de inactivar al PAI -1, como se ha demostrado "in vitro" en cultivos de células endoteliales<sup>63</sup>. Así mismo, la trombina reduce la actividad del PAI -1 a nivel

---

<sup>60</sup> Van Meijer M, Pannekoek H **Structure of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and its function in fibrinolysis: an update.** Fibrinolysis 1995; 9: 263-276.

<sup>61</sup> Ehrlich HJ, Klein Gebbink R, Preissner KT, Keijer J, Esmon NL, Mertens K et al **Thrombin neutralizes plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) that is complexed with vitronectin in the endothelial cell in matrix.** J Cell Biol 1991; 115: 1773-1781.

<sup>62</sup> Keijer J, Linders M, Van Zonneveld AJ, Ehrlich HJ, De Boer JP, Pannekoek H **The interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: localization of interaction sites and physiologic relevance.** Blood 1991; 78: 401-409.

<sup>63</sup> Orbe J, Montes R, Paramo JA. **Papel del PAI-1 en los procesos trombóticos.** Med Clin 1999; 113: 63-69.

endotelial, aunque el significado fisiopatológico de esta observación aún no se ha establecido<sup>64,65</sup>

#### a.2. Regulación de la Producción de PAI -1.

La molécula de PAI-1 esta compuesta de 379 aminoácidos. Es sintetizado por las células endoteliales, plaquetas, monocitos, macrófagos, células de músculo liso, hepatocitos y adipocitos<sup>66</sup>. Las células endoteliales y las plaquetas regulan la producción de PAI-1 durante la fibrinólisis. Cuando las plaquetas son estimuladas por la trombina, el PAI-1 es liberado de la superficie de éstas, protegiendo el coágulo sanguíneo de la lisis prematura. Este proceso conlleva un rápido aumento local de la concentración de PAI-1 en la circulación. La trombina, por tanto, también regula la síntesis endotelial de PAI-1. Los trombos ricos en plaquetas son más rápidamente lisados por el t-PA en ratones sin PAI-1 que en ratones normales, esto sugiere que la inhibición del PAI-1 mejoraría el desarrollo de la trombolisis<sup>67</sup>.

---

<sup>64</sup> Lawrence D, Loskutoff DJ. **Inactivation of plasminogen activator inhibitory by oxidants.** Biochemistry 1986; 25: 6351-6355.

<sup>65</sup> Sakata Y, Loskutoff DJ, Gladstone CL, Hekman CM, Griffin JH **Mechanism of protein C-dependent clot lysis: role of plasminogen activator inhibitor.** Blood 1986; 68: 1218-1223.

<sup>66</sup> Sprengers E.D. and Kluft C. **Plasminogen activator inhibitor.** Blood 1987; 69: 381-387.

<sup>67</sup> Zhu Y, Carmeliet P, Fay WP. **Plasminogen activator inhibitor is a major determinant of arterial thrombolysis resistance.** Circulation 1999; 99: 3050-3055.

### a.3 Funciones del PAI -1

El PAI -1 es el más eficaz de los inhibidores de los activadores del plasminógeno. Reacciona con las formas simple y bicatenaria del t-PA y con los activadores de tipo u-PA, pero no con la prouroquinasa ni con la estreptoquinasa. Además, el PAI -1 puede unirse al t-PA ligado a fibrina y a la uroquinasa unida al receptor celular<sup>68</sup>.

Otra función fisiológica del PAI -1 es la estabilización del tapón hemostático al prevenir la lisis del coágulo de fibrina<sup>69</sup>. También la unión con la vitronectina convierte al PAI -1 en un agente inhibidor de la trombina. Este hecho tiene una especial importancia fisiopatológica si se tiene en cuenta que la vitronectina estabiliza al PAI -1 activo, tanto a nivel plasmático como en la matriz extracelular<sup>70</sup>.

Existen evidencias de que el PAI -1 desempeña un papel en otros procesos biológicos como la ovulación, angiogénesis, migración celular y metástasis tumoral<sup>71</sup>.

---

<sup>68</sup> Lindahl TL, Sigurdardottir O, Wiman B **Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)**. *Thromb Haemost* 1989; 62: 748-751.

<sup>69</sup> Braaten JV, Jerome HWG, Kirkpatrick J, Lewis JC, Hantgan RR **Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor-1: light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model of platelet-fibrin thrombus**. *Blood* 1993; 81: 1290-1299.

<sup>70</sup> Cesari M, Rossi GP. **Plasminogen activator type 1 in ischaemic cardiomyopathy**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 6: 1378-1386.

<sup>71</sup> Orbe J, Montes R , Paramo JA. **Papel del PAI-1 en los procesos trombóticos**. *Med Clin* 1999; 113: 63-69.

#### a.4. Regulación de la expresión de PAI -1.

El gen del PAI-1 fue clonado en 1986 por distintos grupos investigadores. Se localiza en la región q 21.3 – q 22 del cromosoma 7. Se conoce la secuencia completa del gen con una longitud de 12,2 kb, organizado en 8 intrones y 9 exones. El análisis del ARN demuestra la existencia de dos especies de ARN mensajeros de 3.5 y 2.3 kb.

Se han descrito algunos polimorfismos en el gen del PAI -1, como el 4G/5G en la región promotora y el de restricción Hind III en el intrón 3, que pueden contribuir a una expresión anómala del PAI -1<sup>72</sup>.

También se ha descrito una mutación en una familia con diátesis hemorrágica y ausencia de PAI -1 funcional y antigénico en el plasma y las plaquetas, debida a la inserción de 2pb en el exón 4, que produce un desplazamiento del marco de lectura, un codón de terminación temprano y una proteína anómala no funcionante.

La expresión del PAI -1 puede ser modulada por diversos agentes, cuyo efecto sobre el gen del PAI -1 parece ser a nivel transcripcional. Se ha demostrado "in vitro" que existe un aumento de la expresión del gen del PAI -1 a nivel endotelial tras la estimulación con lipopolisacáridos, interleuquina-1, citocinas (TNF $\alpha$ ), TGF  $\beta$ , factor de crecimiento de fibroblastos, trombina, VLDL, lipoproteína (a), y angiotensina II, hipertermia, proinsulina, altas concentraciones de glucosa y t-PA. Por el contrario, se ha observado un descenso en la transcripción del gen del PAI -1 en las células endoteliales tras la estimulación con el factor de

---

<sup>72</sup> Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arvelier D et al. **Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 851-858.

crecimiento de unión a la heparina (HBGF-1) y con el gemfibrocilo<sup>73</sup>. También se ha demostrado un descenso en la expresión endotelial de este gen, así como de la concentración proteica del PAI-1, con el uso de heparina de bajo peso molecular y de heparina no fraccionada<sup>74</sup>.

A nivel plaquetario los mecanismos de regulación del PAI-1 no están claramente definidos. Diversos agentes proagregantes como la trombina inducen la liberación del PAI-1. Esta liberación desde los gránulos  $\alpha$  puede ser inducida a través de la producción de factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ), uno de los más potentes reguladores de la proliferación y migración celular.

La concentración de PAI-1 presenta una variabilidad intrínseca entre los distintos individuos, y está influenciada por algunos factores ambientales. Además de los mencionados previamente se ha visto que "in vivo", la infusión de endotoxinas en animales y de lipopolisacáridos en hombres conlleva un aumento de los niveles de PAI-1. Esto explicaría que tanto la bacteriemia como la endotoxemia modifiquen los niveles plasmáticos de PAI-1<sup>75</sup>. Se ha demostrado que, el ejercicio físico moderado disminuye los niveles de PAI-1 antigénico, tras 30 y 60 minutos, en pacientes normotensos e hipertensos<sup>76</sup>. El entrenamiento físico también

---

<sup>73</sup> Fujii S, Sawa H, Sobel BE **Inhibition of endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type-1 by Gemfibrozil**. *Thromb Haemost* 1993; 70: 642-647.

<sup>74</sup> Chordá C, Páramo JA, Rocha E **Comparison of the effect of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and hirudin (Revasc™) on the fibrinolytic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells**. *Fibrinolysis* 1996; 10: 43-48.

<sup>75</sup> Cesari M, Rossi GP **Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Ischemic Cardiomyopathy**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1378-1386.

<sup>76</sup> De Souza CA, Dengel DR, Rogers MA, Cox K, Macko RF. **Fibrinolytic responses to acute physical activity in older hypertensive men**. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1765-1770.

disminuye la actividad plasmática del PAI -1, pero no el PAI -1 antigénico, en hombres con y sin cardiopatía isquémica<sup>77</sup>.

El stress también se ha relacionado con la alteración del sistema fibrinolítico en la medida en que modifica la concentración plasmática de PAI -1<sup>78</sup>.

La influencia del tabaco está aun por demostrar ya que los estudios son contradictorios. Se han observado incrementos de la actividad plasmática del PAI -1 en individuos fumadores y exfumadores con cardiopatía isquémica<sup>79</sup>, pero no se ha encontrado relación del tabaco con el PAI -1 cuando se estudiaban personas sanas.

Otros factores que van a influir sobre la producción de PAI -1 son la glucosa y la insulina. Ambas, aumentan la síntesis y secreción de PAI -1 en las células endoteliales humanas y en las células de músculo liso "in vitro"<sup>80</sup>. Estudios sobre la región promotora del gen del PAI -1 han demostrado que la hiperglucemia aumenta la trascricpción del gen justo delante del punto de inicio de la misma<sup>81</sup>. De este modo la reducción de los niveles de glucosa conllevaría descensos de la trascricpción del gen y, por consiguiente, aumento de la actividad fibrinolítica en el tejido vascular. Se ha demostrado que el buen control de la glucemia desciende los niveles de

---

<sup>77</sup> Fernhall B, Szymanski LM, Gorman PA, Milani J, Paup DC, Kessler CM. **Fibrinolytic activity is similar in physically active men with and without a history of myocardial infarction.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1106-1113.

<sup>78</sup> Räikkönen K, Lassila R, Kettilkangas-Järvinen 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

<sup>79</sup> Cesari M, Rossi GP **Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 in Ischemic Cardiomyopathy.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1378-1386.

<sup>80</sup> Kohler H.P., Grant P.J, **Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** *New Eng J Med* 2000; 342: 1792-1801.

<sup>81</sup> Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE. **Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 1998; 273: 8225-8231.

PAI -1 en personas con diabetes tipo 2<sup>82</sup>. También se ha observado que el tratamiento con insulina suprime la secreción endógena de esta hormona y de las moléculas precursoras como la proinsulina, y que esto conduce a descensos de la actividad plasmática del PAI -1<sup>82</sup>. Otros trabajos han demostrado que tanto la insulina como la proinsulina participan en la expresión del ARN mensajero del PAI -1 en las células de aorta porcina, por lo que ambas tendrían un papel regulador en la síntesis de éste<sup>83</sup>.

Como ocurre sobre el riesgo de enfermedad coronaria, los estrógenos van a influir positivamente sobre la producción de PAI -1. En estudios realizados en ambos sexos se comprobó que los niveles de PAI -1 eran mayores en hombres que en mujeres. Es conocido que la testosterona está relacionada con los niveles plasmáticos de PAI -1<sup>84</sup>. Se ha demostrado en diversos estudios que las mujeres posmenopáusicas, que reciben tratamiento hormonal sustitutivo con estrógenos, presentan menores niveles de PAI -1 que aquellas que no lo reciben. Y lo que es más, las mujeres premenopáusicas tienen menor concentración plasmática de PAI -1 que las posmenopáusicas<sup>85</sup>. Este efecto protector de los estrógenos en las mujeres premenopáusicas, parece estar mediado por el aumento de la fibrinolisis.

Junto a la participación de la glucosa, la insulina y los estrógenos, hay evidencias en la literatura del nexo existente entre el sistema de renina-

---

<sup>82</sup> Jain SK, Nagi DK, Slavin BM, Lumb PJ, Yudkin JS. **Insulin therapy in type 2 diabetic subjects suppresses plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity and proinsulin-like molecules independently of glycaemic control.** Diabet Med 1993; 10: 27-32.

<sup>83</sup> Scheneider DJ, Nordt TK, Sobel BE. **Stimulation by proinsulin of expression of plasminogen activator inhibitor type -1 in endothelial cells.** Diabetes 1992; 41: 890-895.

<sup>84</sup> Henry M, Tregouet DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G, Tiret L, Juhan-Vage I. **Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 84-91.

<sup>85</sup> Kohler H.P., Grant P.J. **Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** New Eng J Med 2000; 342: 1792-1801.

angiotensina y la fibrinólisis. La angiotensina II estimula la producción de PAI-1 en cultivos de células endoteliales y de músculo liso "in vitro". Además la inhibición del enzima convertidora de angiotensina desciende tanto los niveles de PAI -1 como su actividad plasmática<sup>86</sup>.

Junto a los descritos, otros factores como las VLDL o los ácidos grasos poliinsaturados, aumentan la síntesis de PAI -1 en cultivos celulares<sup>87,88</sup>. Las células endoteliales cultivadas en presencia de células de músculo liso producen mayores niveles de PAI -1 que las células endoteliales cultivadas de forma aislada<sup>89</sup>.

---

<sup>86</sup> Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. **Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells: a potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis.** J Clin Invest 1995; 95: 995-1001.

<sup>87</sup> Nilsson L, Gafvels M, Musakka L, et al. **VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor.** J Lipid Res 1999; 40: 913-919.

<sup>88</sup> Henry M, Treguet D.A. **Metabolic determinants are much more important than genetic polymorphism in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 89-91.

<sup>89</sup> Gallicchio M, Argyriou S, Ianches G, et al. **Stimulation of PAI-1 expression in endothelial cells by cultured vascular smooth muscle cells.** Arterioscler Thromb 1994; 14: 815-23.

#### a.5. PAI -1 y enfermedad cardiovascular.

El PAI -1 tiene un papel importante en la patogenia del síndrome coronario agudo, y se asocia con diversos factores de riesgo, clásicamente relacionados con la enfermedad coronaria.

Parece existir una asociación entre la enfermedad cardiovascular y un descenso en la actividad fibrinolítica del plasma, y esto puede ser explicado con el aumento de la concentración plasmática del PAI -1, como se ha demostrado en el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities)<sup>90</sup>. Las concentraciones elevadas de PAI -1, están involucradas en el desarrollo de fenómenos trombóticos. Los niveles elevados de PAI -1 se han considerado factor de riesgo independiente para el reinfarto de miocardio en pacientes que han tenido un infarto antes de los 45 años<sup>90</sup>.

En el trabajo prospectivo de Northwick Park Heart Study<sup>91</sup>, se estableció una clara relación entre la menor actividad fibrinolítica al inicio del estudio y el desarrollo posterior de enfermedad coronaria en hombres jóvenes, apoyando la hipótesis de que la menor actividad fibrinolítica precedía a la enfermedad cardiovascular. En el estudio prospectivo multicéntrico European Concerted Action on Trombosis and Disabilities (ECAT)<sup>92</sup>, las concentraciones elevadas de PAI -1 funcional y antigénico se relacionaban con la enfermedad coronaria de los pacientes con angor, sin

---

<sup>90</sup> Salomaa V, Stinson V, Kark JD, Folsom AR, Davis CE, Wu KK. **Association of fibrinolytic parameters with early atherosclerosis: the ARIC Study-Atherosclerosis Risk in Communities Study.** Circulation 1995; 91: 284-290.

<sup>91</sup> Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. **Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study.** Lancet 1993; 342: 1076-1079.

<sup>92</sup> **ECAT Angina Pectoris Study Group. Baseline associations of haemostatic factors with extent of coronary arteriosclerosis and other coronary risk factors in 3000 patients with angina pectoris undergoing coronary angiography.** Eur Heart J. 1993; 14: 8-17.

embargo esta asociación desaparecía al corregir y ajustar por factores de riesgo que reflejaban resistencia a la insulina como el índice de masa corporal, la concentración de triglicéridos y de colesterol.

Otro estudio de casos y controles llevado a cabo en una población del norte de Suecia, con una alta prevalencia de enfermedad coronaria, demuestra que los índices altos de PAI-1 predecían el desarrollo del primer episodio de infarto de miocardio<sup>93</sup>.

Existen evidencias que apoyan la teoría de que las concentraciones elevadas de PAI-1 están asociados con la progresión del síndrome coronario y el infarto de miocardio. También pueden predecir la aparición de infarto de miocardio en pacientes con angina estable<sup>94</sup>. Asimismo, se han podido correlacionar con la evidencia angiográfica de progresión de la enfermedad coronaria en jóvenes pacientes con historia de infarto<sup>95</sup>.

No sólo el aumento a nivel sistémico tiene un papel relevante en el desarrollo de cardiopatía isquémica, sino que cada vez está cobrando mayor importancia la síntesis local de PAI-1 en las lesiones arterioscleróticas. Esto se explica fácilmente, teniendo en cuenta que las citoquinas y la trombina pueden aumentar la síntesis local de PAI-1. Se ha visto que el material ateromatoso estudiado tras la aterectomía, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 contenía mayor cantidad de PAI-1 que el extraído de las arterias de pacientes sin diabetes. Igualmente, la

---

<sup>93</sup> 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.

<sup>94</sup> Held C, Hjemdahl P, Rehnqvist N et al. **Fibrinolytic variables and cardiovascular prognosis in patients with stable angina pectoris treated with verapamil and metoprolol: results from the Angina Prognosis Study in Stockholm.** *Circulation* 1997; 95: 2380-2386.

<sup>95</sup> Bavenholm P, de Faire U, Landou C, et al. **Progression of coronary artery disease in young male post-infarction patients is linked to disturbances of carbohydrate and lipoprotein metabolism and to impaired fibrinolytic function.** *Eur Heart J* 1998; 19: 402-410.

cuantificación de PAI-1 mensajero (ARNm) es mayor en las arterias arterioscleróticas que en las normales. Estos datos indican que el aumento de la expresión del gen del PAI-1 en la pared arterial, y al igual en la placa, podría facilitar la aparición de fenómenos trombóticos tras la ruptura de la placa<sup>96</sup>.

La producción de PAI-1 también influye en la migración celular. Las integrinas y otros receptores de adhesión, proteoglicanos y proteasas (en especial el activador del plasminógeno), que actúan como verdaderas moléculas de adhesión en el remodelado vascular, inician la adhesión y proliferación de las células endoteliales<sup>97</sup>. Durante la cicatrización de las heridas, la expresión del u-PA y las integrinas están elevadas en células que participan en el proceso de migración celular, como las endoteliales, células de músculo liso y sanguíneas. En el propio coágulo de fibrina existen algunos elementos capaces de estimular la migración celular, entre ellos la vitronectina, una proteína plasmática y de la matriz extracelular que se une a la célula endotelial a través del receptor para el u-PA. El PAI-1 inhibe esta unión y por tanto el bloqueo de la migración celular. Parece existir una relación directa entre el activador del plasminógeno y la migración celular mediada por las integrinas y la vitronectina<sup>98</sup>. De este modo se puede decir que el PAI-1 tiene un papel en el remodelado vascular independiente de la inhibición del t-PA.

Por tanto, podemos resumir lo anteriormente expuesto indicando que las cifras plasmáticas elevadas de PAI-1 están relacionadas con el inicio y la

<sup>96</sup> Lupu F, Heim DA, Bachman F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. **Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1444-1455.

<sup>97</sup> Preissner KT, May AE, Wahn KD, Germer M, Kanse SM. **Molecular cross talk between adhesion receptors and proteolytic cascades in vascular remodelling.** *Thromb Haemost* 1997; 78: 88-95.

<sup>98</sup> Kohler HP, Grant PJ. **Plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease.** *New Eng J Med* 2000; 342: 1792-1801.

progresión de la enfermedad coronaria. Además, la mayor producción de PAI -1 en la placa de ateroma favorece su complicación, y por último, este factor va a interferir con el remodelado vascular, tras la injuria arterial.

a.6. Polimorfismos del PAI -1 y riesgo cardiovascular.

El gen del PAI -1 esta localizado en el cromosoma 7, contiene 9 exones y 8 intrones. Hasta el momento se han descrito ocho polimorfismos diferentes en este gen, incluyendo la repetición de una par de bases citosina-adenina (CA)<sub>n</sub>, una en la región promotora y otra en el intrón 4; restricción de un fragmento Hind III en el intrón 3; la inserción-delección de una guanina en la posición -675 pares de bases de la región promotora del gen; la sustitución de una adenina por una guanina en la posición -844 de la región promotora y en la posición +9785; la sustitución de una guanina por timina (GT) en la posición +11053; y la delección de nueve nucleótidos entre las posiciones +11320 y +11345<sup>99</sup>.

Los polimorfismos más estudiados en relación con la enfermedad cardiovascular son el 4G/5G, el Hind III y la repetición de dos bases (CA) en el intrón 4<sup>99</sup>. Recientemente también se ha visto implicado el polimorfismo A-844G. Se conoce el desequilibrio genético que existe entre estos polimorfismos y de ahí que estén todos ellos relacionados con el desarrollo de enfermedad aterotrombótica.

---

<sup>99</sup> Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arvelier D et al. **Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 851-858.

La frecuencia de estos polimorfismos estudiada en la población general<sup>100</sup> ha sido de 0.14 para el 4G4G, 0.54 en el 4G5G y de 0.32 para los homocigotos 5G. La frecuencia del alelo 4G, en la población general, ha sido de 0.55 y de 0.54 para el alelo 5G<sup>101</sup>. Para el polimorfismo A-844G se ha encontrado una frecuencia alélica de 0.58 para el alelo A y 0.41 para el alelo G<sup>102</sup>.

Los individuos homocigotos para el alelo 4G presentan un 25 % más de concentración del PAI-1 al compararlos con los que poseen el genotipo 5G5G. Este hecho se ha relacionado con el proceso de transcripción. Las concentraciones superiores de PAI-1 en los individuos homocigotos para el alelo 4G se explican por la pérdida de afinidad de dicho alelo por una molécula represora de la transcripción<sup>103</sup> ( figura 4).

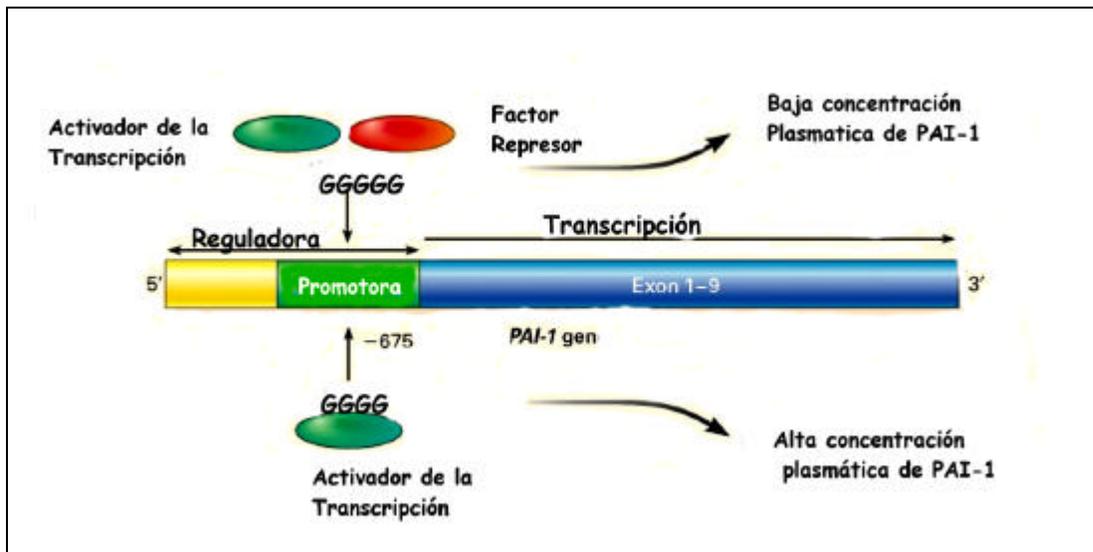
---

<sup>100</sup> Cesari M, Sartori MT, Patrassi GM, Vettore S, Rossi GP. **Determinants of plasma levels of plasminogen activator inhibitor-1.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 316-320.

<sup>101</sup> Margaglione M, Cappucci M, d'Addeda M, Colazzio D, Giuliani N. **PAI-1 plasma levels in a general population without clinical evidence of atherosclerosis. Relation to environmental and genetic determinants.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 562-567.

<sup>102</sup> Henry M, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, Siest G. **Metabolic determinant are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18: 84-91.

<sup>103</sup> Kohler HP, Grant PJ. **Plasminogen activator inhibitor Type 1 and coronary artery disease.** *New Eng J Med* 2000; 24: 1792-1801.



**Figura 4:** Gen del PAI -1. Polimorfismo 4G/5G. Tomada de Kohler 2000<sup>84</sup>.

Aquellas personas con hipertrigliceridemia, que presentan el genotipo 4G/4G, poseen niveles de PAI -1 más elevados que los homocigotos para el alelo 5G, indicando una interacción específica del genotipo con los triglicéridos<sup>104</sup>. Estos hallazgos están apoyados por la identificación de una región vecina al sitio 4G/5G sensible a la VLDL<sup>105</sup>. Además se conoce, gracias a experimentos realizados "in vitro", que los triglicéridos estimulan la producción de PAI -1 por los hepatocitos, y que este mecanismo está mediado por el incremento de los receptores de LDL en presencia de insulina<sup>106</sup>. Por lo tanto existen evidencias clínicas y de laboratorio que nos confirman la idea que en el síndrome de resistencia a la insulina existe una

<sup>104</sup> 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.

<sup>105</sup> 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.

<sup>106</sup> 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.

sobreproducción y secreción de PAI -1 todo ello parece mediado por los triglicéridos y las VLDL.

Son varios los estudios que han demostrado la relación entre el genotipo, más concretamente el alelo 4G y el desarrollo de enfermedad cardiovascular. Estos estudios se han llevado a cabo tanto en personas diabéticas, hipertrigliceridémicos como en individuos sanos. En estos trabajos se encontró un aumento significativo de los niveles de PAI -1 en los homocigotos para el alelo 4G. Sin embargo existen otros estudios como el Etude Cas-Termin de l'Infarctus du Myocarde<sup>107</sup> y el de Physicians' Health Study<sup>108</sup> que no encontraron relación entre el genotipo y la incidencia de infarto de miocardio. En otro trabajo realizado en 2565 personas, a las que se les sometió a un cateterismo con fines diagnósticos, se relacionó el genotipo del PAI -1 con la presencia de ateroma en todos los participantes, y con la severidad de la lesión en aquellos con riesgo cardiovascular más alto, aunque no se encontró relación entre el genotipo del PAI -1, y el antecedente de infarto de miocardio<sup>109</sup>. También se ha demostrado la mayor incidencia de reestenosis tras el infarto agudo de miocardio en los individuos portadores del alelo 4G al compararlos con los homocigotos del alelo 5G<sup>110</sup>.

---

<sup>107</sup> 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.

<sup>108</sup> 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.

<sup>109</sup> Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. **The 4G/4G 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.

<sup>110</sup> 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.

### a.7. Relación entre el PAI -1 y los factores de riesgo cardiovascular.

La teoría que apoya que la fibrinólisis en general, y el PAI -1 en particular, están involucrados en el desarrollo de enfermedad cardiovascular está basada en las características biológicas del PAI -1, y en el hecho de encontrar niveles elevados de PAI -1 asociados a la presencia de otros factores de riesgo cardiovascular. La producción de PAI -1 tiene un ritmo circadiano, siendo los niveles en las primeras horas de la mañana mayores que durante el resto del día<sup>111</sup>. Se ha sugerido la idea que esta variación circadiana se mantiene en los enfermos con síndrome coronario agudo, y que la caída fisiológica de la actividad fibrinolítica sanguínea, que tiene lugar durante las primeras horas de la mañana, puede favorecer el desarrollo de trombosis, hecho que estaría de acuerdo con la mayor incidencia de infarto en este momento del día.

Son muchos los factores de riesgo identificados clásicamente con la enfermedad cardiovascular, entre ellos, el sobrepeso, el tabaco, el sedentarismo, la dislipemia, la edad avanzada, las concentraciones de testosterona, la hipertensión arterial y la diabetes mellitus no insulino dependiente. La acumulación de estos factores se asocia con un incremento exponencial en el riesgo de enfermedad cardiovascular. En 1983 Reaven propuso la existencia del síndrome de resistencia a la insulina. En este síndrome, la presencia de estos factores de riesgo agrupados era mayor que la que cabría esperar para cada uno de ellos por separado. A la descripción de Reaven acerca de la suma de factores de riesgo para la

---

<sup>111</sup> 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.

enfermedad aterosclerótica, se le han sumado también los factores de riesgo trombóticos relacionados con la resistencia a la insulina. La inhibición de la fibrinólisis, debida a las concentraciones elevadas de PAI -1, se ha encontrado tanto en personas normoglucémicas con resistencia a la insulina, como en pacientes con diabetes tipo 2. Las concentraciones plasmáticas de otros factores de riesgo, para el desarrollo de trombosis, como son el factor VII de la coagulación, el factor von Willebrand y el fibrinógeno, también se correlacionan con la resistencia a la insulina y están elevados en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Las personas con resistencia a la insulina, aún cuando tienen concentraciones normales de glucosa, presentan niveles elevados de PAI -1<sup>112</sup>. Las medidas que contribuyen a descender la resistencia a la insulina como son la pérdida de peso, se acompañan invariablemente de descensos en los niveles de PAI -1<sup>113</sup>. Estudios clínicos han demostrado que las personas con enfermedad coronaria presentan frecuentemente ambos fenómenos asociados, aumento del PAI -1<sup>114</sup> y resistencia a la insulina. Estos hallazgos indican que el PAI -1 juega un papel importante en los fenómenos aterotrombóticos, principalmente por su asociación con otros factores de riesgo establecidos.

---

<sup>112</sup> Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardissonne JP, Heim M, Vague P. **Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients - relationship with plasma insulin.** Thromb Haemost 1989; 61: 370-373.

<sup>113</sup> Svendsen OL, Hassager C, Christiansen C, Nielsen JD, Winther K. **Plasminogen activator inhibitor-1, tissue-type plasminogen activator, and fibrinogen: effect of dieting with or without exercise in overweight postmenopausal women.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16:381-385.

<sup>114</sup> Juhan-Vague I, Vague P, Alessi MC, Badier C, Valadier J, et al. **Relationships between plasma insulin triglycerides, body mass index, and plasminogen activator inhibitor 1.** Diabetes Care 1987; 13: 331-336.

#### a.8. PAI -1 y lipoproteínas aterógenas.

El riesgo de padecer enfermedad coronaria está asociado no sólo con las concentraciones plasmáticas de las LDL, sino también con cambios cualitativos de estas lipoproteínas, fundamentalmente en el tamaño y la densidad. Con relación a éstos, se han determinado tres fenotipos de LDL. El fenotipo A corresponde a las partículas con diámetro mayor de 25.5 nm, denominadas partículas grandes o poco densas. Las de diámetro menor de 25.5 nm, o partículas pequeñas y densas corresponden al fenotipo B, y las que se encuentran entre estos tamaños forman el fenotipo intermedio.

El tamaño de la partícula de LDL se determina por electroforesis, adaptada al procedimiento descrito por Kraus and Burke<sup>115</sup>.

El fenotipo B se ha asociado con un incremento de riesgo de arteriosclerosis y mayor susceptibilidad a la oxidación. Existen numerosos estudios que demuestran que este fenotipo está relacionado con variaciones en los niveles en plasma de otros lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas que también marcan un perfil aterogénico. Las LDL pequeñas y densas se han asociado a una disminución de los niveles de C-HDL y a un aumento de los triglicéridos (TG), VLDL e IDL. Existen estudios que demuestran un aumento de la prevalencia de LDL pequeñas y densas en pacientes con enfermedad coronaria prematura. Estas LDL se describen como partículas deplecionadas en ésteres de colesterol, y sobre todo con una disminución del contenido de colesterol por partícula, así como un aumento de la apo B. Otra de las características de las LDL

---

<sup>115</sup> Kraus RM, Burke DJ. **Identification of different subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans.** J Lipid Res 1982; 23: 97-104.

fenotipo B es su mayor susceptibilidad a la modificación oxidativa, frente a las partículas grandes o fenotipo A. Los mecanismos propuestos para explicar el potencial aterógeno de las LDL densas son varios. Uno sería la modificación en la proporción colesterol/proteínas y en el contenido en ésteres de colesterol, que produce cambios en la conformación de la superficie de la partícula y afecta su metabolismo intravascular, facilitando la interacción con la pared arterial. Otro mecanismo sería la disminución del contenido en hidratos de carbono de la fracción pesada.

En resumen, el fenotipo B de las LDL, que conlleva LDL pequeñas y densas, se ha asociado a un aumento de triglicéridos y a un descenso de HDL, y confiere una mayor susceptibilidad a la oxidación. Estas LDL pequeñas y densas son por tanto, más aterogénicas. Este fenotipo B de las LDL es más frecuente en los enfermos diabéticos, pudiendo estar relacionado con la resistencia a la insulina y se ha asociado también a la hipertensión arterial. Estas LDL fenotipo B parecen tener una menor afinidad por el receptor de apo B, en relación quizás con su mayor contenido en apo E, y puede ser catabolizada por vías independientes de este receptor de apo B. Su potencial aterogenicidad estaría ligada a las modificaciones que pueden inducir en el calcio intracelular.

Se ha descrito recientemente la relación existente entre las LDL pequeñas y densas y el aumento de los niveles de PAI -1<sup>116</sup>. En el estudio IRAS<sup>117</sup> (Insulin Resistance Atherosclerosis Study) se analizó la sensibilidad a la insulina en un grupo de 1.549 diabéticos o personas con

---

<sup>116</sup> Vaisanen S, Baumstark MW, Penttila I, Bouchard C, Halonen P, et al. **Small, dense LDL particle concentration correlates with plasminogen activator inhibitor type -1 (PAI-1) activity.** Thromb Haemost 1997; 78: 1495-1499.

<sup>117</sup> Wagenknecht LE, Mayer EJ, Rewers M, Haffner SM, Selby J, et al. **The insulin Resistance Atherosclerosis study (IRAS): objective, design and recruitment results.** Ann Epidemiol 1995; 5: 464-471.

alteración de la glucemia basal, de tres etnias diferentes. Se determinaron parámetros antropométricos, niveles de PAI -1 plasmático y la sensibilidad a la insulina. Se cuantificó la distribución de las LDL según su tamaño. Los resultados obtenidos demostraban una asociación entre las LDL pequeñas y densas y los mayores niveles plasmáticos de PAI -1.

Se conoce desde hace tiempo que las LDL pequeñas y densas se relacionan con el resto de los componentes del síndrome de resistencia a la insulina, como son la hipertrigliceridemia, el descenso de HDL, el colesterol plasmático, la hipertensión arterial y la diabetes. Del mismo modo los niveles de PAI -1 se han asociado con este síndrome, y la resistencia a la insulina es uno de los factores que mayor poder tiene en la regulación del PAI -1.

Se ha descrito recientemente la asociación inversa existente entre el PAI -1 y el tamaño de la molécula LDL. Esta relación se explica considerando que el fenotipo B de estas podría estimular la producción de PAI -1<sup>118</sup>.

También se ha asociado la oxidación de las lipoproteínas a un estado de hipercoagulabilidad. Varios estudios han intentado explicar estos hechos, y se ha observado que la exposición de células endoteliales a LDL-ox aumenta la síntesis de PAI -1 y disminuye la síntesis y liberación del activador del plasminógeno (t-PA)<sup>119,120</sup> En estos trabajos se ha implicado a

---

<sup>118</sup> Festa A, De Angostino R, Mykannen L, Tracy R, Howard B, et al. **Low-density lipoprotein particle size is inversely related to plasminogen activator inhibitor -1.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19: 605-610.

<sup>119</sup> Latron Y, Chautan M, Anfosso F, et al. **Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins of plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells.** *Arterioscler Tromb* 1991; 11: 1821-1829.

<sup>120</sup> Kugiyama K, Sakamoto T, Misumi L, Sugiyama S, Ohgushi M, et al. **Transferable lipids in oxidized low-density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells.** *Circ Res* 1993;73: 335-343.

la lisofosfatidilcolina como responsable del aumento del PAI-1, y a los oxisteroles como inhibidores de la síntesis de t-PA.

Las LDL oxidadas (LDL-ox) presentan además características inmunogénicas. En todas las fases de la aterogénesis humana se han encontrado linfocitos T, tanto CD4 como CD8. Pues bien, las LDL-ox incrementan la producción por los monocitos de interleuquina 8 (IL-8), un potente quimioatrayente para linfocitos T. El nivel de producción de IL-8 es paralelo a la extensión de la oxidación de la LDL, y se ha relacionado con la lisofosfatidilcolina. Pero, además, la LDL-ox induce la activación de las células T, al incrementar la síntesis de ADN y la expresión de HLA-DR y el receptor de interleuquina 2 (IL-2). Además de todo lo anterior la LDL-ox contribuye a la situación de hipercoagulabilidad a través del aumento de la agregación plaquetaria. El óxido nítrico (NO) es un inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria, por lo que de forma indirecta, la LDL al disminuir la producción de éste, actúa de forma indirecta sobre la función plaquetaria. Además de favorecer la coagulación a través de la disminución de la producción del NO, la LDL-ox va a contribuir a la situación de hipercoagulabilidad incrementando la expresión del FT.

Las lipoproteínas remanentes son consideradas también como aterogénicas. Éstas son las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL), las cuales tras la lipólisis mediada por la lipasa hepática se transforman en lipoproteínas remanentes residuales. Están enriquecidas en colesterol en relación con los triglicéridos y, en consecuencia, son potencialmente más aterogénicas. En diversos estudios realizados "in vitro" se han relacionado las VLDL con la producción de

PAI -1, demostrando la capacidad de estas partículas para inducir la producción de PAI -1 por parte de las células endoteliales.

La lipoproteína Lp(a) es una lipoproteína similar a la LDL que contiene una proteína adicional conocida como apo (a). El gen de la apo (a) es altamente homólogo con el plasminógeno, y datos experimentales describen a la Lp (a) como un inhibidor de la activación del plasminógeno. Se ha descrito previamente la participación de la Lp(a) en la expresión de PAI -1<sup>121</sup>. Múltiples trabajos indican que la Lp (a) tiene una acción directa sobre la aterogénesis. La placa aterosclerótica de aorta humana, los injertos venosos de derivación coronaria resecados en una nueva operación y la placa aterosclerótica de arterias coronarias de monos contienen cantidades importantes de Lp (a). Muchos estudios transversales y algunos prospectivos relacionan el riesgo de ictus o infarto con el exceso de de Lp (a)<sup>122</sup>. Es posible que la Lp (a) sea proaterógena, cuando menos parcialmente, al interferir con el sistema fibrinolítico, pero se requieren más estudios para determinar el mecanismo por el que la Lp (a) predispone a la aterotrombosis.

---

<sup>121</sup> Etigin OR, Hajjar DP, Hajjar K, Harpel PC, Narchman RI. **Lipoprotein (a) regulates plasminógeno activator inhibitor -1 expression in endothelial cells. A potencial mechanism of thrombogenesis.** J Biol Chem 1991;266:2459-2465.

<sup>122</sup> Stein J, Rosenson R. **Lipoprotein LP (a) excess and coronary heart disease.** Arch Intern Med 1997; 157: 1170-1176.

**b. Otros inhibidores de la fibrinólisis.**

Aproximadamente, un 10% de las proteínas del plasma humano son inhibidores de las proteasas. Varios de estos inhibidores participan en el proceso de fibrinólisis a través de la inhibición de las serínproteasas. Entre éstos además del ya mencionado PAI -1, existen otros como es la  $\alpha_2$ -antiplasmina, un inhibidor específico de la plasmina. Esta proteína es sintetizada casi en su totalidad por los hepatocitos, aunque está también presente en los gránulos alfa de las plaquetas. La  $\alpha_2$ -antiplasmina circula en el plasma a una concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{mol/l}$ , que es casi la mitad de la concentración del plasminógeno en plasma. Esto explica por qué no es capaz de inactivar toda la plasmina que se pueda producir a partir del plasminógeno. Tiene una vida media de aproximadamente unos dos días y medio. El complejo plasmina / $\alpha_2$ -antiplasmina es retirado de la circulación por el hígado.

La concentración local de  $\alpha_2$ -antiplasmina en el trombo plaquetario predice la resistencia del mismo a la degradación por parte de la plasmina. La  $\alpha_2$ -antiplasmina compite con el fibrinógeno por la unión con el coágulo de fibrina, el cual una vez unido forma enlaces covalentes con los polímeros de fibrina gracias a la participación del factor XIII activado.

El PAI -2, también conocido como, inhibidor del plasminógeno derivado de la placenta, está presente en el epitelio del trofoblasto. El gen del PAI -2 se localiza en el cromosoma 18. El PAI -2 es sintetizado por los leucocitos y secretado por los monocitos, macrófagos y algunos tipos de células tumorales. Es un inhibidor de la familia de las serpinas y carece de forma latente. Su papel como inhibidor de la fibrinólisis aún está poco

aclarado. Se sabe que inhibe al plasminógeno con un poder diez veces menor que el PAI -1, sin embargo es un eficiente inhibidor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa. El PAI -2 se encuentra elevado durante el embarazo, por lo que se cree que su principal participación es en los procesos fibrinolíticos que tienen lugar durante la gestación, pero no durante la fibrinólisis normal. El PAI -2 también aumenta en los procesos inflamatorios y tras la exposición de los macrófagos a las endotoxinas.

### 3. FACTORES NUTRICIONALES Y ATEROTROMBOSIS

El endotelio vascular es considerado en la actualidad un sistema regulador de la función del aparato cardiovascular. Por ello su integridad es importante para que los vasos se dilaten, para que no se desarrollen fenómenos trombóticos y para evitar que las células circulantes pasen al interior de la pared. Cuando estos mecanismos se alteran, por lesión endotelial, aparecen la aterotrombosis y sus consecuencias. Entre los mecanismos que favorecen la lesión de la célula endotelial se encuentran la hipercolesterolemia, la hipertensión arterial y la diabetes.

La génesis de la arteriosclerosis es multifactorial, interviniendo tanto factores genéticos como ambientales; entre estos últimos, los hábitos nutricionales constituyen un factor esencial, determinante de la susceptibilidad a la arteriosclerosis y del desarrollo de la cardiopatía isquémica. La alimentación, y más aún el tipo de grasa de la dieta, tiene efectos tanto sobre las concentraciones de colesterol en sangre y en su composición lipoprotéica, como sobre la oxidación lipídica y composición de las membranas celulares. No obstante, los factores nutricionales influyen también sobre otros elementos de riesgo como son la presión arterial, la diabetes mellitus y la obesidad. Por otra parte, y debido a sus diferentes y variadas influencias, estos factores nutricionales van a estar relacionados con la evolución crónica de la enfermedad vascular, es decir con la aterogénesis propiamente dicha. No se puede dejar a un lado su papel en la fase aguda, final de la enfermedad, o lo que es lo mismo en la trombogénesis.

La influencia de la alimentación sobre el desarrollo de arteriosclerosis ya fue descrita en 1913 por Anitschow<sup>123</sup>. Años más tarde, Kinsell<sup>124</sup> observó como los aceites vegetales ejercían una acción depresora sobre las concentraciones de colesterol plasmático, cuando se introducen en la alimentación sustituyendo a las grasas animales. Posteriormente, Ahrens<sup>125</sup> identifica a las grasas poliinsaturadas como los componentes críticos de esta reducción.

Tomando como base éstas y otras observaciones, diferentes autores iniciaron una serie de investigaciones para determinar las acciones fisiológicas de los distintos nutrientes sobre el colesterol plasmático, y otras propiedades protectoras de la alimentación<sup>126</sup>. En esta sección nos centraremos en revisar las interacciones entre la nutrición, alteraciones lipídicas y de sus fracciones lipoprotéicas, y los mecanismos aterotrombóticos.

---

<sup>123</sup> Anitschow N. **Experimental arteriosclerosis in animal**. In Cowdry EV,ed. Arteriosclerosis. New York : Mac Millan, 1933: 271-322.

<sup>124</sup> Kinselle LW, Michaels GD, Partridge JW, Boling LA, Blach HE, Cochrane GG. **Effect upon serum cholesterol and phospholipids of diets containing large amounts of vegetable fat**. Am J Clin Nutr 1953; 1: 231-234.

<sup>125</sup> Ahrens EH, Hirsch J, Insull W, Tsaltas TT, Blomstrand R, Peterson ML. **The influence of dietary fats on serum lipids levels in man**. Lancet 1957; 1: 943-953.

<sup>126</sup> Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. **Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man**. Am J Clin Nutr 1965; 17: 281-295.

### a. Influencia de la alimentación sobre el metabolismo lipídico

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado la influencia que las distintas fracciones lipoprotéicas ejercen sobre el riesgo de enfermedad coronaria. De modo que concentraciones altas de c-LDL y/o bajas de c-HDL, entre otros factores, están asociadas con un incremento en el riesgo de sufrir enfermedad coronaria. Las evidencias epidemiológicas incluyen comparaciones entre distintas poblaciones y estudios prospectivos dentro de una misma población. En ambos tipos de estudios, se ha establecido una relación entre niveles de colesterol sérico y desarrollo de enfermedad coronaria de carácter positivo y continuo.

Entre los principales trabajos que han indicado la existencia de esta relación destacan el estudio Framingham y el Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). El estudio Framingham<sup>127</sup> se inició en 1948, y se basó en el seguimiento longitudinal de 2282 hombres y 2845 mujeres durante 14 años, mediante revisiones periódicas cada 2 años. Se efectuó un registro detallado de la mortalidad y morbilidad de origen cardiovascular, y se relacionó con una amplia variedad de datos sobre la población estudiada. Al comparar las cifras séricas de colesterol de los participantes que desarrollaron cardiopatía isquémica con las de aquellos que no la presentaron, se observó que en los que presentaba niveles más altos, la incidencia de enfermedad coronaria era superior, y seguía una relación directamente proporcional a la concentración sérica de colesterol. También se observó que no existía un nivel umbral para la

---

<sup>127</sup> Gordon T, Kagan A, Garcia-Palmieri M, et al. **Diets and its relation to coronary heart disease and health in three population.** *Circulation* 1981; 63: 515-520.

asociación entre éste y cardiopatía isquémica. En el seguimiento de la población de Framingham se ha demostrado también, la existencia de una correlación inversa entre c-HDL y muerte por enfermedad coronaria en ambos sexos. Además, incluso con cifras de colesterol total por debajo de 200 mg/dL, persistió la correlación inversa entre c-HDL e incidencia de enfermedad coronaria.

El MRFIT<sup>128</sup> fue un estudio aleatorizado de prevención primaria, que analizó los efectos de la modificación de varios factores de riesgo coronario en un grupo de 12.866 varones de alto riesgo, seleccionados de una cohorte de 360.000 hombres de edad media. Se midieron las concentraciones de colesterol sérico y el índice de mortalidad coronaria a lo largo de 6 años. Se encontró relación entre los mayores niveles de colesterol y el aumento de riesgo de enfermedad coronaria. Además, esta asociación comenzaba con cifras de colesterol tan bajas como 180 mg/dL.

Numerosas evidencias muestran que la enfermedad coronaria es más común en países cuyos habitantes consumen dietas con elevado contenido en ácidos grasos saturados y colesterol, y tienen, generalmente, concentraciones elevadas de colesterol sérico.

Los ácidos grasos de la alimentación son uno de los determinantes más importantes de las concentraciones de lípidos plasmáticos y, consecuentemente, de riesgo de enfermedad coronaria. Tras el conocimiento del efecto hipercolesterolemizante de la grasa saturada, la relación entre el consumo de este tipo de grasa y la enfermedad coronaria ha sido objeto de gran interés. Este hecho se puso de manifiesto en el

---

<sup>128</sup> Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. **Multiple Risk Factor Intervention Trial. Risk factor changes and mortality results.** JAMA 1982; 248: 1465-77.

estudio de los Siete Países<sup>129</sup>, cuando Keys et al. observaron que las diferencias entre el consumo de grasa saturada se correlacionaban con las concentraciones de colesterol plasmático y con el riesgo de cardiopatía isquémica en diferentes poblaciones. Este estudio demostró la existencia de una fuerte correlación ( $r = 0.84$ ) entre el consumo de grasa saturada de la dieta y los niveles de colesterol plasmático. Además, la mortalidad por enfermedad coronaria se correlacionaba de forma independiente y positiva con el porcentaje de energía de la alimentación obtenida a partir de grasa saturada y, negativamente, con el consumo de grasa monoinsaturada. No se encontró correlación con el consumo de grasa poliinsaturada, ni con las proteínas, ni con los hidratos de carbono, ni con el alcohol. Después de 15 años de seguimiento, la menor mortalidad total y por enfermedad coronaria se observó en los países mediterráneos y en Japón, poblaciones que tenían niveles de colesterol más bajo, y la más alta en Finlandia y en los Estados Unidos. En conjunto, se concluyó que el colesterol sérico era el principal determinante del riesgo de cardiopatía isquémica. De todos los demás factores de riesgo analizados, sólo se encontró una relación de similar intensidad para la hipertensión. Además el estudio sugería que, dentro de las comunidades, otros factores de riesgo principales, como la hipertensión y el consumo de tabaco, perdían importancia con concentraciones bajas de colesterol sérico. El estudio de los adventistas del séptimo día, en el que la población es vegetariana, demuestra que esta comunidad religiosa presenta una incidencia de enfermedad coronaria un 75% inferior respecto a la población no adventista. Estudios similares, llevados a cabo

---

<sup>129</sup> Keys A. **Coronary heart disease in Seven Countries.** Circulation 1970; 41 : 11-211.

recientemente sobre población vegetariana, han demostrado que la mortalidad por enfermedad coronaria fue un 24% inferior en los vegetarianos que en los no vegetarianos, siendo un 34% menor en los que consumían pescado frente a los que ingerían carne<sup>130</sup>.

El efecto de las dietas enriquecidas en ácidos grasos monoinsaturados sobre los lípidos plasmáticos ha sido más controvertido. Datos del estudio de los Siete Países sugieren que la tradicional dieta Mediterránea, con un alto contenido en grasa monoinsaturada, principalmente procedente del aceite de oliva, está asociada con una menor incidencia de cardiopatía isquémica, una menor tasa de mortalidad global e incluso por cáncer<sup>131</sup>. Igualmente, varios estudios en los últimos años han mostrado que tanto las dietas enriquecidas en ácidos grasos poliinsaturados como en monoinsaturados tienen similares efectos hipocolesterolémicos, cuando sustituyen a los ácidos grasos saturados. La alimentación rica en poliinsaturados se sabe que reduce las concentraciones plasmáticas de c-HDL, cuando se comparan con la rica en saturados. En los estudios en los que se utilizan dietas enriquecidas en monoinsaturados se observan incrementos en la concentración plasmática de c-HDL, cuando se compara con ricas en poliinsaturados o en hidratos de carbono<sup>132</sup>. Puesto que la nutrición rica en saturados favorece el desarrollo de arteriosclerosis, el debate se centra en cual es el mejor sustituto para dicho nutriente, hidrocarbonados o monoinsaturados. El resultado de dos estudios

---

<sup>130</sup> Key TJ, Fraser GE, Throgood M, Appleby PN, Beral V. et al. **Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of prospective studies.** Am J Clin Nutr 1999;70: 516-524..

<sup>131</sup> Katan M, Grundy SM, Willet WC. **Beyond Low-Fat diets.** N Eng J Med 1997;337:563-566.

<sup>132</sup> Mata P, Garrido JA, Ordovas JM, Blazquez E, Alvarez-Sala L, Rubio MJ, et al. **Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women.** Am J Clin Nutr 1992;56:77-83.

similares conducidos por Grundy<sup>133</sup>, Mensik y Katan<sup>134</sup>, mostraron un descenso similar en el CT tanto con la alimentación rica en monoinsaturados como con la pobre en grasa y rica en hidratos de carbono. Aunque ambas dietas descendieron los niveles plasmáticos de CT y c-LDL, la Mediterránea no redujo los niveles plasmáticos de C-HDL ni aumentó los triglicéridos, como lo hizo la rica en hidratos de carbono. Desde estos estudios pioneros, un gran número de trabajos han mostrado resultados similares, de manera que existen suficientes evidencias que confirman que la alimentación rica en monoinsaturados tienen su efecto beneficioso sobre el riesgo de cardiopatía isquémica. Además existen evidencias, de estudios clínicos controlados, que han mostrado que este tipo de nutrición afecta favorablemente a los lípidos del plasma y lipoproteínas, comparada con una rica en ácidos grasos saturados o en hidratos de carbono<sup>135</sup>. Pero también se han de valorar otros posibles efectos protectores de la alimentación tipo mediterránea. Ésta puede conferir beneficios sobre los factores de riesgo de enfermedad coronaria, más allá de los asociados con lípidos del plasma y lipoproteínas, como puedan ser la tensión arterial, la diabetes tipo 2, la trombosis y la resistencia a la oxidación de las LDL y la función endotelial.

---

<sup>133</sup> Grundy SM, Florentin L, Nix D, Whelan MF. **Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raised levels of plasma cholesterol in man.** Am J Clin Nutr 1988; 47: 965-969.

<sup>134</sup> Mensik RP, Katan MB. **Effect of monounsaturated fatty acids versus complex carbohydrates on high-density lipoproteins in healthy men and women.** Lancet 1987; 1: 122-125.

<sup>135</sup> Kris-Etherton PM. **Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease.** Circulation 1999; 100: 1253-1258

## b. Oxidación lipídica y factores nutricionales.

Las características de la lesión aterosclerótica que da lugar a la obstrucción arterial, según la teoría oxidativa, son el depósito de lípidos y su posterior oxidación en la pared vascular, con lesión del endotelio, reclutamiento de monocitos y acumulación de células musculares lisas. El papel de las LDL en la génesis y progresión del proceso aterosclerótico radica en su alta citotoxicidad. El proceso oxidativo probablemente se inicia en los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, propagándose luego al resto de la molécula y afectando finalmente a las apolipoproteínas. Por tanto, la influencia de los ácidos grasos de la alimentación y los antioxidantes sobre la resistencia a la oxidación de las LDL es de gran interés en la génesis de la arteriosclerosis. La oxidación de las LDL depende de su composición en ácidos grasos y de su riqueza en antioxidantes.

Varios estudios realizados en conejos y en humanos observaron que las dietas ricas en ácido oleico, en comparación con las ricas en ácido linoleico, hacen a las LDL menos susceptibles a las modificaciones oxidativas<sup>136</sup>. Bonamone et al<sup>137</sup> demostraron el mayor efecto protector de la grasa monoinsaturada frente a la oxidación de las LDL, al compararla con la grasa poliinsaturada. Estos hechos, junto a la disminución del colesterol, hacen a esta nutrición con alto contenido de oleico más aconsejable.

---

<sup>136</sup> Mata P, Alonso R, López-Farré A, et al. **Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1347-1355.

<sup>137</sup> Bonamone A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, et al. **Effect of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification.** *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 529-533.

Por otra parte, Scaccini<sup>138</sup> y colaboradores sugieren que no sólo los ácidos grasos monoinsaturados son el factor determinante de la capacidad antioxidativa de las lipoproteínas, sino que pueden existir otros componentes que contribuyan a ello. La elevada resistencia a la oxidación, observada tras el consumo de aceite de oliva, puede ser explicada por la presencia de antioxidantes, como el  $\alpha$ -tocoferol, los  $\beta$ -carotenos, y los polifenoles presentes en dicho aceite. Sin embargo, en otros estudios realizados también en humanos, no parece que el suplementar con  $\beta$ -caroteno modifique la resistencia a la oxidación de las LDL<sup>139</sup>. Un balance óptimo entre el contenido en ácidos grasos monoinsaturados y antioxidantes naturales en los aceites alimenticios sería, por este motivo, importante en el tratamiento y prevención de la enfermedad arteriosclerótica.

Ya existe información de que la alimentación rica en monoinsaturados aumenta la resistencia a la oxidación "in vitro" de las LDL, en comparación con las partículas obtenidas con dietas ricas en ácidos grasos saturados o poliinsaturados, e incluso con una alimentación rica en hidratos de carbono, aunque no haya siempre uniformidad en los resultados<sup>140</sup>. En un trabajo previo que realizamos en 22 personas sanas normolipémicas, comparamos el efecto de tres dietas<sup>141</sup>, una de ellas preparada con aceite de oliva, otra

---

<sup>138</sup> Scaccini C, Nardini M, Dágono M, Gentili V, Di Felice M, Tomassi G. **Effect of dietary oils on lipid peroxidation and on antioxidant parameters plasma and lipoprotein fractions.** J Lipid Res 1992; 33: 627-633.

<sup>139</sup> Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. **Effect of dietary antioxidant combination in humanes: protection of LDL by vitamin E but not beta-carotene.** Arterioscler Thromb 1993;13:590-600.

<sup>140</sup> Perez-Jimenez F, Castro P, López-Miranda J, Paz Rojas E, Blanco A, López-Segura F. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** Atherosclerosis 1999;145: 351-358.

<sup>141</sup> Castro P, López-Miranda J, Gómez P, Escalante MD, López Segura F, Martín A, et al. **Comparison of an oleic acid enriched-diet vs NCEP-1 on LDL susceptibility to oxidative modifications.** Eur J Clin Nutr 2000; 54: 61-67.

con aceite de girasol con alto contenido en oleico y otra rica en hidratos de carbono, sobre la resistencia a la oxidación de las LDL. La dieta rica en aceite de oliva así como la preparada con aceite de girasol enriquecido en oleico mostraron descenso, la primera y no cambios la segunda en la susceptibilidad a la oxidación al compararlos con la pobre en grasas. Este efecto se le atribuyó al contenido en  $\alpha$ -tocoferol.

En definitiva, los antioxidantes naturales como los  $\beta$  carotenos, la vitamina E y la vitamina C, presentes en muchos alimentos, tienen un alto poder frente a la oxidación. Se ha demostrado en modelos animales y en estudios "in vivo" que tienen un efecto protector frente a la oxidación de las LDL y frente a los efectos derivados de este proceso. Sin embargo, no existen evidencias que apoyen el uso de suplementos vitamínicos para la prevención de la enfermedad cardiovascular. Actualmente se aconseja el consumo de alimentos naturales con alto contenido en vitaminas y antioxidantes, como las frutas y las verduras frescas.

### c. Influencia de la alimentación sobre la tensión arterial.

Está bien establecido que la hipertensión arterial es un importante factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares. Diferentes mecanismos han sido postulados para explicar el descenso de la tensión arterial inducido por la alimentación, como puede ser el tipo y calidad de la fibra dietética, la ingesta de sal, el consumo de alimentos ricos en calcio, potasio y magnesio o cambios en el contenido de grasa.

Varios estudios clínicos y experimentales en humanos han demostrado que dietas enriquecidas en ácido linoleico y bajas en grasa saturada son capaces de normalizar o disminuir la tensión arterial, tanto diastólica como sistólica, en hipertensos moderados o en normotensos<sup>142</sup>. El ácido linoleico puede ser convertido en prostaglandinas, y por lo tanto modificar la síntesis vascular de PGI<sub>2</sub> y las concentraciones de tromboxano circulante, las cuales tienen influencia sobre la tensión arterial.

Por otra parte, la baja prevalencia de HTA en la población del área Mediterránea, con un consumo rico en monoinsaturados, ha planteado la hipótesis del posible efecto hipotensor del ácido oleico. En un estudio realizado por Aravanis<sup>143</sup> en 1.225 hombres de edad intermedia en las áreas rurales de Creta y Corfú, se ha observado una tensión arterial generalmente baja, una concentración de triglicéridos y colesterol total disminuidas, y un discreto aumento de c-HDL, todo ello acompañado de una incidencia de cardiopatía isquémica baja. Estos hallazgos se han

---

<sup>142</sup> Iacono JM, Dougherty RM, Puska P. **Reduction of blood pressure associated with dietary polyunsaturated fat.** J Hypertension 1982; 4: 34-42.

<sup>143</sup> Aravanis Ch. **The greek Islands Heart study.** 3rd international congress on the biological value of olive oil. Canea, Crete (Greece). 1980; p77.

relacionado con las costumbres alimenticias en esta zona cuya fuente principal de grasa la constituye el aceite de oliva. Estos mismos resultados han sido corroborados posteriormente por otros investigadores, tanto en individuos sanos como en mujeres hipertensas. Estudios realizados en mujeres posmenopáusicas<sup>144</sup> han mostrado, en esta misma línea un efecto protector de la alimentación rica en monoinsaturados, sobre la tensión arterial. Este efecto fue más marcado sobre las mujeres normocolesterolémicas que en aquellas con cifras elevadas de colesterol.

En otro estudio<sup>145</sup> se ha comparado el efecto de una nutrición rica en hidratos de carbono frente a otra rica en monoinsaturados en 10 varones y 5 mujeres con diabetes mellitus no insulino dependiente. Los resultados mostraban un descenso de la tensión arterial diastólica y sistólica tras la alimentación rica en monoinsaturados y un efecto beneficioso sobre el metabolismo hidrocarbonado. No existieron modificaciones en cuanto al perfil lipídico.

Nuestro grupo ha analizado el efecto sobre la tensión arterial de una alimentación rica en hidratos de carbono y otras dos en monoinsaturados, una rica en aceite de oliva virgen y otra con aceite de girasol enriquecido con oleico. Las cifras de tensión arterial sistólica y diastólica descendieron significativamente con las dietas ricas en grasa monoinsaturada en relación con la rica en hidratos de carbono<sup>146</sup>. Estos resultados se correlacionaron

---

<sup>144</sup> Ruiz-Gutierrez, V, Muriana F, Guerrero A, Cert A, Villar J. **Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources.** J Hypertensión 1996;14:1483-1490.

<sup>145</sup> Rasmussen OW, Thomsen C, Hansen K, Vesterlund M, Winther E, Hermasen K. **Effects on blood pressure, glucose, and lipid levels of a high monounsaturated fat diet compared with a high carbohydrate diet in a NIDDM subjects.** Diabetes Care 1993; 16: 1565-1571.

<sup>146</sup> Espino A, López -Miranda J, Castro P, López-Segura F, Paniagua JA, Blanco-Molina A, et al. **Interacción de la grasa monoinsaturada y colesterol de la dieta sobre la presión arterial y la insulina plasmática en sujetos sanos.** J Hypertensión. Ed esp 1994: S60-S64

con otros estudios de intervención dietética realizados posteriormente con varones jóvenes sanos<sup>147</sup>. En ambos se demostró el efecto de la alimentación rica en grasa monoinsaturada tanto sobre el metabolismo hidrocarbonado y como sobre la presión arterial.

---

<sup>147</sup> Salas J, López-Miranda J, Jansen S, Zambrana JL, Castro P et al. **La dieta rica en grasa monoinsaturada modifica de forma beneficiosa el metabolismo de los hidratos de carbono y la presión arterial.** Med Clin 1999; 113: 765-769.

#### **d. Influencia de la alimentación sobre la resistencia a la insulina.**

En la patogénesis de la aterotrombosis aparecen claramente implicadas tanto las alteraciones del metabolismo lipídico, como la resistencia a la insulina. El síndrome de resistencia a la insulina puede definirse como una disminución del efecto de la hormona para estimular normalmente la captación de glucosa, ante una concentración de insulina dada. Este defecto condiciona una elevación compensadora de su secreción, de manera que estas personas presentan una elevación de los niveles de esta hormona<sup>148</sup>. Esto podría suponer un aumento del riesgo de cardiopatía isquémica, motivado por los propios efectos que la insulina tiene sobre la pared arterial. Por un lado causa la proliferación y migración de las células musculares lisas<sup>149</sup>. También estimula la síntesis de lípidos en la pared arterial, y aumenta la actividad de los receptores de la LDL en la célula muscular lisa y en los monocitos/macrófagos<sup>150</sup>. Además incrementa el acumulo de los lípidos en la placa de ateroma y disminuye la regresión. Y por último estimula la síntesis de tejido conectivo y los factores de crecimiento. Con todo lo anterior, es lógico pensar que la hiperinsulinemia podría aumentar el riesgo de cardiopatía isquémica actuando en dos vertientes, de manera indirecta a través de sus efectos sobre los factores de riesgo cardiovasculares y por su implicación directa sobre la pared arterial.

---

<sup>148</sup> Laakso M. **Insulin resistance and coronary heart disease.** Current Opin Lipidol 1996; 7: 217-226.

<sup>149</sup> Stout RW. **Insulin and atheroma 20-Yr perspective.** Diabetes Care 1990; 13: 631-654.

<sup>150</sup> De Fronzo RA. **Insulin Resistance. A multifaceted syndrome responsible for DMNID, obesity, hypertension, dyslipemia and atherosclerotic cardiovascular disease.** Diabetes Care 1991; 14: 173-194.

Como venimos exponiendo, las personas que exhiben una disminución de la sensibilidad periférica a la insulina, presentan un riesgo coronario mayor, por la sumación de diversos mecanismos, entre los cuales la mayor predisposición a la formación de trombos jugaría un papel preponderante.

Se conoce que el síndrome de resistencia a la insulina es la causa más importante de aumento de producción de PAI-1 en la población general. También se ha demostrado que la reducción en los niveles de insulina, con medicación o con dieta, tiene como consecuencia una disminución en la actividad del PAI-1. Por tanto, se puede afirmar que la mejoría de la sensibilidad a la insulina, mejora la actividad fibrinolítica, lo cual podría tener efectos beneficiosos en la prevención de la trombosis arterial y quizás en el desarrollo de arteriosclerosis<sup>151</sup>.

Son muchos los trabajos que intentan estudiar la influencia de los distintos componentes de la alimentación sobre el metabolismo hidrocarbonado y la resistencia a la insulina. Especial atención se ha prestado a la composición en ácidos grasos de la dieta. La resistencia a la insulina se ve influenciada por los cambios en los hábitos de conducta alimentaría y estilos de vida. Aunque existe un acuerdo en la reducción de la ingesta total de energía diaria, hay una controversia en cuanto a la distribución calórica en forma de hidratos de carbono y grasa. La dieta recomendada clásicamente por la American Diabetes Association en 1986<sup>152</sup> rica en hidratos de carbono y pobre en grasas. Este tipo de nutrición tenía el objetivo de reducir al máximo el consumo de grasas

---

<sup>151</sup> Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardissonne JP, Geim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients-relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost* 1989; 61: 370-373.

<sup>152</sup> American Diabetes Association. **Nutritional recommendations and principles for individuals with diabetes mellitus, 1986.** *Diabetes Care* 1987; 10: 126-132.

saturadas, buscando el descenso del colesterol total y el c-LDL, aminorando por tanto el riesgo coronario. Otras razones para recomendar esta dieta han sido que mejora el control glucémico, reduce los requerimientos de insulina y refuerzan la sensibilidad a esta hormona.

Por otra parte, se ha discutido recientemente<sup>153</sup> el efecto beneficioso de esta nutrición sobre la disminución de peso<sup>154</sup>, y por tanto del perfil glucémico. Además, las dietas ricas en hidratos de carbono incrementan las cifras de triglicéridos y VLDL, descendiendo las de c-HDL<sup>155</sup>. Otro problema que plantean estas dietas es el abandono de la misma por problemas de palatabilidad. Por otra parte, Chen en 1993, demostró que el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono y pobres en grasas durante 14 días acentúan la lipemia postprandial en diabéticos<sup>156</sup>. Dos años más tarde, este mismo autor publicó los resultados de un estudio de intervención dietética en pacientes diabéticos tipo 2. En este trabajo describía que, tras el consumo de una alimentación rica en hidratos de carbono la concentración postprandial de lipoproteínas de origen intestinal, las concentraciones de glucosa, de insulina, y de triglicéridos plasmáticos fueron mayores a lo largo de todo el día. Con todo esto estableció que tras el consumo de una nutrición rica en hidratos de carbono en estos pacientes, se acentúan múltiples factores de riesgo cardiovascular<sup>157</sup>.

---

<sup>153</sup> Katan M, Grundy S, Willet W. **Should a low-fat high-carbohydrate diet be recommended for everyone beyond the low fat diet.** *New Eng J Med* 1999;337: 562-567.

<sup>154</sup> Purnell JQ, Brunzell JD. **The Central role of dietary fat, not carbohydrate, in the insulin resistance syndrome.** *Current Opin Lipidol* 1997; 8: 17-22.

<sup>155</sup> National Institutes of Health. **Consensus development conference on diet and exercise in non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 1987; 10: 630-644.

<sup>156</sup> Chen Y-DI, Swami S, Showronski R, Coulston AM, Reaven GM. **Effect of variations in dietary fat and carbohydrate intake on postprandial lipemia in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 347-351.

<sup>157</sup> Chen Y-DI, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM. **Why do low fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM?** *Diabetes Care* 1995; 18: 10-16.

Otros estudios, realizados en pacientes con una diabetes tipo 2, han demostrado que las dietas ricas en hidratos de carbono aumentan los niveles de glucemia a lo largo de todo el día, acompañados por unas mayores cifras de insulina plasmáticos<sup>158,159</sup>.

Por todo ello en los últimos años se propugna la sustitución parcial de los hidratos de carbono por otro tipo de nutrientes no perjudiciales, como son los ácidos grasos monoinsaturados, para las personas con resistencia a la insulina y diabetes mellitus.

El Nurses Health Study<sup>160</sup> demostró que tanto la cantidad como el tipo de grasas que se ingieren con la alimentación pueden influir en el riesgo de diabetes mellitus y en la resistencia a la insulina, de manera que cuando gran parte de la energía procede de las grasas de origen vegetal, el riesgo de diabetes mellitus es menor. Además se conoce que el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, en las personas predispuestas, es la obesidad, especialmente la obesidad troncular. Por ello, la prevención de la obesidad es, probablemente, la medida más importante para reducir la incidencia de diabetes mellitus tipo 2<sup>161</sup>. El principal factor nutricional de riesgo, para la presentación de la obesidad, es el exceso de grasas de la dieta. Por otra parte, la distribución de la grasa corporal puede verse influenciada por el tipo de grasa que se ingiera.

---

<sup>158</sup> Rasmussen OW, Thomsen C, Hansen KW, Vesterlund M, Winther E, Hermansen K. **Effects of blood pressure, glucose and lipid levels of a high-monounsaturated fat diet compared with a high-carbohydrate diet in NIDDM subjects.** Diabetes Care 1993; 16: 1565-1571.

<sup>159</sup> Campbell LV, Marmot PE, Dyer JA, Borkman M, Storlien LH. **The high-monounsaturated fat diet as a practical alternative for NIDDM.** Diabetes Care 1994; 17: 177-188.

<sup>160</sup> Colditz GA, Manson JE, Stampfer MJ, Rosner B, Willet WC, Speizer FE. **Diet and risk of clinical diabetes in women.** Am J Clin Nutr 1992; 55: 1018-1023.

<sup>161</sup> Campbell LV, Marmot PE, Dyer JA, Borkman M, Storlien LH. **The high-monounsaturated fat diet as a practical alternative for NIDDM.** Diabetes Care 1994; 17: 177-188.

Se ha demostrado, en personas sin historia de diabetes, que la alimentación rica en grasa total conduce a una menor sensibilidad periférica a la insulina entre los sujetos obesos, pero no entre los no obesos<sup>162</sup>. Este efecto podría venir mediado por la relación nutrición-obesidad. Sin embargo, otros trabajos que han analizado la influencia de las grasas saturadas sobre la sensibilidad a la insulina en varones con enfermedad coronaria, han encontrado una relación entre el consumo de grasa saturada y la concentración de insulina en ayunas y esta relación ha sido independiente del IMC<sup>163</sup>. Sería pues, la grasa saturada por sí misma, y no por su efecto sobre la ganancia de peso, la que provocaría los mayores niveles de insulina.

Este tipo de dietas inducen una menor sensibilidad periférica a la insulina y un perfil lipídico desfavorable. Parece razonable reemplazar las grasas saturadas por otro tipo de grasas en las recomendaciones a diabéticos. Mención especial merece el ácido esteárico, que pese a ser un ácido graso saturado, se ha demostrado que no deteriora la tolerancia a la glucosa o la acción de la insulina, cuando se compara con el ácido oleico<sup>164</sup>.

Estudios realizados en ratas<sup>165</sup> han demostrado que tras el consumo de una dieta rica en poliinsaturados, la insulinemia es significativamente menor que tras el consumo de una rica en saturados o en monoinsaturados. Estos últimos refuerzan la utilización periférica de la glucosa de manera

---

<sup>162</sup> Ohlsson Lo, Larsson B, Svardsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, et al. **The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus: 13.5 year follow-up of the participants in the study of men born 1913.** *Diabetes* 1985; 34: 1055-1058.

<sup>163</sup> Hansen BC, Bodkin NL. **Primary prevention of diabetes mellitus by prevention of obesity in monkeys.** *Diabetes* 1993; 17: 223-236.

<sup>164</sup> Louheranta AM, Turpein AK, Schaw US, Vidgren HM, Parviainen MT, Uusitupa MI. **A high -Stearic acid diet does no impair glucose tolerance and insulin sensibility in healthy women.** *Metabolism* 1998, 74:529-534.

<sup>165</sup> Vessby B. **Nutrition, lipids and diabetes mellitus.** *Current Opin Lipidol* 1995; 6: 3-7.

significativa comparándola con los otros dos tipos de alimentación. Estos resultados están apoyados por los obtenidos en humanos. Se ha demostrado, en personas diabéticas con hipertrigliceridemia, que cantidades moderadas de aceite de pescado (n-3) inducen una reducción significativa de los niveles de triglicéridos plasmáticos y de ácidos grasos no esterificados, y que el consumo de este tipo de nutrición conlleva, además, un enriquecimiento significativo de omega-3 en los fosfolípidos de las membranas de los eritrocitos. Estos efectos no se siguieron, sin embargo, de una mejoría de la sensibilidad a la insulina en este grupo de pacientes<sup>166</sup>.

Los ácidos grasos monoinsaturados están contenidos en todas las grasas animales y vegetales. El más importante de la alimentación es el oleico, que se encuentra principalmente en el aceite de oliva. Diversos trabajos de investigación han intentado estudiar el efecto de la dieta rica en monoinsaturados sobre el efecto periférico de la insulina en sujetos diabéticos tipo 2. La mayoría de ellos coinciden que el efecto de la alimentación tipo Mediterránea sobre el metabolismo de la glucosa es igual e incluso más favorable al ejercido por la rica en hidratos de carbono, e intentan estudiar la influencia de ambos tipos de dieta sobre otros factores de riesgo tales como la tensión arterial, lípidos plasmáticos y obesidad.

Garg en 1988, realizó un estudio comparativo de las alimentaciones ricas en hidratos de carbono y en monoinsaturados en personas con diabetes mellitus tipo 2. Tras el consumo de la alimentación Mediterránea,

---

<sup>166</sup> Mayer-Davis EJ, Monaco JH, Hoen HM, Carmichael S, Vitolins MZ, Rewers MJ, et al. **Dietary fat and insulin sensitivity in a triethnic population: the role of obesity. The insulin resistance atherosclerotic study (IRAS).** Am J Clin Nutr 1997; 65: 79-87.

se obtuvieron unos menores niveles de glucosa, unos menores requerimientos de insulina, cifras de triglicéridos plasmáticos más bajos y un aumento de las concentraciones de c-HDL y de Apo A-I<sup>167</sup>. Años más tarde, Garg observó que las dietas ricas en hidratos de carbono, inducían un aumento de las cifras de triglicéridos plasmáticos, cuando se comparaban con las ricas en MONO. También estudió la influencia sobre los lípidos plasmáticos de ambos tipos de alimentación, y comprobó que el c-HDL se redujo en un 11% con la rica en hidratos de carbono. Los niveles de c-VLDL se mantuvieron similares con ambas dietas. Sin embargo, no encontró diferencias en los niveles de glucemia y en la respuesta a la insulina, que fueron determinados tras cada periodo de intervención dietética mediante el clamp de glucosa euglucémico hiperinsulinémico.

Éste mismo investigador realiza otro trabajo, en diez varones<sup>168</sup> con una diabetes tipo 2, a los que sometió a dos periodos de dieta de 28 días de duración cada uno, comparando una nutrición rica en monoinsaturados y otra rica en hidratos de carbono. Esta última acentuó la hiperglucemia y aumentó el glucagón plasmático con respecto a la rica en grasa monoinsaturada.

Los trabajos de Rasmussen et al<sup>169</sup> y de Campbell et al<sup>170</sup> también demuestran que las dietas ricas en monoinsaturados tienen efectos más beneficiosos que las ricas en hidratos de carbono en los pacientes con

---

<sup>167</sup> Garg A, Bonamone A, Grundy SM, Zhang AJ, Unger RH. **Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** N Engl J Med 1988; 319: 829-834.

<sup>168</sup> Garg A, Grundy SM, Unger RH. **Comparison of effects of high and low carbohydrate diets on plasma lipoproteins and insulin sensitivity in patients with mild NIDDM.** Diabetes 1992; 41: 1278-1285.

<sup>169</sup> Rasmussen OW, Thomsen C, Hansen KW, Vesterlund M, Winther E, Hermansen K. **Effects of blood pressure, glucose and lipid levels of a high-monounsaturated fat diet compared with a high-carbohydrate diet in NIDDM subjects.** Diabetes Care 1993; 16: 1565-1571.

<sup>170</sup> Campbell LV, Marmot PE, Dyer JA, Borkman M, Storlien LH. **The high-monounsaturated fat diet as a practical alternative for NIDDM.** Diabetes Care 1994; 17: 177-188.

diabetes mellitus tipo 2. Rasmussen en 1993 comparó la influencia sobre la tensión arterial, la glucemia y los niveles de lípidos plasmáticos de una alimentación Mediterránea y otra rica en hidratos de carbono, ambas isocalóricas, en personas con diabetes mellitus tipo 2. La primera tuvo efectos beneficiosos sobre la tensión arterial y el metabolismo de la glucosa, induciendo un mejor control glucémico, mientras que no se detectaron diferencias significativas con las dos dietas, sobre la composición lipídica. Campbell también encontró que este tipo de alimentación mediterránea mejoraba el control glucémico y que también se producía una mejoría en el perfil lipídico, en cuanto a que inducían una disminución de las concentraciones de triglicéridos.

Lerman-Garber<sup>171</sup> en 1994 estudió el efecto de dos alimentaciones, una rica en oleico obtenido del aceite de oliva, y otra rica en hidratos de carbono complejos, sobre los lípidos séricos y la glucemia en ayunas y postprandiales, en 12 mujeres con diabetes mellitus tipo 2. El estudio fue cruzado y randomizado. Durante 4 semanas las participantes recibieron una nutrición isocalórica recomendada por la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Tras este periodo, fueron asignadas a dos dietas alternativas, una rica en grasa monoinsaturada y otra rica en hidratos de carbono. Ambas tuvieron un efecto hipocolesterolemiante, con pocos cambios sobre el c-HDL. La alimentación rica en MONO se asoció con un mayor descenso de los niveles de triglicéridos. El control glucémico fue similar con ambas dietas. Otros autores también han demostrado que la nutrición con alto contenido en oleico no aumenta los niveles de

---

<sup>171</sup> Lerman-Garber I, Ichazo-Cerro S, Zamora-Gonzalez J, Cardoso-Saldana G, Posadas-Romero C. **Effect of a high-monounsaturated fat diet enriched with avocado in NIDDM patients.** Diabetes Care 1994; 17: 311-315.

triglicéridos, ni en personas normales ni en hipertrigliceridémicos, cuando se compara con la rica en grasas saturadas<sup>172,173</sup>. Cuando se compara con la rica en hidratos de carbono, el ácido oleico disminuye las concentraciones de triglicéridos<sup>174</sup>.

Nuestro grupo ha llevado a cabo un estudio en voluntarios sanos hombres y mujeres jóvenes, a los cuales se les sometió al Test de resistencia a la insulina, modificado por Reaven. Realizamos tres periodos dietéticos de 4 semanas de duración, en los cuales se les administró una alimentación rica en ácidos grasos saturados, tipo occidental, una con alto contenido en hidratos de carbono y otra rica en aceite de oliva. Se pudo demostrar que la sustitución isocalórica de la grasa saturada de la dieta por los otros dos modelos hipolipemiantes, conlleva una disminución de la resistencia periférica de la insulina. Con los resultados anteriores parece oportuno resaltar el efecto beneficioso de esta alimentación Mediterránea, al mejorar tanto el perfil lipídico como la resistencia a la insulina. Otros estudios previos de nuestro grupo corroboran estos resultados<sup>175</sup>.

---

<sup>172</sup> Mattson FH, Grundy SM. **Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man.** J Lipid Res 1985; 26: 194-202.

<sup>173</sup> Grundy SM. **Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol.** N Engl J Med 1986; 314: 745-748.

<sup>174</sup> Espino A, López- Miranda J, Castro P, López-segura F, Paniagua JA, Blanco-Molina A, et al. **Interacción de la grasa monoinsaturada y colesterol de la dieta sobre la presión arterial y la insulina plasmática en sujetos sanos.** J Hipertensión. Ed esp 1994; Supl 1:S60-S64.

<sup>175</sup> Salas J, López-Miranda J, Jansen S Zambrana JL, Castro P, Paniagua JA. **The diet rich in monounsaturated fat modifies in a beneficial way carbohydrate metabolism and arterial pressure.** Med Clin 1999; 113: 765-769.

## e. Alimentación y Trombosis.

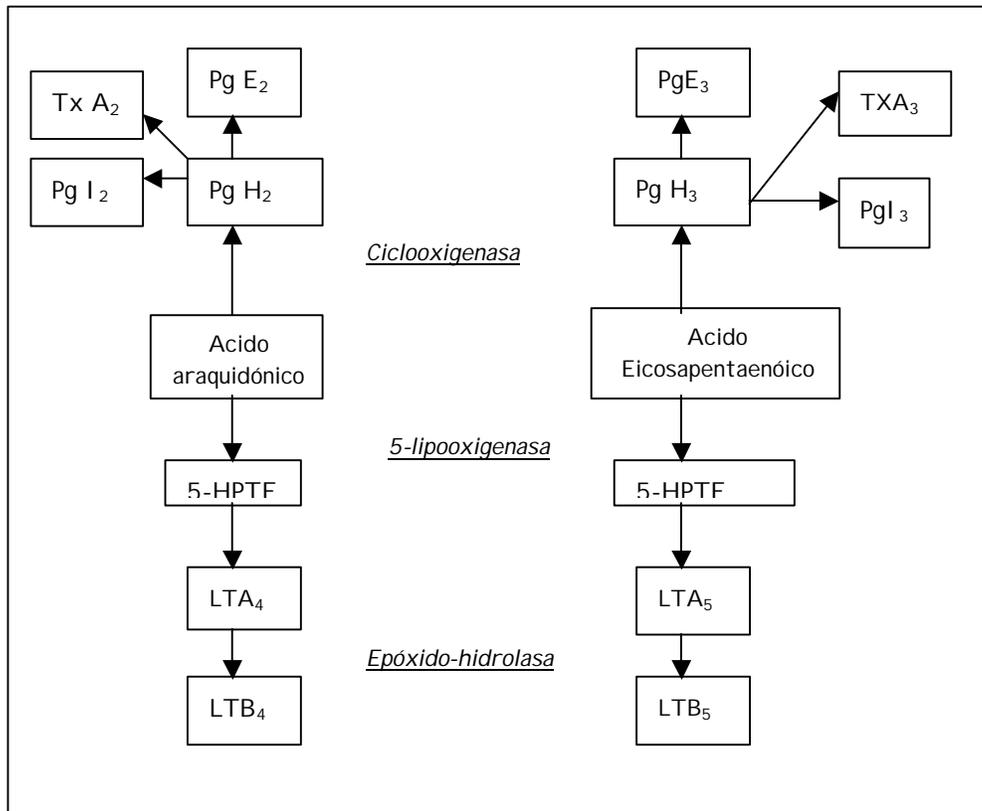
### e.1. Influencia de la alimentación sobre la agregación plaquetaria.

Ya hemos visto la importancia de las plaquetas en la formación y crecimiento de la placa de ateroma. Al igual que la nutrición influye sobre las concentraciones de lípidos plasmáticos, la tensión arterial y la resistencia a la insulina, también van a modificar la función plaquetaria. Son varios los componentes de la dieta que intervienen en este sentido.

A partir de los ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico, se forma por elongación y desaturación, el ácido araquidónico y los ácidos eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA). Éstos son los precursores de los eicosanoides, compuestos oxigenados de 20 átomos de carbono de los fosfolípidos de las membranas celulares. Los eicosanoides modulan muchas de las funciones de las células endoteliales, de las plaquetas y de los monocitos/macrófagos, los cuales están implicados en la patogenia de la aterosclerosis y la trombosis. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados n-3 se incluyen en la alimentación, los ácidos grasos EPA y DHA compiten con el ácido araquidónico en varias vías, inhiben su síntesis desde el ácido linoleico, reducen sus concentraciones celulares y plasmáticas y el EPA compite con el araquidónico, favoreciéndose la síntesis plaquetaria de tromboxano A<sub>3</sub> (vasodilatador y no agregante) frente al tromboxano A<sub>2</sub>.<sup>176</sup>

---

<sup>176</sup> Mata P, Oya M. **Dieta y enfermedad cardiovascular**. Rev Clin Esp 1993;192: 57-64.



**Figura 5:** Síntesis de eicosanoides a partir de los ácidos araquidónico y eicosapentaenóico. Tomada de Lee et al<sup>177</sup>.

Por tanto una alimentación enriquecida en ácido eicosapentaenóico desviará el equilibrio entre la actividad del tromboxano y prostaciclina, dando lugar a inhibición plaquetaria, prolongación de tiempo de hemorragia y reducción de la tendencia trombótica. Se ha sugerido que, una alimentación con un contenido relativamente elevado en ácidos grasos saturados de cadena larga, incrementa la agregación plaquetaria y favorecen la formación de trombosis<sup>178</sup>.

<sup>177</sup> Lee TH, Hoover RL, Williams JD, et al. **Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function.** N Engl J Med 1985;312:1217-1224.

<sup>178</sup> Mutanen M, Freese R, Vlasta LM, Ahola I, Ahlström A. **Rapeseed oil and sunflower oil diets enhance platelet in vitro aggregation and tromboxane production in healthy men compared with milk fat or habiual diets.** Thromb Haemostas 1992; 67: 352-356.

Existen pocos estudios que analicen el efecto de la grasa monoinsaturada sobre la trombogénesis. Este tipo de dietas, al compararlas con las ricas en hidratos de carbono, demostraron una disminución de la agregación plaquetaria en personas diabéticas. Cuando se compararon los ácidos grasos derivados del aceite de oliva con los poliinsaturados, los primeros redujeron la agregación plaquetaria en individuos sanos<sup>179</sup>. Mutanen et al<sup>178,180</sup> demostraron que la grasa monoinsaturada y la poliinsaturada de la alimentación favorecían la agregación plaquetaria inducida por el ADP. En estudios realizados "in vitro" por La Hoz et al, no encontraron diferencias entre estas dos dietas en cuanto a la agregación plaquetaria se refiere<sup>181</sup>.

El factor von Willebrand (FvW), sintetizado y almacenado en las células endoteliales, juega un papel preponderante en la agregación y adhesión plaquetaria como se ha descrito previamente. Por tanto aquellos factores nutricionales que lo modifican influirán indirectamente en la función plaquetaria. Existen algunos estudios que evidencian que la alimentación juega un papel modulador del FvW plasmático. Las dietas que descienden los niveles de lípidos plasmáticos están asociados con niveles más bajos de dicho factor, y esto se atribuye a una ingesta incrementada de ácidos grasos poliinsaturados<sup>182</sup>. Blann et al<sup>183</sup> encontraron una correlación entre

---

<sup>179</sup> Sirtori CR, Tremoli E, Gatti E, Montanari G, Sirtori M, et al. **Controlled evaluation of fat intake the mediterránea diet: comparatives activities of olive oil and corn oil on plasma lipids and platelets in high risk patients.** Am J Nutr. 1986; 44: 635-642.

<sup>180</sup> Mutanen M, Freese R, **Polyunsaturated fatty acids and platelet aggregation.** Curr Opin Lipidol 1996;7:14-19.

<sup>181</sup> La Hoz C, Alonso R, Ordovás M, Lopez-Farré A, De Oya M, Mata P. **Effect of dietary fat saturation on eicosanoide production, platelet aggregation and blood pressure.** Eur J Clin Invest 1997; 27: 780-787.

<sup>182</sup> Sanders TAB, Oakley FR, Miller GJ, Mitropoulos KA, Crook D, Oliver MF. **Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997; 17: 3449-3460

el FvW y el colesterol total del suero, de acuerdo con estudios previos<sup>184</sup>, observando un aumento del FvW en sujetos hipercolesterolémicos, lo que sugiere que los niveles de éste pueden estar asociados con altos niveles de colesterol. En este estudio la ingesta más alta de grasa poliinsaturada estuvo asociado con los niveles más bajos de FvW, lo que viene a confirmar que las dietas que disminuyen los lípidos tienen una influencia beneficiosa sobre el endotelio vascular. Otro estudio, llevado a cabo en individuos diabéticos no insulín dependientes, demostró el efecto beneficioso de una alimentación rica en MONO al reducir los valores plasmáticos de FvW. Nuestro grupo de trabajo ha publicado recientemente un estudio<sup>185</sup> en el que se determinó en varones sanos y jóvenes el efecto de una alimentación rica en grasa monoinsaturada, típica de los países Mediterráneos, comparado con una rica en hidratos de carbono, sobre los diferentes factores solubles que se originan en la célula endotelial. Observamos que tras el consumo durante 28 días de una alimentación Mediterránea, descendió la actividad plasmática del FvW comparándola con la actividad de este factor después del periodo en el que los mismos sujetos consumieron una alimentación pobre en grasa y rica en hidratos de carbono, o una rica en grasa saturada. Estos datos sugieren que el consumo de grasa monoinsaturada beneficiaría la función endotelial. El porcentaje de cambio en el FvW entre los diferentes periodos alimentarios, estuvo correlacionado con el porcentaje de cambio en los

---

<sup>183</sup> Blann A.D, Jackson P, Bath PMW, Watts G.F. **Von Willebrand factor, a possible indicator of endothelial cell damage, decreases during long-term compliance with a lipid-lowering diet.** J Intern Med 1995; 237: 557-561.

<sup>184</sup> Blann AD, Bushell D, Davies A, Faragher EB, Miller JP, McCollum CN. **Von Willebrand factor the endothelium and obesity.** Int J Obesity 1993;17:723-725.

<sup>185</sup> Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, López-Segura F, et al. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** Atherosclerosis 1999; 145: 351-358.

niveles plasmáticos de colesterol total, c-LDL y apo B. Sin embargo, es importante hacer notar que las concentraciones plasmáticas de FvW solamente descendieron con la dieta Mediterránea, pero no con la rica en hidratos de carbono, a pesar del hecho de que ambas inducían cambios similares en los lípidos plasmáticos.

## e.2. Influencia de la alimentación sobre la coagulación

Los lípidos y lipoproteínas modulan la hemostasia por alteración de la expresión y/o función de factores trombóticos y fibrinolíticos. Por esto, pueden influir sobre la tendencia a la trombosis y la estabilidad del coágulo. El balance entre la producción de tromboxano A<sub>2</sub> (potente vasoconstrictor y agregador plaquetario) y prostaciclina PGI<sub>2</sub> (vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria) es un factor crítico en el inicio y desarrollo de los fenómenos trombóticos.

La formación de complejos FT/VII es el primer paso en el inicio de la cascada de la coagulación, y por esto representa un paso regulador clave en el control de la activación del sistema de coagulación. La atenuación de la actividad del FT, desencadenada tras la ingesta de una nutrición determinada, puede ser relevante en este proceso. La acumulación de evidencias ha demostrado que el descenso en los lípidos plasmáticos reduce los eventos coronarios y la mortalidad en pacientes con enfermedad coronaria<sup>186,187</sup>. Uno de los mecanismos por los que el descenso de los lípidos plasmáticos puede ofrecer tal beneficio clínico podría ser la reducción de la expresión de FT, entorpeciendo la formación del trombo en los sitios de ruptura de la placa.

Estudios "in vitro" han puesto de manifiesto como los ácidos grasos pueden influir sobre la expresión de FT en monocitos. El ácido oleico inhibe

---

<sup>186</sup> Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Rise P, Pazuconi F, et al. **n-3 fatty acid ethil ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes.** Arterioscler Thromb. 1994; 14: 1600-1608.

<sup>187</sup> Hansen JB, Olsen JO, Wilsgard L, Osterud B. **Effects of supplementation with cod liver oil on monocyte tromboplastin synthesis, coagulation and fibrinolysis.** J Intern Med. 1989; 225: 133-139.

la expresión de FT inducida por LPS en monocitos/macrófagos<sup>188</sup>. Los ácidos grasos poliinsaturados, tales como linolénico o linoleico, también disminuían los niveles de FT, mientras que el ácido palmítico fue inefectivo. En contraste, estos componentes no tuvieron efecto sobre la expresión de FT en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) inducidas con LPS o IL-1 $\beta$ . Junto a estos estudios con cultivos celulares, los trabajos de intervención dietética en animales y en humanos apoyan la influencia de los ácidos grasos de la dieta sobre la expresión de FT. Aikawa et al<sup>189</sup> demostraron que un descenso de los lípidos por la dieta reducía la expresión de FT en células dentro del ateroma de conejos. Tremoli et al<sup>190</sup> observaron que la administración relativamente prolongada de una dosis moderada de ácidos grasos n-3 enriquecidos con docosahexaenoico (DHA) y eicosapentanoico (EPA) a voluntarios sanos y pacientes con hipertrigliceridemia, reducía la actividad del FT en monocitos adherentes, en condiciones de no estimulación, así como después de la estimulación con endotoxinas. Los datos de estudios previos sobre los efectos de los ácidos grasos n-3 sobre la actividad del FT son conflictivos. La inhibición de la actividad del FT en células mononucleares humanas después de la administración de aceite de pescado a personas sanas fue previamente publicado por Hansen et al<sup>191</sup>. Estas observaciones, sin embargo no

---

<sup>188</sup> Lalé A, Herbert JM. **Polyunsaturated fatty acids reduce pyrogen-induced tissue factor expression in human monocytes.** *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 429-431.

<sup>189</sup> Aikawa M, Voglic SJ, Sugiyama S, Rabkin E, Taubman MB, Fallon JT, et al. **Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma.** *Circulation* 1999; 100: 1215-1222.

<sup>190</sup> Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Rise P, Pazzuconi F, et al. **n-3 fatty acid ethyl ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes.** *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 1600-1608.

<sup>191</sup> Hansen JB, Olsen JO, Wilsgard L, Osterud B. **Effects of supplementation with cod liver oil on monocyte thromboplastin synthesis, coagulation and fibrinolysis.** *J Intern Med* 1989; 225: 133-139.

podieron ser confirmadas en otros estudios<sup>192</sup>. Estos últimos trabajos fueron realizados con dosis altas de ácidos grasos n-3 (5g/d), administrados como aceite de pescado durante periodos relativamente cortos de tiempo. Sin embargo, en sujetos sanos, la administración de ácidos grasos n-3 (3g/d) durante periodos de tiempo más largos de 6 semanas, son suficientes para inhibir la actividad del FT en monocitos adherentes. El retraso en el efecto de los ácidos grasos sobre la actividad del FT en monocitos comparado con lo observado para otros mediadores inflamatorios derivados de monocitos, tales como citocinas y leucotrienos, sugiere que la regulación de la actividad del FT no es un blanco inmediato para los ácidos grasos n-3, pero que ellos, probablemente, actúan en concierto con otros mediadores aún no identificados, posiblemente influenciando la expresión de genes. La extensión de la inhibición de la actividad del FT en monocitos no estimulados y estimulados con endotoxinas, que fue observada después de 12 semanas de tratamiento con 3g/día de ácidos grasos n-3 a sujetos sanos, fue comparable con lo descrito para células mononucleares de primates. Durante el tratamiento, la inhibición de la actividad del FT estuvo acompañada de una acumulación de ácidos grasos n-3 en el plasma y en los compartimentos de los monocitos. Además, los niveles de ácidos grasos n-6 se redujeron durante el tratamiento, principalmente en monocitos. El descenso en la actividad del FT persistió después de retirar el tratamiento; las concentraciones de los ácidos grasos del plasma y de los monocitos tendieron a alcanzar

---

<sup>192</sup> Pellegrini G, Totani L, Di Santo A, Tacconi MT, Donati MB, Lorenzet R. **Supplementation-induced changes in polyunsaturated fatty acid membranes and plasma composition do not modify mononuclear cell procoagulant activity.** Thromb Res 1993; 71: 95-101.

valores aproximados a los basales. Los ácidos grasos n-3 también reducen eficazmente la actividad del FT en personas con hipertrigliceridemia<sup>193</sup>, en monocitos adherentes no estimulados y después de la estimulación con endotoxinas. En dichos pacientes, sin embargo, la actividad del FT fue reducida en menor extensión que en las personas normales. Esto puede ser debido a los niveles anormalmente elevados de lipoproteínas ricas en triglicéridos existente en el plasma de estos sujetos que sufren complejas interacciones con los ácidos grasos n-3, así como con los monocitos. La inhibición de la actividad del FT estuvo acompañada de una acumulación de ácidos grasos Eicosapentanoico y Docoxohexanoico en las muestras de plasma de los pacientes, que fue comparable a lo observado en las personas sanas.

El factor VII es la primera enzima encontrada en la vía extrínseca de la coagulación sanguínea. Su activación ocurre a través de su unión al factor tisular y la formación de un complejo VII a-FT. La actividad coagulante del factor VII (VIIc) ha sido utilizada como predictora de enfermedad coronaria, fatal en hombres de mediana edad, incluso después de eliminar otros factores de riesgo tales como la presión sanguínea y el colesterol del plasma<sup>194</sup>. En un estudio prospectivo incluso el factor VIIa se ha relacionado con el riesgo de padecer cardiopatía isquémica,

<sup>193</sup> Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Rise P, Pazzuconi F, et al. **n-3 fatty acid ethil ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes.** *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1600-1608

<sup>194</sup> Sanders TAB, Oakley FR, Miller GJ, Mitropoulos KA, Crook D, Oliver MF. **Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors.** *Arterioscler ThrombVasc Biol* 1997; 17: 3449-3460.

independientemente de otros factores como son el consumo de tabaco, la obesidad, la hipertrigliceridemia, y los niveles de lipoproteína a (Lpa)<sup>195</sup>.

La actividad del factor VII se correlaciona con la concentración plasmática de triglicéridos en adultos sanos y en hiperlipémicos<sup>196</sup>. En un estudio epidemiológico<sup>197</sup>, de 203 participantes, el factor VIIc se correlacionó con concentraciones plasmáticas de lipoproteínas enriquecidas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) e IDL. La ingestión de grasa está acompañada por un rápido aumento de la actividad coagulante del factor VII, lo que sugiere que la lipemia postprandial está implicada en la activación del factor VII<sup>198</sup>. La magnitud de los niveles de factor VII postprandial se correlaciona con el contenido y tipo de la grasa de los alimentos ingeridos, y el grado de elevación de triglicéridos<sup>199</sup>. El FVII ag<sup>200</sup> retorna a los niveles basales tras una comida sin embargo el FVIIc permanece elevado horas después en personas hipertrigliceridemicos. La actividad coagulante del factor VII está influenciada igualmente por la composición y concentración de ácidos grasos del plasma. Durante la lipólisis, los ácidos grasos libres generan una carga negativa sobre la superficie de las lipoproteínas que activa la vía

---

<sup>195</sup> Scarabin PY, Vissac AM, Kirzin JM, Bougeat PM, Amiral J. **Population correlates of coagulation of factor VII. Importance of age, gender and menopausal status as determinants of activated factor VII.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 1: 1170-1176.

<sup>196</sup> Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Rise P, Pazzuconi F, et al. **n-3 fatty acid ethyl ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes.** Arterioscler Thromb. 1994; 14: 1600-1608.

<sup>197</sup> Mitropoulos KA, Miller GJ, Reeves BEA, Wilkes HC, Cruickshank JK. **Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle-aged men.** Atherosclerosis 1989; 76:203-208.

<sup>198</sup> Sanders TAB, Miller GJ, Blomback M, Steiner G, Walldius G, Hamsten A. **Post-Prandial activation of coagulant factor VII by long-chain dietary fatty acids.** Thromb Haesmost. 1996; 76: 369-371.

<sup>199</sup> Mitropoulos KA, Miller GJ, Martin JC, Reeves BEA, Cooper JA. **Dietary fat induces changes in factor VII coagulant activity through effects on plasma free stearic acid concentration.** Arterioscler Thromb 1994;14: 214-222.

<sup>200</sup> Silveira A, Karpe F, Blomback M, Steiner G Walldius G, Hamsten A. **Coagulation factor VII during alimentary lipemia.** Arterioscler Thromb 1994;14: 60-69.

intrínseca de la coagulación a través de la activación del factor VII. Aunque una reducción en la ingesta de grasa total está asociada con una reducción en el factor VIIc, el efecto de la composición de la dieta sobre el factor VII no está tan claro. La influencia de diferentes ácidos grasos saturados fue estudiada por Tholstrup et al<sup>201</sup>, encontrando que una nutrición rica en ácido esteárico indujo un descenso de las concentraciones de factor VIIc, al compararlo con una rica en palmitato o una rica en laurato más miristato. En contraposición Mitropoulos et al<sup>202</sup> mostraron que una elevada concentración plasmática de ácido esteárico estaba asociado con aumento de factor VII.

Existen diversos estudios en los que intentan ver el efecto del ácido linolénico, ácido eicosapentanóico y ácido docosahexanóico de la alimentación sobre los niveles de factor VII, no encontrando ningún efecto<sup>203</sup>. Marckmann et al<sup>204</sup>, tampoco hallaron efecto de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena muy larga (n-3 VLC poliinsaturada) del aceite de pescado sobre los niveles de factor VII.

En otro trabajo realizado por Oakley et al<sup>205</sup>, se confirmó que una alimentación baja en grasa lleva a un descenso en el factor VIIc, comparado con una alta en grasa, y que los alimentos ricos en oleato inducen un rápido incremento postprandial en dicho factor. Sin embargo,

---

<sup>201</sup> Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Sandstrom B. **Fat high in stearic acid favourably effects bloods lipid and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids.** Am J Clin Nutr 1994; 59: 371-377.

<sup>202</sup> Mitropoulos KA, Miller GJ, Martin JC, Reeves BEA, Cooper JA. **Dietary fat induces changes in factor VII coagulant activity through effects on plasma free stearic acid concentration.** Arterioscler Thromb 1994;14: 214-222.

<sup>203</sup> Archer SL, Green D, Chamberlain M, Dyer AR, Liu K. **Association of Dietary fish and n-3 fatty acid intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study.** Arterioscl Tromb Vasc Biol 1998; 18: 1119-1123.

<sup>204</sup> Marckmann P, Bladbjerg EM, Jespersen J. **Dietary fish oil (4g daily) and cardiovascular risk markers in healthy men.** Arterioscl Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3384-3391.

<sup>205</sup> Oakley FR, Sanders TAB, Miller GJ. **Postprandial effects of an oleic acid-rich oil compared with butter on clotting factor VII and fibrinolysis in healthy men.** Am J Clin Nutr 1998; 68: 1202-1207.

Temme et al<sup>206</sup> observaron en mujeres, que las concentraciones de factor VII fueron más elevadas tras una alimentación rica en ácido laúrico o palmítico, que tras la rica en ácido oleico. En hombres estas diferencias no fueron significativas. Por último, Miller et al<sup>207</sup> concluyen que los incrementos de VI I c observados después de la ingesta de alimentos ricos en SAT, MONO, o POLI sugieren que la composición de la grasa de la dieta es menos determinante de las concentraciones del factor VI I c que el contenido en grasa total.

---

<sup>206</sup> Temme EHM, Mensik RP, Hornstra G. **Effect of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on blood coagulation and fibrinolysis.** Thromb Haemost 1999; 81: 259-263.

<sup>207</sup> Miller GJ. **Effects of diet composition on coagulation pathways.** Am J Clin Nutr 1998; 67: 542S-545S.

## f. Alimentación y Fibrinólisis

El principal inhibidor fisiológico de la fibrinólisis es el PAI-1. Un incremento en los niveles plasmáticos de PAI-1 es una de las principales alteraciones hemostáticas de pacientes con enfermedad coronaria, especialmente aquellos con infarto de miocardio o angina de pecho; la actividad del PAI-1 también está incrementada en la pared arterial aterosclerótica. Además, recientemente se ha visto que el PAI-1 está asociado con los triglicéridos y las VLDL<sup>208</sup>. Se ha demostrado en estudios previos<sup>209,210</sup> que la ingesta de grasa no tiene efecto inhibitorio a corto plazo sobre el sistema fibrinolítico. Marckmann et al<sup>211</sup> observaron que la administración, durante un periodo largo de tiempo (8 meses), de una alimentación rica en hidratos de carbono y fibra, incrementaba la actividad fibrinolítica dependiente de t-PA, comparado con una nutrición rica en grasa saturada, aunque no observaron cambios en los niveles de t-PA y PAI-1 plasmáticos. La administración de un aporte nutricional rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3 causó un incremento en el PAI-1 plasmático (PAI-1ag) tanto en individuos sanos<sup>212</sup> como en diabéticos<sup>213</sup>.

<sup>208</sup> Rosenson RS, Lowe GD. **Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology.** *Atherosclerosis* 1998; 140: 271-280.

<sup>209</sup> Salomaa V, Rasi V, Pekkanen J. **The effects of saturated fat and n-6 poliunsaturated fat on postprandial lipemia and haemostatic activity.** *Atherosclerosis* 1993; 103: 1-11.

<sup>210</sup> Marckmann P, Sandstrom b, Jespersen J. **Dietary effects on circadian fluctuation in human blood coagulation factor VII and fibrinolysis.** *Atherosclerosis* 1993;101:225-234.

<sup>211</sup> Marckmann P, Sandstrom B, Jespersen J. **Favorable long-term effect of a low- fat/high fiber diet on human blood coagulation and fibrinolysis.** *Arterioscler Thromb* 1993; 13: 505-511.

<sup>212</sup> Fumeron F, Brigant L, Ollivier V, De Prost D, Driss F, Darcet P, et al. **n-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men.** *Am Clin Nutr* 1991; 54: 118-122.

<sup>213</sup> Froschl H, Spannagi M, Drummer C, Landgraf-Leurs MMC, Langraf R, et al. **Effect of eicosapentanoic acid diet on humoral clotting and fibrinolysis parameters in type-1 diabetes mellitus.** *Haemostasis* 1998; 18(suppl 2) : 27-28.

Se conoce la correlación existente entre el t-PA y su principal inhibidor el PAI -1. Se ha observado que las variaciones en la cantidad y composición de la grasa en la alimentación pueden modificar los niveles de ambos<sup>214</sup>. Algunos autores han investigado el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga, EPA y DHA, y han encontrado que dichos ácidos grasos pueden disminuir la concentración y actividad del t-PA, lo que sería poco deseable para la enfermedad vascular<sup>215</sup>. Sin embargo, se ha observado en otros estudios *in vivo*<sup>216</sup> que la suplementación con ácidos grasos n-3 disminuye la concentración de PAI -1 plasmático. Salomaa et al<sup>217</sup> compararon el efecto de tres alimentos, uno rico en ácidos grasos saturados (crema), otro rico en ácidos grasos poliinsaturados n-6 (aceite de girasol), y otro libre de grasa, y no observaron diferencias significativas en el t-PA antigénico. Kozima et al<sup>218</sup> encontraron que sujetos alimentados con 100 gramos de mantequilla mostraban una actividad fibrinolítica disminuida, comparada con aquellos que tomaron una alimentación libre de grasa. Sin embargo, cuando se estudia el efecto sobre la fibrinólisis de una alimentación rica en aceite de oliva, frente al de una rica en mantequilla, que contiene una alta proporción de ácidos grasos de cadena corta y media, se observa que no hay diferencias en la respuesta de la actividad del t-PA entre las diferentes

---

<sup>214</sup> Mahrabian M, Peter JB, Barnard RJ, Lusic AJ. **Dietary regulation of fibrinolytic factors.** *Atherosclerosis* 1990; 84: 25-32.

<sup>215</sup> Allman-Farinelli MA, Hall D, Kingham K, Pang D, Petoez P, Favarolo EJ. **Comparison of the effects of two low fat diets with different  $\alpha$ -linolenic: linoleic acid ratios on coagulation and fibrinolysis.** *Atherosclerosis* 1999; 142: 159-168.

<sup>216</sup> Toft I, Bonna KH, Ingebretsen OC, Nordoy A, Jenssen T. **Fibrinolytic function after dietary supplementation with omega 3 polyunsaturated fatty acids.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 814-819

<sup>217</sup> Salomaa V, Rasi V, Pekkanen J. **The effects of saturated fat and n-6 polyunsaturated fat on postprandial lipemia and hemostatic activity.** *Atherosclerosis* 1993; 103: 1-11.

<sup>218</sup> Kozima Y, Urano T, Serizawa K, Takada Y, Takada A. **Impaired fibrinolytic activity induced by ingestion of butter: effect of increased plasma lipids on the fibrinolytic activity.** *Thromb Res* 1993; 70: 191-202.

dietas<sup>219</sup>. Temme et al<sup>220</sup> realizaron un estudio de intervención dietética en hombres y mujeres, a los que se les administró tres tipos distintos de nutrición rica en ácido láurico, en oleico, y en palmítico, con el propósito de comparar el efecto de éstos sobre distintos parámetros de la coagulación (FVIIa, FX) y de la fibrinólisis (Fibrinógeno, antitrombina III, actividad del PAI -1 y  $\alpha$ 2- antiplasmina). Concluyeron que la alimentación enriquecida en ácidos grasos saturados empeora el perfil aterogénico, y trombogénico, frente a la alimentación enriquecida en ácido oleico. Sin embargo, Tholstrup et al<sup>221</sup>, en un estudio realizado solo en varones, obtuvieron un contenido de PAI -1 antigénico invariable después de la dieta rica en grasa saturada. Este mismo autor<sup>222</sup>, años más tarde realizó otro trabajo en el que participaron 18 voluntarios a los cuales se les administró dos tipos de nutrición durante 4 semanas de duración cada una para ver el efecto sobre las variables hemostáticas. Los ácidos grasos de la leche fueron modificados variando la alimentación de las vacas. La dieta que contenía la grasa de la leche modificada se comparó con la que contenía la grasa de la leche típica danesa. En la grasa modificada el 16% del contenido en ácidos grasos saturados fue sustituido principalmente por ácido oleico. Después de cuatro semanas de intervención dietética, el PAI -1 antigénico permaneció invariable con las dos alimentaciones diferentes, sin embargo,

---

<sup>219</sup> Oakley FR, Sanders TAB, Miller GJ. **Postprandial effects of an oleic acid-rich oil compared with butter on clotting factor VII and fibrinolysis in healthy men.** Am J Clin Nutr 1998; 68: 1202-1207.

<sup>220</sup> Temme E, Mensik R, Hornsra G. **Effects of diet enriched in lauric, palmitic or oleic acids on bloods coagulation and fibrinolysis.** Thromb Haemost 1999;81:259-263.

<sup>221</sup> Tholstrup T, Marckmann P, Jespersen J, Vessby B, Jart A, Sandstrom B. **Effect on blood lipids, coagulation and fibrinolysis of a fat high in myristic acid and a fat high in palmitic acid.** Am J Clin Nutr 1994; 60: 919-25.

<sup>222</sup> Tholstrup T, Marckmann P, Hermansen J, Holmer G, Sandstrom B. **Effect of modified dairy fat on fasting and postprandial haemostatic variables in healthy young men** Br J Nutr 1999; 82: 105-113.

al medir postprandialmente, tanto el PAI -1 antigénico como la actividad del mismo decrecieron con ambas alimentaciones.

No sólo el contenido en grasa de la alimentación, mejora el perfil fibrinolítico, sino que el aporte calórico total, también contribuye a esta mejoría. Se ha observado<sup>223</sup>, al igual que ocurre en los individuos diabéticos tipo 2, que la reducción de peso tras una alimentación hipocalórica en mujeres obesas posmenopáusicas conduce a una reducción de los parámetros de fibrinólisis, como son el t-PA, PAI -1 ag, y la actividad plasmática del PAI -1. Todo ésto parece relacionado con la asociación existente entre el PAI -1 y el síndrome de resistencia a la insulina, y más aún con algunos de los componentes de éste como son la obesidad y las VLDL.

Nuestro grupo estudió en 21 personas sanas<sup>224</sup> el efecto de una alimentación rica en ácido oleico y otra rica en hidratos de carbono sobre los factores que intervienen en la coagulación y la fibrinólisis. Observamos que durante el consumo de la dieta rica en grasa monoinsaturada, descendieron significativamente la actividad plasmática del PAI -1 y los niveles del PAI -1 antigénico en comparación a los obtenidos tras la rica en hidratos de carbono. Así mismo, los cambios en las concentraciones de insulina se correlacionaron positivamente con la actividad del PAI -1. En otro estudio<sup>225</sup>, se investigó el efecto de tres tipos de alimentación

---

<sup>223</sup> Svedensen OL, Hassager C, Christiansen C, Nielsen JD, Winther K. **Plasminogen activator inhibitor-1, Tissue-type plasminogen activator and fibrinogen. Effects of dieting with or without exercise in overweight postmenopausal women.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 381-385

<sup>224</sup> López-Segura F, Velasco F, López-Miranda J, Castro P, López Pedrera R, Blanco A, et al. **Monounsaturated Fatty Acid-Enriched Diet Decreases Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type 1.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:82-88.

<sup>225</sup> Hunter KA, Crsobie LC, Weir A, Miller GJ, Dutta-Roy AK. **A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men.** *Nutr Biochem* 2000; 11: 408-416.

isoenergéticos, con diferente contenido en ácidos grasos, en 9 voluntarios sanos. Una de las dietas era rica en ácido esteárico, otra rica en ácido oleico y otra rica en ácido linoleico. No encontraron diferencias significativas entre dichas alimentaciones sobre la actividad del PAI -1. Algo similar se observó al modificar el tipo de la dieta en dos poblaciones italianas, comparando una alimentación urbana con otra rural, típicamente Mediterránea<sup>226</sup>. Las características diferenciales de estos dos estilos diferentes de nutrición se basaban básicamente en el contenido calórico y de grasa. La alimentación rural tenía un menor contenido de proteínas, colesterol y grasa saturada, y un mayor aporte en fibra y hidratos de carbono que el modelo urbano. Sí se han demostrado las ventajas de la alimentación Mediterránea, no sólo en cuanto a perfil lipídico se refiere, sino en la mejoría de los parámetros que marcan la función endotelial, como ya hemos comentado a lo largo de esta exposición, el FvW, el inhibidor del factor tisular y el PAI -1<sup>227</sup>.

El descenso en la concentración de PAI -1 antigénico y de la actividad plasmática del PAI -1, tras el consumo de una alimentación rica en ácido oleico, apoyan la idea que el contenido en grasa de la nutrición puede ejercer un efecto protector o perjudicial en el desarrollo de enfermedad coronaria. Aunque no están claros los mecanismos a través de los cuales la alimentación Mediterránea modifica los niveles de PAI -1, se han considerado varios factores como son el efecto de esta alimentación sobre el IMC, sobre la distribución de la grasa corporal y sobre los niveles

<sup>226</sup> Avellone G, Di Garbo V, Cordova R, Scaffidi L, Bompiani GD. **Effects of mediterranean diet on lipid, coagulative and fibrinolytic parameters in two randomly selected population samples in western Sicily.** Nutr Metab Cardiovasc Dis 1998; 8: 287-296.

<sup>227</sup> Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, López-Segura F. et al. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** Atherosclerosis 1999; 145: 351-358.

plasmáticos de triglicéridos, todos ellos relacionados con la producción de PAI -1.

Podríamos pensar que la acción beneficiosa de la alimentación rica en grasa monoinsaturada podrían ir más allá de sus efectos sobre el perfil lipídico y glucémico, participando también en los procesos de trombosis y fibrinólisis, ejerciendo un efecto protector sobre la aterotrombosis.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**



El PAI -1 es el principal inhibidor fisiológico de la fibrinólisis, por su capacidad de impedir la activación del plasminógeno. Existen varios estudios en los que se ha establecido la relación entre actividad del PAI -1 y el riesgo cardiovascular, lo que se atribuye a un efecto favorecedor de los fenómenos trombóticos. Sus niveles plasmáticos están condicionados por la interacción de factores genéticos y ambientales, de los cuales la insulina es el más importante. Entre los factores genéticos hay varios polimorfismos del gen del PAI - 1 que se conocen en la actualidad. Los que mayor relevancia han tenido en la expresión del PAI -1 son el polimorfismo caracterizado por una inserción /delección de una guanina (4G/5G) en la posición -675 pares de bases de la región promotora del gen y el polimorfismo definido por la sustitución de una guanina por una adenina en la posición -844. Los niveles plasmáticos de PAI -1 son superiores en las personas homocigotas para el alelo 4G, intermedios en los 4G/5G, y menores en los 5G/5G. Igualmente el polimorfismo A/G en la posición -844, que se encuentra en estrecho desequilibrio genético de unión con el polimorfismo 4G/5G, parece influir en la concentración de PAI -1.

Nuestra hipótesis pretende demostrar que las concentraciones de PAI -1 dependen de la existencia de una interacción entre los factores genéticos y la alimentación. Consideramos la Hipótesis nula si el efecto de la dieta sobre los niveles del PAI es independiente del polimorfismo indicado.



## **1. OBJETIVO PRINCIPAL**

Estudiar si los niveles plasmáticos de PAI -1 resultan de la interacción entre el polimorfismo 4G/5G y el tipo de alimentación. Para ello vamos a investigar el comportamiento de los portadores de los distintos genotipos ante tres tipos diferentes de alimentaciones, una rica en grasa saturada, otra rica en hidratos de carbono y otra tipo Mediterránea.

## **2. OBJETIVO SECUNDARIOS**

1. Investigar si la respuesta del PAI -1 a la alimentación depende de la influencia de ésta sobre la resistencia periférica a la insulina.

2. Explorar la interacción entre la alimentación Mediterránea y la rica en hidratos de carbono con el polimorfismo A/G en la posición -844 de la región promotora del gen que codifica el PAI -1.



### **III. DISEÑO Y METODOLOGÍA.**



## 1. POBLACIÓN. PERSONAS DEL ESTUDIO.

La población en estudio consistió en 59 voluntarios sanos, 30 hombres y 29 mujeres, de una edad comprendida entre 18 y 30 años. Se llevó a cabo un análisis de dos polimorfismos de la región promotora del gen del PAI -1 el 4G/5G, inserción (5G)/delección (4G), en la posición -675, y el A/G, sustitución de una guanina por una adenina en la posición -844. Para el cálculo del tamaño muestral se han tenido en cuenta las siguientes asunciones:

- Variable principal del estudio: Actividad del PAI -1.
- Desviación estándar de la variable principal del estudio (PAI -1) entre los dos grupos homocigotos: 4 U/mL.
- Diferencia mínima esperada: 6 U/mL.
- Riesgo  $\alpha = 0.05$
- Potencia  $(1-\beta) = 0.90$

Con estas premisas se precisan al menos un total de 9 casos para cada genotipo. En nuestra población 10 personas presentaban el genotipo 4G4G, 28 el genotipo 4G5G y 21 el 5G5G. En cuanto al genotipo AG la distribución fue la siguiente: 14 presentaban el genotipo AA, 32 AG y 12 eran homocigotos para el alelo G. A todos los individuos se les realizó una historia clínica y exploración física completa. Se recogieron datos de filiación, antecedentes personales de enfermedades hematológicas, digestivas, cardíacas, hepáticas, renales o tiroideas, hipertensión arterial, diabetes, o hiperuricemia. Se tomaron medidas antropométricas como: peso, talla, cintura, cadera, pliegue subescapular y pliegue tricípital. Para la medida de estos últimos se empleó un calibrador tipo Harpenden. Se realizaron tres

mediciones consecutivas y se calculó la media entre las tres. También se registró la tensión arterial, y se anotaron la actividad física y el consumo habitual de alcohol y tabaco. Así mismo se calculó en todos los participantes el índice cintura-cadera, y el índice de masa corporal (IMC), también conocido como índice de Quetelet, definido como el cociente obtenido al dividir el peso en kilogramos entre la talla en metros al cuadrado. Se emplearon, como medidas de obesidad central el IMC y el índice cintura cadera. Los pliegues tricípital y subescapular se emplearon como medida de adiposidad, siendo el pliegue subescapular el que mejor se correlaciona con el IMC.

Criterios de inclusión: seleccionamos personas sanas con una edad comprendida entre los 18 y los 30 años, sin evidencia de enfermedad arteriosclerótica, con cifras de colesterol total menor de 200 mg/dl y triglicéridos por debajo de 200 mg/dl y cifras de tensión arterial sistólica y diastólica menores de 130 y 85 mmHg respectivamente.

Criterios de exclusión: se excluyeron a las personas con irregularidad en el seguimiento de la dieta, aquellas que presentaban un IMC mayor de 30 kg/m<sup>2</sup>, o una glucosa en ayunas superior a 126 mg/dl. Se excluyeron también a aquellas con evidencia de enfermedad renal, hepática o tiroidea y/o antecedentes familiares de cardiopatía isquémica. Otros criterios de exclusión fueron el realizar ejercicio de competición, haber tomado medicación o suplementos de vitaminas durante los 6 meses previos al comienzo del estudio, e ingerir más de 30 gramos de alcohol al día.

A todos ellos se les informó exhaustivamente de todas y cada una de las etapas en las que consistía el estudio, y fueron instruidos para que

mantuviesen constantes sus hábitos de vida (ejercicio, consumo de tabaco y alcohol).

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía.

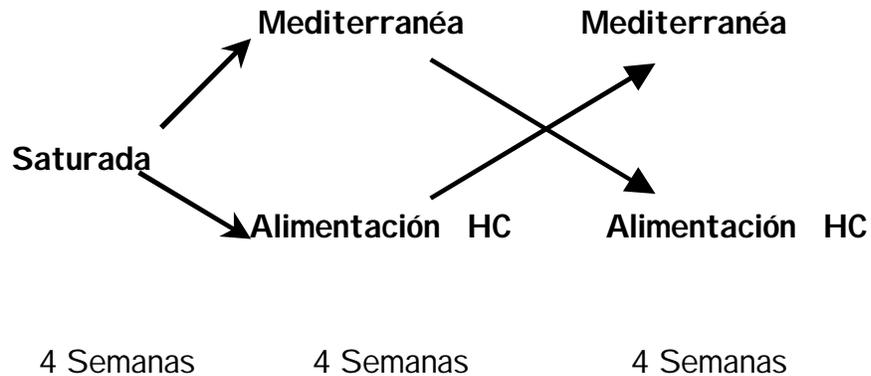
## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO.

### 2.1. Estudio de intervención dietética.

Todos los participantes siguieron tres periodos de intervención dietética aleatorizados y cruzados, de cuatro semanas de duración cada uno, e isocalóricos con relación a su consumo previo habitual, con objeto de mantener el peso de los voluntarios estable.

La composición de la alimentación en los tres periodos fue similar a la administrada por estudios previos realizados por nuestro grupo. El primer periodo consistió en una alimentación típica occidental rica en grasa saturada, con un 15% del aporte calórico en forma de proteínas, 47% de hidratos de carbono y 38% de grasa total (20% de grasa saturada, 6% de poliinsaturada y 12% de grasa monoinsaturada). Tras este periodo, se administró al 50% de los participantes una alimentación Mediterránea rica en aceite de oliva, consistente en un 15% de proteínas, 47% de hidratos de carbono y 38% de grasa total, distribuida de la siguiente forma: <10% de grasa saturada, 6% de POLI y 22% de MONO (fundamentalmente ácido oleico). Al finalizar cada periodo se administró durante otras cuatro semanas una alimentación rica en hidratos de carbono (HC), con <30% de grasa (<10% saturada, 6% POLI, y 12% MONO), 55% hidrocarbonados y 15% proteínas. El 50% restante de voluntarios, tras el periodo inicial rico en SAT, consumió en primer lugar la alimentación rica en hidratos de carbono durante cuatro semanas, seguida de una alimentación rica en MONO durante el mismo periodo de tiempo. El contenido de colesterol de las dietas fue de 112 mg/1000 Kcal en la alimentación rica en SAT, 114

mg/1000 Kcal en la rica en hidratos de carbono y 115 mg/1000 Kcal en la rica en MONO.



Utilizamos 14 menús rotatorios, previamente establecidos, empleando alimentos naturales y calibrados para administrar las proporciones establecidas en cada periodo de dieta. La comida del almuerzo y la cena se administró y fue consumida por los participantes del estudio en el comedor del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, bajo nuestra supervisión y la de un dietista del equipo. El desayuno y la merienda se sirvieron según nuestras instrucciones en las cafeterías de las Facultades de Medicina, y de Ciencias de Córdoba. Consistieron en café con leche y, durante el periodo rico en hidratos de carbono, galletas con mermelada, que se sustituyeron por pan tostado aderezado con aceite de oliva o mantequilla durante la alimentación rica en MONO y SAT respectivamente.

En el cálculo de los nutrientes se utilizaron las tablas de composición de los alimentos del United States Department Of Agriculture (USDA), y la de composición de nutrientes españoles correspondientes a los productos locales. Semanalmente se contactaba con los cocineros durante la

preparación de los alimentos, y se detallaban los nutrientes y menús a utilizar así como las cantidades de aceite empleados en los mismos. Se tomaron muestras de los distintos menús, que se homogeneizaron y analizaron para comprobar que su composición era la realmente diseñada. El control y adherencia de los voluntarios a la dieta se realizó mediante el análisis de la composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol de las LDL, al final de cada uno de los periodos de intervención dietética.

En cada periodo se determinó, en dos ocasiones el peso y la tensión arterial, con objeto de comprobar que se mantenían constantes a lo largo de los mismos. El estudio se realizó en los meses de Enero, Febrero y Marzo, durante dos años para minimizar los efectos estacionales y de tensión académica.

## 2.2 Determinaciones analíticas y bioquímicas.

2.2.1. Extracciones. Previamente al inicio del ensayo se realizaron extracciones de 30 ml de sangre venosa, en situación de ayunas de 12 horas, para aislamiento del DNA. Todas las extracciones de sangre se realizaron tras doce horas de ayuno, utilizando para ello agujas venoject (Terumo) y tubos (vacutainer), conteniendo 1 mg/ml de EDTA para evitar la oxidación de las lipoproteínas y como anticoagulante. Tras cada periodo de intervención se obtuvieron muestras de 50 cc de sangre venosa, siempre a las 9 horas, para evitar las variaciones circadianas que sufre la concentración plasmática del PAI -1.

2.2.2. Determinaciones bioquímicas. En cada uno de los tiempos indicados determinamos en el plasma la concentración total de colesterol y triglicéridos, así como el colesterol y triglicéridos vehiculizados en cada una de las diferentes partículas lipoprotéicas (LDL, HDL). También determinamos los niveles plasmáticos de apo A-I y B. Las determinaciones de colesterol y triglicéridos se realizaron mediante test enzimáticos<sup>228,229</sup> en un autoanalizador BM Hitachi 704, utilizando reactivos de la casa comercial Boehringer Mannheim (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania). Los controles de calidad han sido Precinorm L, Precinorm U y Precipath U, todos ellos de esa misma casa comercial. La cuantificación de

---

<sup>228</sup> Allain CC, Poon LS, Chan CSg, Richmond W, Fu PC. **Enzymatic determination of total serum cholesterol.** Clin Chem 1974; 20: 470-474

<sup>229</sup> Fossati P, Prencipe L. **Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide.** Clin Chem 1982; 28: 2077-2082

apo-A-1 y apo-B se realizó por inmunoturbidimetría, en un autoanalizador BM Hitachi, con los reactivos de la casa Boehringer- Mannheim<sup>230</sup>.

El c-HDL se determinó en el sobrenadante, obtenido tras la precipitación de las lipoproteínas que poseen apo-B con ácido Wolfrámico y cloruro magnésico<sup>231</sup>. El c-LDL fue calculado mediante la fórmula de Friedewald<sup>232</sup>. Las concentraciones plasmáticas de glucosa se determinaron por métodos enzimáticos (GOD-PAD) (Boehringer-Mannheim, Alemania).

Las concentraciones plasmáticas de insulina se determinaron mediante radioinmunoanálisis<sup>233</sup>, utilizando para ello un Kit comercial (<sup>125</sup>I- Insulin Coatria de BioMerieux, Francia).

La actividad plasmática de PAI-1 se determinó mediante métodos cromogénicos, utilizando para ello el Kit Spectrolyse/Fibrin PAI (Biopool)<sup>234</sup>. Para ello se extrajeron 30 cc de sangre venosa en tubos conteniendo citrato e inmediatamente, tras su extracción, se centrifugaron a 2800 rpm durante 20 minutos. Se manejaron las muestras con sumo cuidado para evitar la contaminación por plaquetas, lo cual conllevaría artefactar los niveles de PAI-1, dado que las plaquetas pueden liberar PAI-1. El coeficiente de variación intraensayo fue de 2.57%.

---

<sup>230</sup> Riepponen P, Marniemi J, Rautaoja T. **Inmunoturbidimetric determination of apolipoprotein A-I and B in serum.** Scand J Clin Lab Invest 1987; 47: 739-744.

<sup>231</sup> Assmann G, Schrierwer H, Schmitz G, Hägele E. **Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid- MgCl<sub>2</sub>.** Clin Chem 1983; 29: 2026-2030.

<sup>232</sup> Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge.** Clin Chem. 1972; 18: 499-502.

<sup>233</sup> Catt KT, Traeger GW. **Solid-phase radioimmunoassay in antibody cated tube.** Science 1967; 158: 1570-1572.

<sup>234</sup> Chemielewska J, Ranby M, Wiman B. **Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma.** Thromb Res 1983; 31: 427-436.

La cuantificación de PAI-1 antigénico se realizó mediante ELISA utilizando para ello el Kit TintElize/PAI-1 (Biopool)<sup>235</sup>, de manera similar al previamente descrito.

2.2.3. Test de resistencia a la insulina. Se determinó la sensibilidad periférica a la insulina, al final de cada uno de los periodos de intervención, mediante una modificación del test de supresión de la insulina descrito por Reaven et al<sup>236</sup>. Para ello, al final de cada periodo, cada persona recibió una infusión continua intravenosa de somatostatina (5 µg/min.), insulina (25 mU/m<sup>2</sup>/min.), y glucosa (240 mg/m<sup>2</sup>/min.) a través de un cateter de politetrafluoroetileno, insertado en una vena superficial antecubital. Se extrajeron muestras de sangre venosa a través de un cateter similar al anterior, e insertado en una vena antecubital contralateral, mantenido permeable mediante la infusión de suero salino (0.9%) conteniendo 20 meq/L de cloruro potásico. La infusión continua se mantuvo durante 180 minutos y las muestras de sangre venosa se extrajeron antes y a los 30, 60, 90, 120, 150, 160, 170 y 180 minutos de comenzar la infusión de glucosa, insulina y somatostatina. En dichas muestras se determinó la concentración plasmática de glucosa e insulina. El valor medio de las cuatro determinaciones realizadas durante los 30 últimos minutos del test, fue utilizado para calcular las concentraciones de glucosa (SSPG) e insulina en estado de equilibrio. Dado que los niveles plasmáticos de esta hormona, en dicho estado son los mismos en todos los

---

<sup>235</sup> Declerck PJ, Alessi MC, Vertreken M, Kmithof E, Juhan- Vague I, Collen D. **Measurement of plasminogen activator 1 in a biological fluid with a murine monoclonal antibody based enzyme- linked immunosorbent assay.** Blood 1988; 71: 220-225

<sup>236</sup> Shen SW, Reaven GM, Farquhar J. **Comparison of impedance to insulin –mediated glucose uptake in normal subjects and ins subject with latent diabetes.** J Clin Invest 1970; 49: 2151-2160

individuos, la concentración de glucosa en el estado de equilibrio constituye una medida de la sensibilidad a la insulina. De esta forma, cuanto mayor sea la SSPG, mayor resistencia a ésta tendrá el individuo y al contrario.

### 2.3. Aislamiento de ADN.

El ADN se aisló a partir de 30 cc de sangre recogidos en tubos (vacutainer) conteniendo EDTA (1mg/ml) como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron (2500 rpm, 20°C, 20 minutos) en una centrífuga Beckman modelo J-6, para separar la capa de leucocitos. Éstos fueron tratados con 10 mL de buffer Montreal-Baltimore, para destruir las membranas celulares. Más tarde se introdujeron los tubos en hielo durante 10 minutos. A continuación se centrifugaron (2500 rpm, 4°C, 20 minutos), recuperando el sobrenadante y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Al precipitado obtenido le añadimos 3 mL de Buffer Nuclei Lysis, lisando así los núcleos y quedando el material genético libre, homogeneizando después la muestra. Una vez realizado dicho proceso se añadieron 0,2 mL de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% a cada tubo y 0.1 mL de proteinasa K, agitando por inversión. Se incubó a 42°C durante toda la noche. Tras esto, se añadió 1 mL de ClNa 6M, volviendo a centrifugar (2500 rpm, 4°C, 15 minutos). El ADN contenido en el sobrenadante se precipitó con etanol al 100%. Posteriormente se disolvió en 500 µL de solución tamponada de TE estéril.

Todo el proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad, para evitar la contaminación.

Para cuantificar el ADN se empleó un espectrofotómetro Beckman DU-64 de lectura digital, usando una longitud de onda de 260 Å con luz ultravioleta, y utilizando cubetas de cuarzo de 10 mm (Hellma, tipo 104-QS). La relación 260/280 fue mayor a 1.8 en todas las muestras.

Las soluciones empleadas se prepararon de acuerdo con las siguientes composiciones:

a- Buffer Montreal- Baltimore (para 500mL):

- 54.77g Sacarosa (Panreac, Barcelona, España).
- 6.057g Tris-HCL (Sigma, St Louis, Mo, USA).
- 2.54 g MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Alemania).
- 5mL Triton x-100 (Sigma).
- Agua destilada csp 500mL, ajustando PH a 7.5.

b- Buffer Nucleo-Lisis (para 500mL):

- 250mL 20nM Tris-HCL (Sigma).
- 2mL 0.5M EDTA (Panreac).
- 40mL 5M NaCl (Panreac).
- 208 mL de H<sub>2</sub>O destilada , ajustando PH a 8,2.

c- Proteinasa K (por cada muestra):

- 1mG de proteinasa K(sigma).
- 10µL de EDTA 0,5M (panreac).
- Agua destilada csp 100µL.

d- ClNa 6M (para 200mL):

- 70.2g de ClNa (panreac).
- Agua destilada csp 200µL.

e- Buffer Tris EDTA (TE) (para 500mL):

- 0.606 g de Tris HCL (Sigma).
- 1 mL de EDTA (Panreac).
- Agua destilada csp 500mL ajustando Ph a 8.

## 2.4. Determinación de Genotipos.

### 2.4.1. Determinación del polimorfismo 4G/5G en la posición -675 pares de bases de la región promotora del PAI -1.

La determinación del genotipo 5G/4G en la posición -675 de la región promotora del gen del PAI -1 se realizó mediante análisis de los fragmentos de restricción del DNA amplificado, por PCR alelo específica<sup>237</sup>, en un termociclador Pettier effect cycling PTC 100. La secuencia de cada uno de los oligonucleotidos ("primers") empleados fue la siguiente P<sub>1</sub> 5'-TCAGCCAGACAAGGTTGTTG-3' y P<sub>2</sub> 5'-TTTTCCCCAGGGGTGTCCA-3'. Los oligonucleótidos alelo específicos empleados fueron los siguientes, para el alelo 4G-GTCTGGACACGTGGGGA y para el alelo 5G- GTCTGGACACGTGGGGG. Cada muestra contiene 62 ng de DNA genómico, 2.5 mmol/LMgCl<sub>2</sub>, 0,77mmol/l dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleótido (tanto el "primer" 3' como el 5' en cada caso más el alelo específico correspondiente a cada genotipo), 0,38 U Taq polimerasa (Biotaq, Bioline) y agua destilada estéril hasta completar 50 µl de volumen final. El ADN se desnaturalizó a 95°C durante dos minutos, seguida de 40 ciclos en las siguientes condiciones: 90°C durante 45 segundos, 1 minuto a 62°C, temperatura de ensamblaje ("annealing") ; 1 minuto a 72°C, y finalmente 5 minutos a 72°C durante el último ciclo. Posteriormente, se extrajeron 5 µl de cada uno de los productos de PCR y se sometieron a electroforesis no desnaturalizante, en geles de poliacrilamida al 8% a 150

<sup>237</sup> Morange PE, Henry M, Tregouet D, Granel B, Aillaud M, Alessi MC, Juhan-Vague I. **The Polymorphism in the PAI-1 Gene is associated with a higher risk of venous thrombosis in factor V Leiden carriers.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20: 1387-1391

V durante 2 horas, para identificar el tamaño de los productos de PCR. De esta forma se determinaron las diferentes fragmentos mediante tinción con sales de plata.

#### 2.4.2. Determinación del genotipo A/G en la posición -844 pares de bases de la región promotora del gen del PAI -1.

La determinación del genotipo A/G en la posición -844 de la región promotora del gen del PAI -1 se realizó mediante análisis de los fragmentos de restricción del DNA, amplificado, por PCR, tal y como se ha descrito previamente por Henry et al<sup>238</sup>. En resumen, se realizó una amplificación de un fragmento de 510 pares de bases de la región promotora del gen del PAI -1 mediante un sistema de PCR con 125 ng de DNA genómico, 12,5 pmol de cada uno de los dos oligonucleótidos el P3 5´-CAGGCTCCCACTGATTCTAC-3´ y el P4 5´-GAGGGCTCTCTTGTGTCAAC-3´, 190 µmol/L dNTP, 2,5 MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U Taq Polimerasa en 50 µl. El DNA fue desnaturalizado a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C 1 min, el ensamblaje a 61 °C durante 1 min, y la extensión a 72 °C durante 2 min. 20 µl de los productos de amplificación por PCR fueron sometidos a digestión con 5 unidades de la enzima de restricción Xho I en un volumen total de 35 µl. Los productos de digestión del DNA se sometieron a electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 8% a 150 V durante 2 horas, para identificar el tamaño de los productos

---

<sup>238</sup> Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arvelier D et al **Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 851-858

de digestión del DNA y de esta forma determinar las diferentes variaciones alélicas mediante tinción con sales de plata.

### 3. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

La significación estadística de las diferencias en los parámetros basales, y el incremento de las concentraciones de lípidos tras las distintas alimentaciones en hombres y mujeres se determinó mediante el test de "T" de Student. Éste mismo test estadístico se empleó para calcular las posibles diferencias entre aquellas personas con IMC mayor y menor de 22 kg/m<sup>2</sup>, y los que poseían un pliegue subescapular mayor o menor de 12.4 mm.

En el estudio estadístico de los datos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Mediante esta prueba se estudió el efecto de los diferentes haplotipos sobre los niveles plasmáticos de colesterol total, triglicéridos, c-LDL, c-HDL, apolipoproteína A1 y B, así como la actividad y concentración antigénica del PAI-1 en cada fase del estudio, al igual que la interacción entre el genotipo y los diferentes periodos alimentarios. Cuando se observaron diferencias significativas, se utilizó el test de Tukey en comparación post-hoc para identificar las diferencias existentes entre cada grupo. Se consideraron significativos valores de  $p < 0.05$ .

Como programa estadístico se empleo el SPSS (versión 7.5 en español, IMC, USA).

#### **4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la revisión bibliográfica se empleó el sistema MEDLARS (Medical Literature Análisis and Retrieval System) a través de su servicio de información por ordenador MEDLINE, utilizándose varias entradas o encabezamientos MeSH (Medical Subjects Heading) del Index Medicus. Se ha empleado también la búsqueda a través de The Cochrane Library.

## **IV. RESULTADOS.**



## 1. Estudio de intervención dietética:

### a. Características basales de la población.

Las características de los participantes al inicio del estudio se muestran en la tabla 1.

	Varones	Mujeres	Valor p*
Número	30	29	
Edad	22	22	0.846
Fumadores	11	7	0.304
IMC(kg/m <sup>2</sup> )	23 ± 0.5	20 ± 0.5	0.001
P. Subescapular (mm)	12.4 ± 0.5	11.65 ± 0.5	0.320
Colesterol (mg/dl)	160 ± 4	163 ± 4	0.636
C- LDL (mg/dl)	102 ± 4	99 ± 4	0.611
C- HDL (mg/dl)	44 ± 2	53 ± 2	0.001
Triglicéridos (mg/dl)	73 ± 6	57 ± 3	0.022
Apo A-1 (mg/dl)	141 ± 3	157 ± 3	0.001
Apo B (mg/dl)	73 ± 2	73 ± 2	0.694

**Tabla 1.** Características basales de los participantes divididos por sexos. (media ± ET). \*: t de Student.

No encontramos diferencias significativas en la edad, consumo de tabaco, colesterol total, c-LDL, ni concentración de apo B, entre los dos sexos. Las mujeres presentaron un índice de masa corporal ( $p < 0.001$ ) y

una concentración de triglicéridos ( $p<0,022$ ) menor que los varones, además la concentración de c-HDL ( $p<0.001$ ) y apo A 1 ( $p<0.001$ ) fue mayor que la de éstos.

### **b. Composición de las dietas**

Las anotaciones en los diarios de los participantes nos indicaban una buena adherencia a la dieta.

La composición de las dietas calculada y analizada utilizadas durante el estudio se muestra en la tabla 2.

	SAT		HC		MONO	
	Calculada	analizada	Calculada	analizada	Calculada	analizada
Energía (MJ)	10.2	10.5	10.2	10.3	10.2	10.5
Proteínas (% energía)	15.0	17.0	15.0	17.3	15.0	17.5
Grasas (%)						
Saturadas	20.0	23.1	10.0	9.0	10.0	9.1
Monoinsaturadas	12.0	10.0	12.0	13.1	22.0	24.7
Poliinsaturadas	6.0	5.0	6.0	6.0	6.0	4.8
Carbohidratos (%)	47.0	44.0	57.0	54.6	47.0	43.9
Colesterol (mg/1000kcal)	115	112	115	116	115	115
Fibra (gr/día)	30	25.9	30	26.1	30	24.9

**Tabla 2.** Composición de las dietas SAT, HC y MONO empleados en el estudio.

En la mayoría de los nutrientes el porcentaje analizado, obtenido del estudio de los componentes de la alimentación, fue similar al calculado al inicio del estudio, sin que se observaran diferencias significativas.

c. Influencia de la alimentación sobre los parámetros lipídicos y sobre el PAI -1.

1. Sobre los lípidos plasmáticos.

En las muestras obtenidas tras cada periodo alimentario se analizaron los efectos de los distintos nutrientes sobre los lípidos y lipoproteínas plasmáticos (tabla 3).

	SAT	HC	MONO	Valor p*
Colesterol	162 ± 3	140 ± 3 <sup>a</sup>	143 ± 3 <sup>a</sup>	0.0001
C-LDL	100 ± 3	83 ± 3 <sup>a</sup>	84 ± 3 <sup>a</sup>	0.0001
C-HDL	48 ± 1	44 ± 1 <sup>a</sup>	46 ± 1 <sup>a,b</sup>	0.0001
Triglicéridos	65 ± 4	69 ± 3	68 ± 4	0.437
Apo A-1	149 ± 2	139 ± 3 <sup>a</sup>	143 ± 2 <sup>a,b</sup>	0.001
Apo B	73 ± 2	66 ± 2 <sup>a</sup>	66 ± 2 <sup>a</sup>	0.001

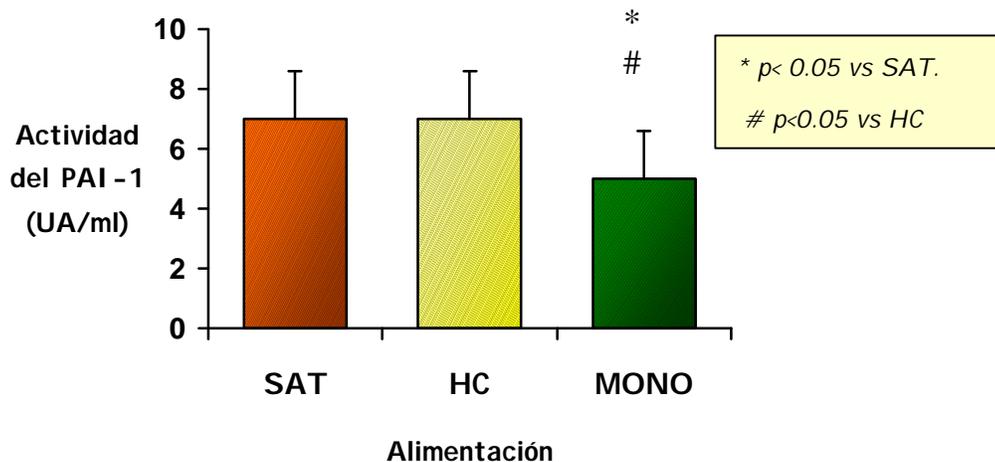
**Tabla 3.** Lípidos y apoproteínas (mg/dl) al final de cada periodo alimentario. Expresado en media ± error estándar. \* : test de Anova para medidas repetidas.. N=59. a = p<0.05 vs SAT ; b= p<0.05 vs HC.

La sustitución isocalórica de una alimentación rica en SAT, por una rica en hidratos de carbono, pobre en grasa, o por una rica en MONO, determinó un descenso de los niveles de Apo A-1 (p<0,0001), Apo B ( p<0.0001), CT (p<0,0001), C-HDL (p <0,0001) y C-LDL (p<0,0001). La sustitución de una alimentación rica en hidratos de carbono por una tipo Mediterránea se asoció a un aumento significativo de los niveles de

apo A ( $p < 0,004$ ), y de c-HDL ( $p < 0,002$ ). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Apo B, Colesterol total, C-LDL, y Triglicéridos entre ambos tipos de alimentación.

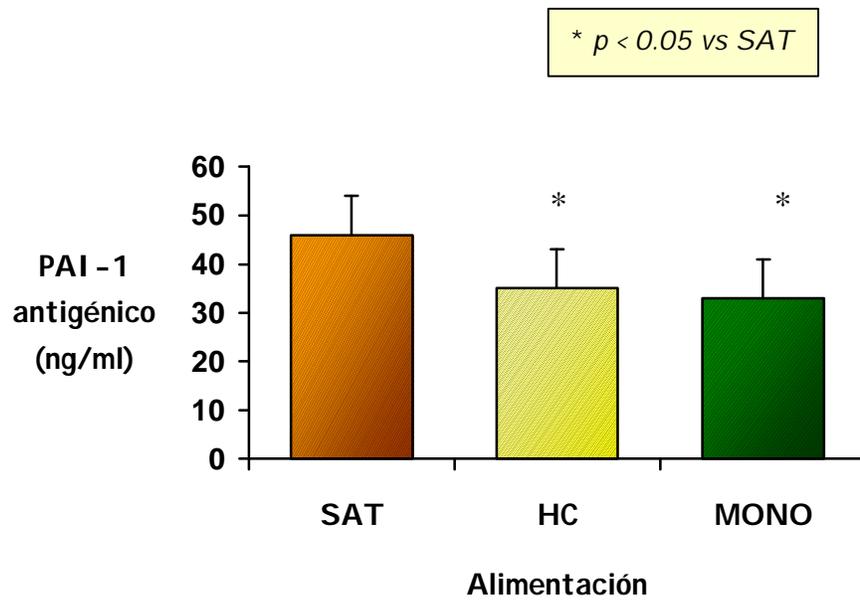
## 2. Efecto de la nutrición sobre la concentración y actividad del PAI-1.

Así mismo se cuantificaron los niveles de PAI-1 antigénico y la actividad plasmática del mismo al finalizar los distintos periodos dietéticos.



**Figura 6:** Actividad del PAI-1 (UA/ml) tras los tres periodos dietéticos.  
\*  $p < 0.05$  vs SAT. #  $p < 0.05$  vs HC

La alimentación también indujo cambios en la actividad plasmática del PAI-1, de forma que el aporte de ácidos grasos monoinsaturados condicionó un descenso de la actividad del PAI-1 frente a los otros dos periodos alimentarios SAT y HC.



**Figura 7:** PAI-1 antigénico (ng/ml) tras los tres periodos alimentarios.  
\*  $p < 0.05$  vs SAT.

El tipo de alimentación llevado a cabo por los participantes modificó también la concentración de PAI-1 antigénico, de forma que las alimentaciones ricas en MONO y la HC condicionaron un descenso de la concentración del PAI-1 frente a la alimentación saturada ( $p < 0.05$ ).

### 3. Cambios en los lípidos plasmáticos tras los distintos periodos alimentarios según el sexo y el IMC.

#### 3.1 Cambios en los lípidos plasmáticos según el sexo.

La población de nuestro estudio comprendía un grupo de varones y mujeres, por lo que quisimos analizar si el sexo influía en las modificaciones

de los lípidos plasmáticos inducidos por los distintos periodos alimentarios realizados.

SEXO	Alimentación	CT	Triglicéridos	c-LDL	c-HDL	APO A-1	APO B
Varones (N =30)	<b>SAT</b>	161 ± 4	73 ± 3	102 ± 4	44 ± 2	141 ± 3	74 ± 2
	<b>HC</b>	141 ± 4	78 ± 3	85 ± 4	40 ± 2	135 ± 3	67 ± 2
	<b>MONO</b>	146 ± 4	75 ± 3	89 ± 4	42 ± 2	138 ± 3	69 ± 2
Mujeres (N =29)	<b>SAT</b>	163 ± 4	57 ± 3	99 ± 4	53 ± 2	157 ± 3	73 ± 2
	<b>HC</b>	139 ± 4	59 ± 3	80 ± 4	47 ± 2	143 ± 3	64 ± 2
	<b>MONO</b>	141 ± 4	61 ± 3	80 ± 4	49 ± 2	150 ± 3	63 ± 2
Valor P*	<b>Sexo</b>	0.845	0.006	0.294	0.003	0.002	0.269
	<b>Alimentación</b>	0.0001	0.468	0.0001	0.0001	0.001	0.0001
	<b>Interacción</b>	0.156	0.607	0.212	0.240	0.026	0.077

**Tabla 4:** Lípidos y lipoproteínas tras las distintas dietas en función del sexo (media ± ET) p\*: Anova para medidas repetidas. CT: colesterol Total.

No se modificaron los niveles de colesterol total, c-LDL, triglicéridos, ni de apo B en las distintas periodos de intervención en función del sexo. A pesar de que las mujeres presentaban una concentración de triglicéridos menor tras las dietas SAT y MONO, no hubo un cambio significativo al pasar de una a otra. En cambio el sexo si tuvo un efecto significativo sobre

los niveles de apo A-1 ( $p<0.002$ ) y de c-HDL ( $p<0.003$ ). Encontramos que existía una interacción entre el sexo y el tipo de alimentación recibida con respecto a la apo A-1 ( $p<0.026$ ).

Cuando analizamos los cambios en los distintos parámetros estudiados originados al pasar de una alimentación SAT a una rica en hidratos de carbono, diferenciando por el sexo, observamos que solo existían diferencias significativas en la apo A1. Los varones presentaban un descenso menor que las mujeres ( $p<0.004$ ) (tabla 5).

SAT-HC	Varones N=30	Mujeres N=29	Valor P*
CT	-19 ± 2 (-12%)	-24 ± 2 (-24%)	0.144
c-LDL	-16 ± 2(-18%)	-18 ± 2 (-16%)	0.490
c-HDL	-4 ± 1 (-8%)	-6 ± 1 (-11%)	0.093
Triglicéridos	5 ± 5(15%)	2 ± 2 (5%)	0.540
Apo A1	-6 ± 2 (-4%)	-13 ± 2 (-13%)	0.004
APO B	-7 ± 1 (-9%)	-9 ± 1 (-9%)	0.250

**Tabla 5:** Variaciones de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas al pasar de una alimentación saturada a una HC. (Media ± ET). p\*: t de Student. CT: colesterol total.

Realizamos una comparación similar entre el periodo de alimentación Saturada y la otra hipolipemiante MONO (tabla 6).

SAT-MONO	Varones N=30	Mujeres N=29	Valor P*
CT	-15 ± 3 (-9%)	-22 ± 2 (-13%)	0.070
c-LDL	-13 ± 3 (-13%)	-19 ± 2 (-19%)	0.079
c-HDL	-2 ± 1 (-3%)	-4 ± 1 (-8%)	0.157
Triglicéridos	2 ± 4 (3%)	4 ± 3 (8%)	0.602
Apo A	-5 ± 2 (-7%)	-7 ± 2 (-6%)	0.293
Apo B	-2 ± 1 (-8%)	-9 ± 1 (-13%)	0.023

**Tabla 6.** Variaciones en los lípidos y lipoproteínas al pasar de una alimentación Saturada a otra MONO. Media ± ET. CT: colesterol total.

Tampoco encontramos diferencias significativas en las variaciones de los lípidos plasmáticos al sustituir una alimentación tipo saturada por una MONO entre varones y mujeres. Si pudimos comprobar que el descenso de la APO B en mujeres fue mayor que el de los varones ( $p < 0.023$ ) (tabla 6).

Por último comparamos el efecto de los dos patrones alimentarios hipolipemiantes.

HC-MONO	Varones N=30	Mujeres N=29	Valor P*
CT	-4 ± 3(-3%)	-2 ± 3 (-2%)	0.521
c-LDL	-1 ± 2(-4%)	-1 ± 2 (-3%)	0.617
c-HDL	2 ± 1(4%)	2 ± 1 (5%)	0.826
Triglicéridos	-3 ± 5(-2%)	-3 ± 5 (-5%)	0.315
Apo A1	3 ± 2 (2%)	7 ± 2 (5%)	0.167
Apo B	-2 ± 1(-1%)	-1 ± 1 (-2%)	0.165

**Tabla 7.** Cambios de las concentraciones de lípidos y apolipoproteínas plasmáticas (mg/dl y %) entre las alimentaciones rica en Hidratos de carbono (HC) y monoinsaturada (MONO) según el sexo. (media ±ET) \* :t de Student. CT: colesterol total.

No existieron modificaciones en los lípidos ni lipoproteínas plasmáticas al pasar de una alimentación HC a otra MONO entre los varones y mujeres (Tabla 7).

### 3.2 Modificaciones de los lípidos en función del IMC

En la tabla 8 se expresan las concentraciones de lípidos y lipoproteínas al final de cada uno de los periodos alimentarios, en función del IMC. Éste tuvo un efecto significativo en los niveles de apo B, c-HDL, c-LDL y triglicéridos. Los voluntarios con un IMC mayor de 22 kg/m<sup>2</sup>, presentaron mayor concentración de apo B (p<0.001), de c-LDL (p <0.034) y de triglicéridos (p< 0.003) que aquellos con un IMC menor de 22 kg/m<sup>2</sup>. En éstas últimas la concentración de c-HDL fue significativamente mayor (p<0.011) en comparación con aquellas con un IMC mayor de 22 kg/m<sup>2</sup>.

IMC Kg/m <sup>2</sup>	Alimentación	CT	LDL	TG	HDL	Apo A	Apo B
<22 n=30	SAT	155 ± 4	92 ± 3	60 ± 5	51 ± 2	148 ± 3	68 ± 2
	HC	135 ± 4	75 ± 3	68 ± 4	45 ± 2	138 ± 3	61 ± 2
	MONO	139 ± 4	77 ± 3	64 ± 4	49 ± 2	144 ± 3	61 ± 2
>22 n=29	SAT	170 ± 4	110 ± 4	72 ± 5	44 ± 2	150 ± 3	80 ± 2
	HC	148 ± 5	94 ± 4	69 ± 4	41 ± 2	141 ± 3	71 ± 2
	MONO	145 ± 5	91 ± 4	72 ± 5	41 ± 2	142 ± 3	72 ± 2
Valor	IMC	0.148	0.03	0.003	0.014	0.386	0.001
p*	Alimentación	0.0001	0.0001	0.363	0.0001	0.0001	0.0001
	Interacción	0.115	0.324	0.464	0.009	0.435	0.041

**TABLA 8:** Lípidos y lipoproteínas (mg/dl) tras los tres periodos de dieta según el IMC (media ± ET). \* ANOVA para medidas repetidas. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total. Tg: triglicéridos.

El IMC también ejerció un efecto significativo sobre las variaciones de los niveles de apo B inducidas por la alimentación. En los participantes con un IMC mayor de 22 kg/m<sup>2</sup> la sustitución de una dieta por otra no modificó significativamente la concentración plasmática de apo B, mientras que en los sujetos con un IMC menor de 22 kg/m<sup>2</sup> descendió significativamente al pasar desde una alimentación rica en grasa saturada a la rica en HC (p<0.041). Algo similar encontramos con respecto al c-HDL. En aquellos que tenían un IMC >22 Kg/m<sup>2</sup> los cambios en la alimentación no modificaron las concentraciones de c-HDL, sin embargo en los que tenían un IMC < 22Kg/m<sup>2</sup> disminuyeron al pasar de una alimentación rica en SAT a una tipo HC (p<0.009).

#### 4. Cambios de la concentración y actividad del PAI-1 según el sexo, el IMC y el pliegue subescapular.

##### 4.1. Modificaciones del PAI -1 en función del sexo.

El siguiente paso que realizamos fue analizar que modificaciones obteníamos en la actividad y concentración del PAI -1 en función del sexo en los tres periodos de alimentación previamente diseñados.

En la tabla 9 se muestran los cambios inducidos por la alimentación sobre los niveles de PAI -1 Antigénico y sobre la actividad plasmática en varones y mujeres.

SEXO	Alimentación	Act- PAI -1 (UA/ml)	PAI -1 ag (ng/ml)
<i>Varones</i> N=30	<b>SAT</b>	8 ± 1	44 ± 4
	<b>HC</b>	8 ± 1	35 ± 3
	<b>MONO</b>	6 ± 1	31 ± 3
<i>Mujeres</i> N=29	<b>SAT</b>	7 ± 1	47 ± 5
	<b>HC</b>	7 ± 1	33 ± 3
	<b>MONO</b>	5 ± 1	33 ± 5
Valor p*	<b>Sexo</b>	0.461	0.608
	<b>Alimentación</b>	0.007	0.001
	<b>Interacción</b>	0.895	0.664

**TABLA 9:** Concentración y actividad plasmática del PAI-1 tras los tres periodos dietéticos según el sexo (media ± ET). Act-PAI -1: actividad del PAI -1. PAI -1-ag: PAI -1 antigénico.

El sexo no condicionó las modificaciones introducidas por la alimentación en cuanto a la concentración y actividad del PAI -1 se refiere, en las personas de nuestro estudio.

#### 4.2. Modificaciones del PAI -1 según el IMC en los tres periodos dietéticos.

Observamos que no existían diferencias significativas en la actividad y concentración plasmática del PAI -1 entre aquellos individuos con un IMC menor o mayor de 22 kg/m<sup>2</sup>. En nuestra población no encontramos influencia del IMC en la respuesta del PAI -1 en los tres periodos de intervención dietética.

IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Alimentación	Act- PAI -1 (UA/ml)	PAI -1 ag (ng/ml)
<i>IMC</i> <22 (N=30)	SAT	8 ± 1	49 ± 5
	HC	7 ± 1	35 ± 4
	MONO	5 ± 1	32 ± 4
<i>IMC</i> >22 (N=22)	SAT	6 ± 1	41 ± 3
	HC	8 ± 1	34 ± 3
	MONO	4 ± 1	35 ± 4
Valor p*	IMC Alimentación Interacción	0.852 0.006 0.121	0.178 0.04 0.150

**Tabla 10:** Actividad y concentración de PAI -1 tras los tres periodos dietéticos en función del IMC. Media ± ET. p\*: Anova para medidas repetidas. Act-PAI -1: actividad del PAI -1. PAI -1-ag: PAI -1 antigénico.

#### 4.3 Modificaciones del PAI -1 según el pliegue subescapular

Realizamos la medición del pliegue subescapular y calculamos la media para el grupo de mujeres y varones. Determinamos la influencia de este parámetro en las modificaciones del PAI -1 (tabla 11)

Pliegue Subescapular (mm)	Alimentación	Act- PAI -1 (UA/ml)	PAI -1 ag (ng/ml)
P. Subesc <12.4 (N=30)	SAT	5 ± 1	37 ± 4
	HC	5 ± 1	30 ± 3
	MONO	3 ± 1	15 ± 3
P. Subesc > 12.4 (N=29)	SAT	9 ± 1	53 ± 4
	HC	9 ± 1	28 ± 3
	MONO	5 ± 1	20 ± 4
Valor p*	P.Subescapular	0.007	0.015
	Alimentación	0.003	0.001
	Interacción	0.191	0.05

**Tabla 11:** Actividad y concentración de PAI -1 tras los tres periodos dietéticos en función del Pliegue subescapular. Media ± ET. p\*: Anova para medidas repetidas. Act-PAI -1: actividad del PAI -1. PAI -1-ag: PAI -1 antigénico.

Comprobamos como existían modificaciones tanto en la actividad como en la concentración de PAI -1 antigénico en función del pliegue subescapular. Las personas con un pliegue subescapular mayor de 12.4 presentaron mayor actividad de PAI -1 (p=0.007) y concentraciones más elevadas de PAI -1 antigénico (p=0.015).

## 2. Polimorfismo 4G/5G de la región promotora del gen del PAI -1.

### a) Frecuencia de los genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI -1.

En primer lugar estudiamos las frecuencias de genotipos encontradas en nuestra población.

*Distribución del genotipo 4G5G*

Genotipo	Número (%)
4G4G	10 (17%)
4G5G	28 (47%)
5G5G	21 (36%)

*Frecuencia de alelos*

Alelos	Número (%)
Alelo 4G	48 (40%)
Alelo 5G	70 (60%)

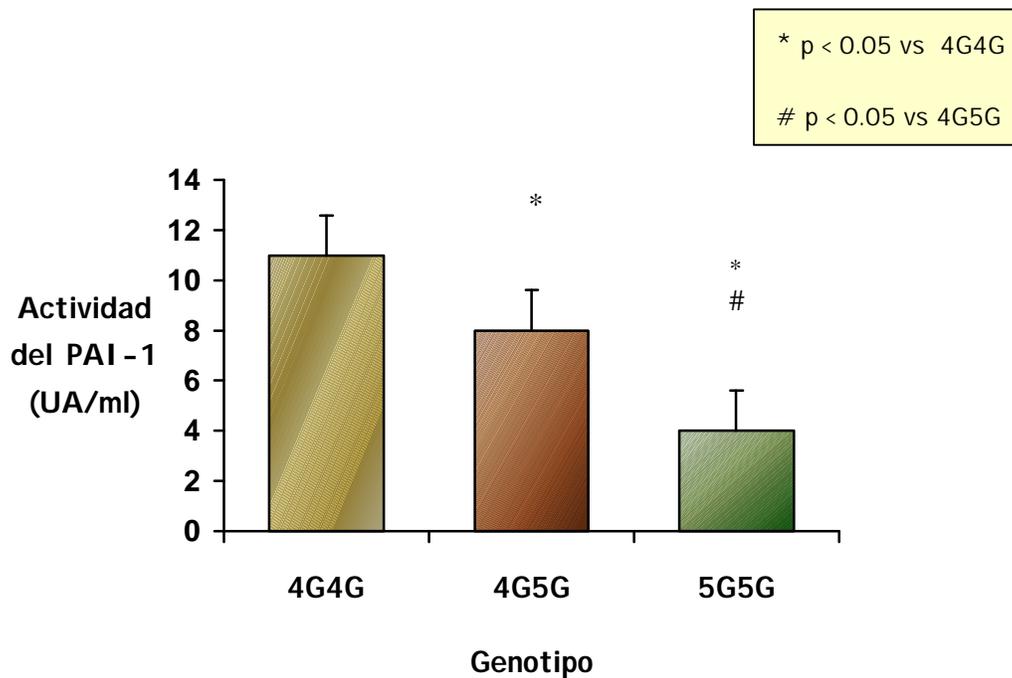
La distribución por genotipos fue similar a la descrita en la literatura en individuos sin cardiopatía isquémica. Encontramos un 17 % de personas con el genotipo 4G4G, un 47 % heterocigotos para el alelo 4G y un 36% de homocigotos para el alelo 5G.

b) Características basales de los participantes en el estudio según el polimorfismo 4G/5G del PAI-1 en la posición -675 de la región promotora.

	4G4G	4G5G	5G5G	Valor P*
Número	10	28	21	
Sexo v/m	4/6	13/15	13/8	0.60
Tabaco	3	8	7	0.64
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	21.07 ± 0.6	21.06 ± 0.6	21.4 ± 0.7	0.89
P. Subescapular (mm)	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	0.72
CT (mg/dl)	178 ± 6	161 ± 5	155 ± 5 <sup>a</sup>	0.03
c-LDL (mg/dl)	117 ± 4	99 ± 4 <sup>a</sup>	93 ± 3 <sup>a</sup>	0.01
c-HDL (mg/dl)	47 ± 3	50 ± 2	47 ± 3	0.72
TGL (mg/dl)	70 ± 8	59 ± 9	70 ± 8	0.26
Apo A (mg/dl)	151 ± 5	150 ± 3	147 ± 4	0.82
Apo B (mg/dl)	84 ± 2	72 ± 2 <sup>a</sup>	69 ± 3 <sup>a</sup>	0.01

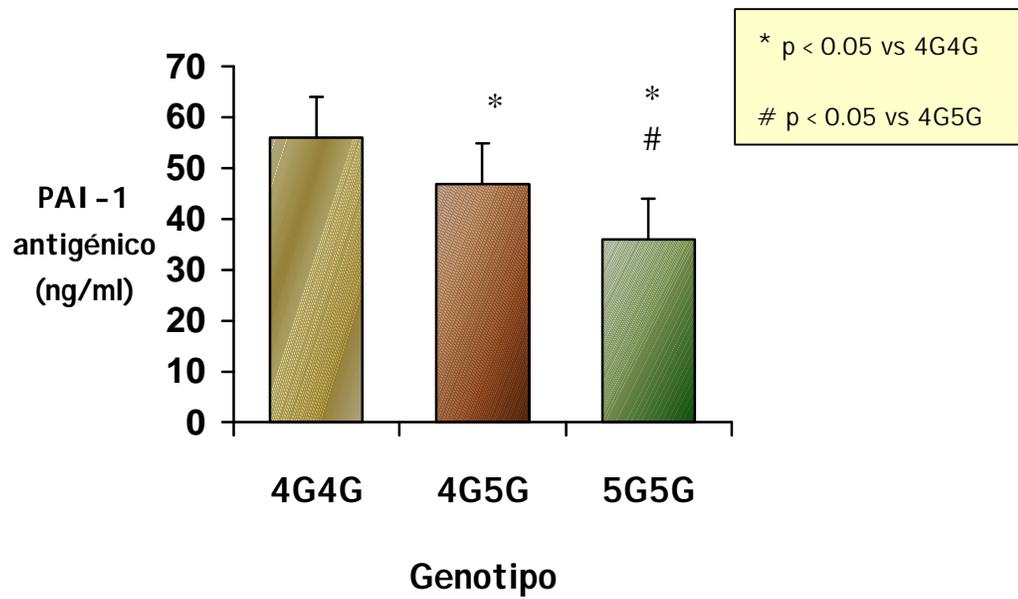
**Tabla 12:** Características basales por genotipos. \*: Anova para medidas repetidas. IMC: índice de masa corporal. CT: colesterol total. TGL : triglicéridos. a = p< 0.05 vs 4G4G.

Tanto los individuos con el genotipo 5G5G, como los heterocigotos 4G5G presentaron menores concentraciones de C-LDL ( $p < 0.01$ ) y de Apo B ( $p < 0.01$ ), al compararlos con los homocigotos 4G4G (Tabla 12). Los homocigotos para el alelo 5G presentaban además menor concentración de colesterol total. No existían diferencias en cuanto al sexo, IMC, ni consumo de cigarrillos en los tres grupos.



**Figura 8:** Actividad del PAI-1 en situación basal en función del polimorfismo 4G/5G de la posición -675 de la región promotora del PAI-1.

Los individuos portadores del genotipo 4G4G expresaban una mayor actividad plasmática frente a los 5G5G ( $P = 0.016$ ) y frente a los heterocigotos 4G5G ( $p = 0.036$ ).



**Figura 9.** Concentración del PAI -1 antigénico en los distintos genotipos en situación basal.

En cuanto a la concentración de PAI -1 antigénico observamos, de la misma forma que en la actividad, que los homocigotos para el alelo 4G presentaron concentraciones significativamente mayores que los portadores del alelo 5G.

### c) Concentraciones de lípidos y lipoproteínas según el polimorfismo 4G/5G

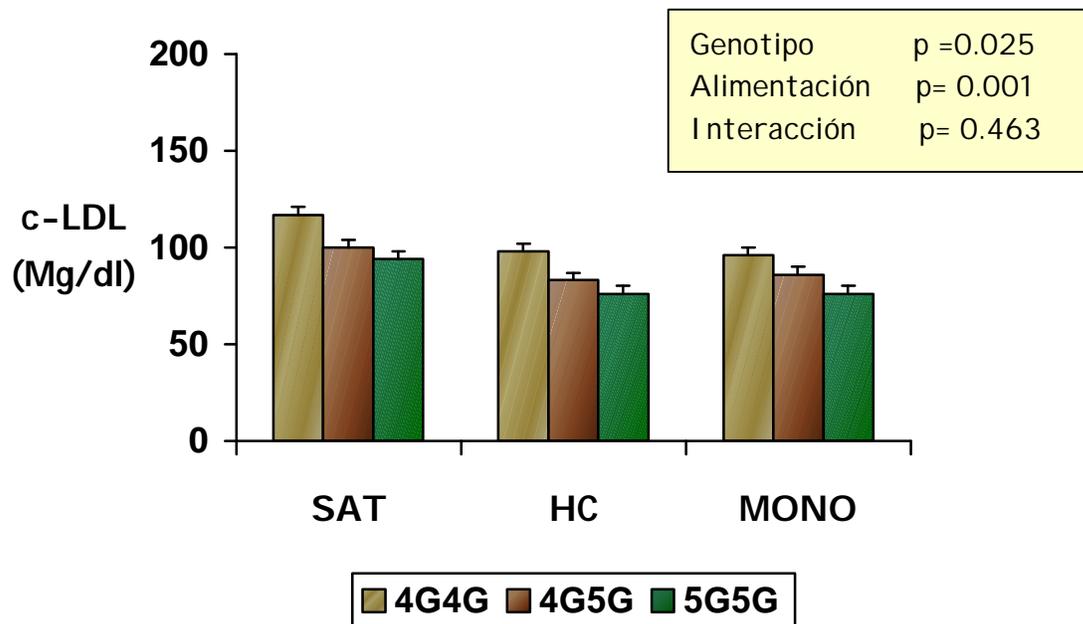
A continuación estudiamos los cambios en los lípidos plasmáticos en función del polimorfismo 4G/5G en los distintos periodos alimentarios.

Genotipo	Alimentación	CT	C-LDL	C-HDL	TGL	Apo A	Apo B
4G4G	Sat	178± 5	117± 4	47± 2	70± 8	151± 5	73 ± 3
	HC	154± 7	98± 4	41± 2	72± 6	139± 3	75 ± 3
	Mono	153± 5	96± 4	43± 2	71± 8	141± 4	73 ± 3
4G5G	Sat	161± 5	100± 4	49± 2	58± 4	150± 3	72 ± 3
	HC	141± 5	83± 4	45± 2	66± 5	141± 3	65 ± 3
	Mono	145± 5	85± 4	46± 2	67± 5	146± 4	67 ± 3
5G5G	Sat	155± 5	93± 4	47± 2	70± 7	147± 4	69± 3
	HC	132± 5	76± 4	43± 2	67± 5	137± 3	61± 3
	Mono	136± 5	77± 4	46± 2	66± 7	142± 4	60± 3
Valor P*	Genotipo	0.067	0.025	0.702	0.627	0.736	0.020
	Alimentación	0.0001	0.0001	0.0001	0.77	0.0001	0.0001
	Interacción	0.304	0.463	0.143	0.086	0.290	0.143

**Tabla 13:** Valores de lípidos y lipoproteínas en los distintos periodos dietéticos en función del polimorfismo 4G/5G. \*: Anova para medidas repetidas. Media ± ET. CT: colesterol total TGL : triglicéridos.

En la tabla 13 se muestra el efecto de la interacción entre la alimentación y el polimorfismo 4G/5G sobre los lípidos plasmáticos. Encontramos una influencia del genotipo en el c-LDL ( $p < 0.025$ ) y Apo B ( $p < 0.020$ ). No observamos interacción entre la alimentación y el genotipo en ninguno de los parámetros anteriores.

En la figura 10 representamos las modificaciones del c-LDL según el polimorfismo 4G/5G del gen del PAI -1.



**Figura 10** : Representación del c-LDL en función del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI -1 en los tres periodos alimentarios.

Detectamos un efecto del genotipo del PAI -1 sobre el c-LDL en los distintos periodos alimentarios. Durante la alimentación SAT los portadores del genotipo 4G4G presentaban mayores concentraciones de c-LDL frente a los otros dos genotipos ( $p < 0.05$ ). En el periodo HC y MONO tan solo encontramos diferencia entre los homocigotos para el alelo 4G y los homocigotos para el alelo 5G ( $p < 0.05$ ).

**d) Influencia de la alimentación sobre el PAI -1 según el polimorfismo 4G/5G.**

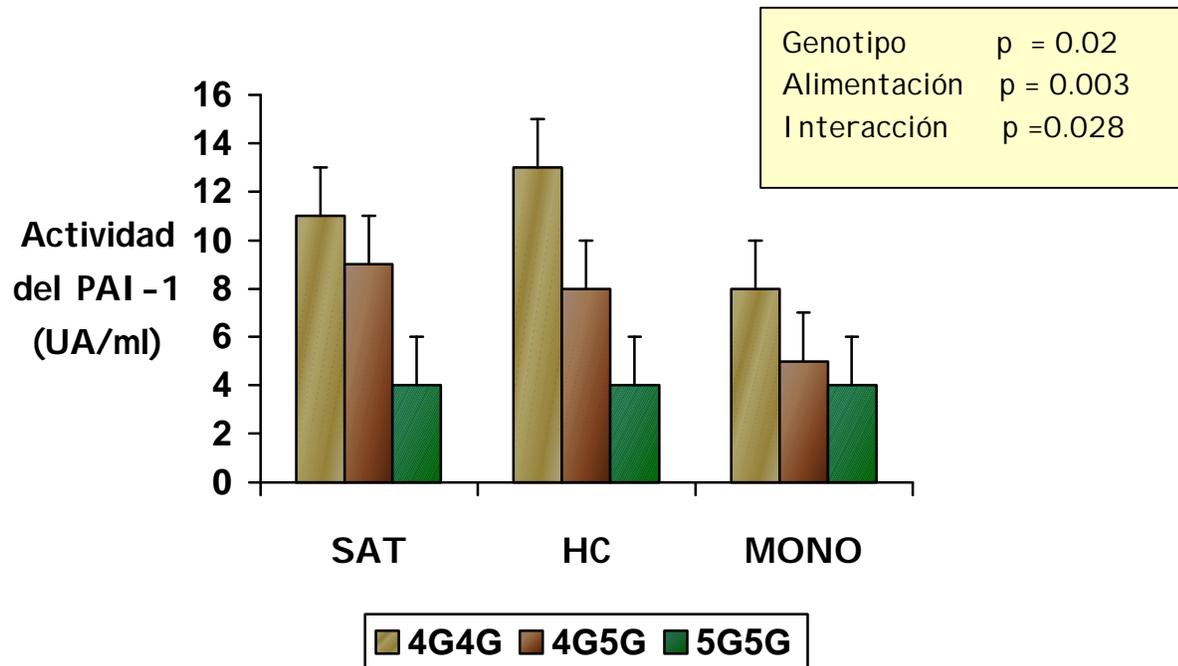
Analizamos los cambios en la concentración y actividad del PAI -1 en los distintos periodos de intervención y en función del polimorfismo 4G/5G.

Genotipo	Alimentación	PAI -1 act	PAI -1-Ag
4G4G	Sat	11 ± 1	56 ± 7
	HC	13 ± 2	42 ± 4
	Mono	8 ± 1	44 ± 6
4G5G	Sat	9 ± 1	47 ± 5
	HC	8 ± 1	34 ± 3
	Mono	5 ± 1	30 ± 3
5G5G	Sat	4 ± 1	36 ± 4
	HC	4 ± 1	29 ± 3
	Mono	4 ± 1	27 ± 4
Valor P*	Genotipo	0.002	0.05
	Alimentación	0.003	0.001
	Interacción	0.028	0.03

**Tabla 14:** Actividad plasmática (UA/ml) y concentración del PAI -1 (ng/ml) en las distintas dietas en función del polimorfismo 4G5G.

Cuando analizamos los cambios de la actividad plasmática del PAI -1 y la concentración del PAI -1 antigénico tras cada periodo alimentario según el genotipo encontramos que los homocigotos para el alelo 4G presentaron los

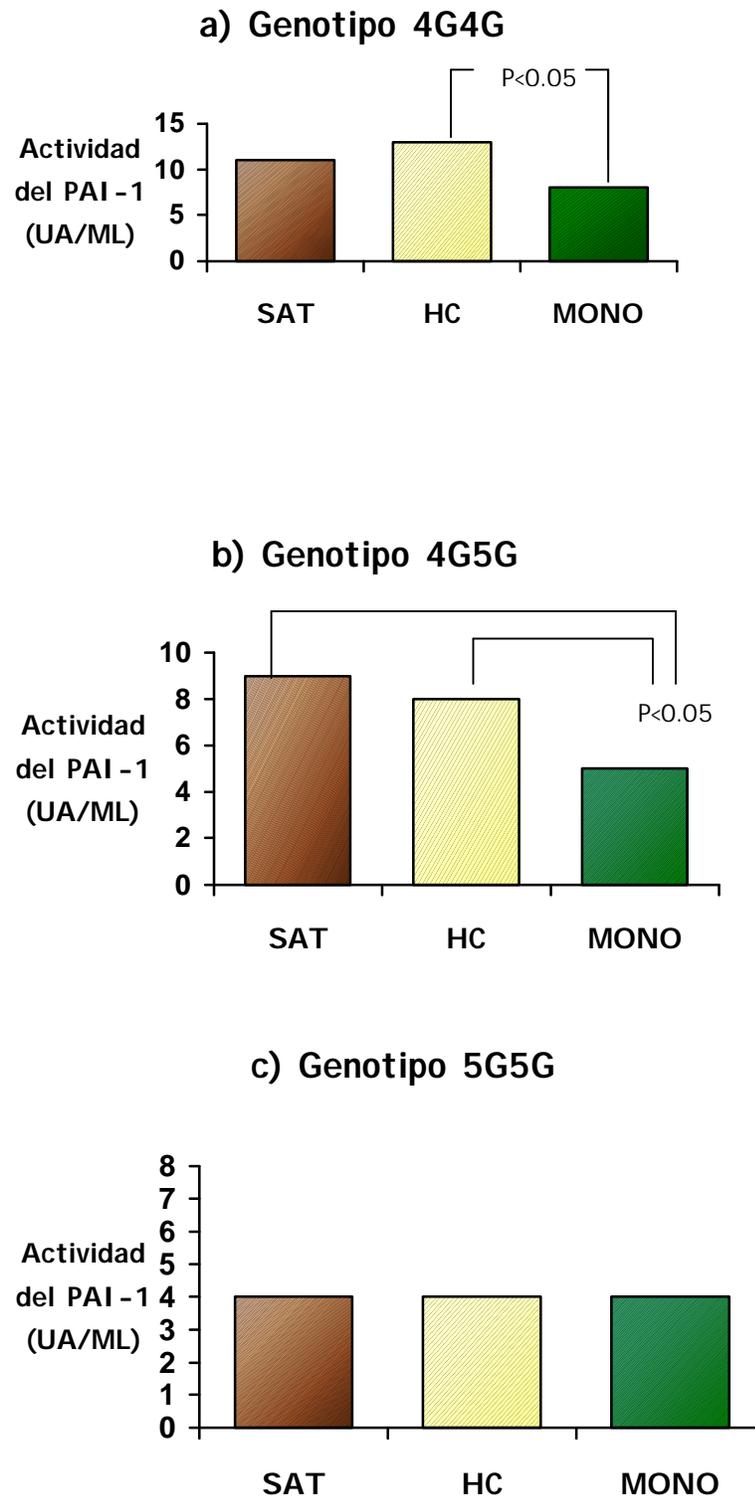
niveles más altos, los 4G5G valores intermedios, y por último los 5G5G presentaron los niveles más bajos (tabla 14).



**Figura 11:** Representación de la actividad del PAI-1 en función del Genotipo 4G5G y los tres periodos de alimentación del estudio.

Los individuos con el genotipo 5G5G presentaron una actividad menor de PAI-1 ( $p < 0.02$ ), independientemente de la alimentación realizada. Los homocigotos para el alelo 4G por el contrario presentaron una mayor actividad.

Los portadores del genotipo 4G4G presentaron concentraciones más elevadas de PAI-1 antigénico en los tres periodos alimentarios. Los homocigotos para el alelo 5G presentaron cifras bajas que no se modificaron tras las distintas alimentaciones.



**Figura 12 (a,b,c):** Influencia de los distintos periodos alimentarios sobre la actividad del PAI-1 en los individuos con genotipo 4G4G (a), 4G5G (b) y 5G5G (c).  $P < 0.05$ .

En la figura 12 (a,b,c) mostramos los cambios de la actividad plasmática del PAI-1 en los distintos periodos alimentarios según los genotipos.

La alimentación rica en MONO indujo un descenso de la actividad del PAI-1 al compararla con la rica en hidratos de carbono en los portadores del genotipo 4G4G (fig 12 a). Este mismo tipo de alimentación contribuyó al descenso de la actividad de esta proteína en las personas con el genotipo 4G5G, en relación con las otras dos formas de alimentación (figura 12 b). Sin embargo la actividad del PAI-1 en los homocigotos para el alelo 5G no fue modificada por los distintos modelos alimentarios (figura 12 c).

### 3. Polimorfismo AG en la posición -844 de la región promotora del gen del PAI -1

#### a) Frecuencias de los genotipos del polimorfismo A/G del PAI -1.

Se estudió de la misma forma el polimorfismo A/G en la posición -844 de la región promotora del gen del PAI -1.

#### Distribución por genotipos

Genotipo	Numero (%)
AA	14 (23%)
AG	33 (57%)
GG	12 (20%)

#### Frecuencia de alelos

Alelos	Numero (%)
Alelo A	61 (51%)
Alelo G	57 (49%)

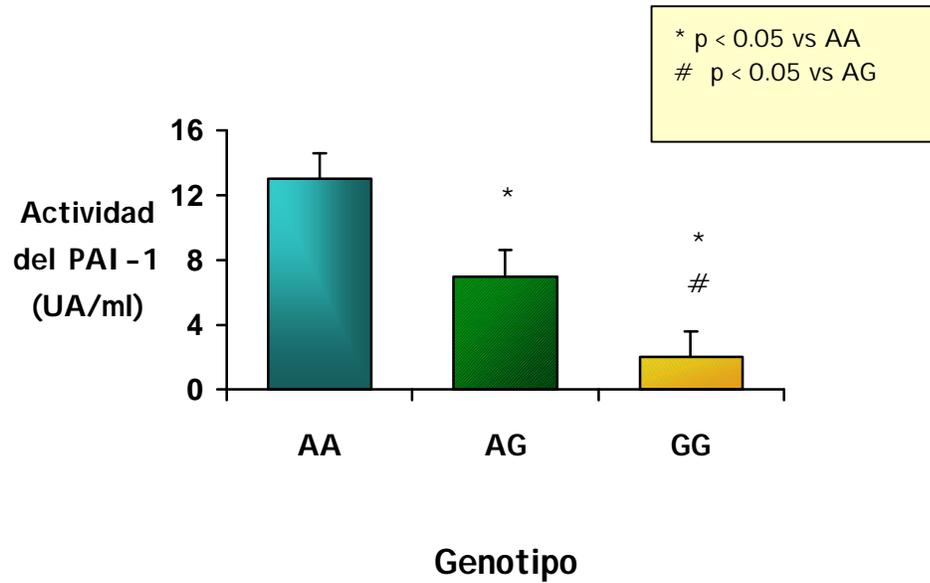
La frecuencia que obtuvimos era la esperada con relación a la encontrada en la población general. Encontramos un 23% de personas portadoras del genotipo AA, un 57 % de heterocigotos para el alelo A y un 20% de homocigotos para el alelo G.

**b) Características basales de los participantes en el estudio según el polimorfismo AG del PAI -1 en la posición -844 de la región promotora.**

	AA	AG	GG	Valor p*
Número	14	33	12	
Sexo v/m	5/9	16/17	9/3	0.61
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	21 ± 1	21 ± 0,5	22 ± 1	0.44
P. Subescapular (mm)	13 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	0.715
Tabaco	4	11	3	0.54
Colesterol T (mg/dl)	166 ± 6	163 ± 5	155 ± 5	0.53
c-LDL (mg/dl)	104 ± 5	100 ± 4	97 ± 4	0.74
c-HDL (mg/dl)	46 ± 3	51 ± 2	45 ± 2	0.18
Triglicéridos (mg/dl)	79 ± 10	59 ± 4	66 ± 8	0.07
ApoA (mg/dl)	146 ± 5	152 ± 3	147 ± 4	0.49
Apo B (mg/dl)	79 ± 10	72 ± 2	71 ± 4	0.23

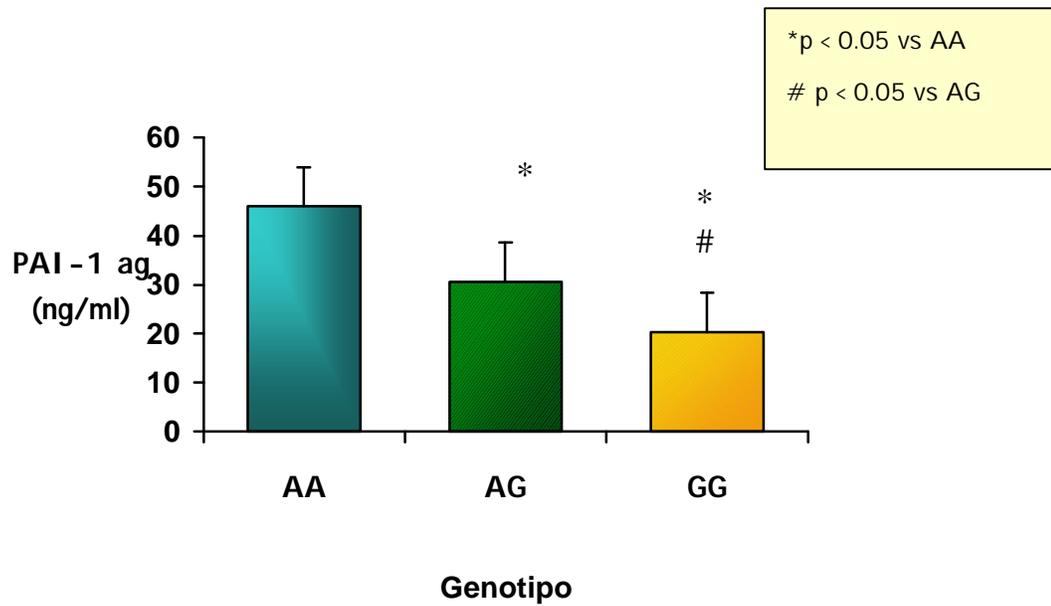
**Tabla 14:** Características basales por genotipos. \*: Anova para medidas repetidas. IMC: índice de masa corporal.

Cuando analizamos las características basales de los participantes, subclasificados en tres grupos en función del polimorfismo A/G en la posición -844 del gen del PAI -1, observamos que no existieron diferencias en los parámetros lipídicos. Tampoco encontramos diferencias en la distribución por sexos en función del polimorfismo AG.



**Figura 13:** Características basales en función del polimorfismo. Se expresa la actividad del PAI -1 (UA/ml) (Media  $\pm$  ET).

Los individuos con el genotipo AA en situación basal mostraban una actividad del PAI -1 mayor al compararlos con los portadores del alelo G. Los homocigotos para este último alelo presentaron la menor actividad de los tres grupos.



**Figura 14:** Concentración de PAI-1 antigénico en situación basal en los tres genotipos.

Los voluntarios sanos portadores del alelo A presentaban una concentración del PAI-1 significativamente mayor al compararlos con los homocigotos para el alelo G ( $p=0.015$ ).

**c) Concentraciones de lípidos y lipoproteínas según el polimorfismo AG tras los tres periodos alimentarios.**

Genotipo	Alimentación	CT	c-LDL	c-HDL	TGL	ApoA	ApoB
AA	SAT	165 ± 5	104 ± 4	46 ± 3	77 ± 9	146 ± 5	78 ± 2
	HC	143 ± 5	86 ± 4	41 ± 3	76 ± 6	137 ± 5	70 ± 2
	MONO	145 ± 5	87 ± 4	43 ± 3	77 ± 8	139 ± 5	70 ± 2
AG	SAT	163 ± 5	100 ± 4	51 ± 3	60 ± 4	151 ± 3	72 ± 2
	HC	140 ± 5	81 ± 4	46 ± 3	63 ± 5	142 ± 3	64 ± 2
	MONO	145 ± 5	84 ± 4	48 ± 3	67 ± 5	147 ± 3	66 ± 2
GG	SAT	155 ± 7	97 ± 4	45 ± 3	66 ± 8	147 ± 3	71 ± 4
	HC	139 ± 7	84 ± 6	39 ± 3	75 ± 7	136 ± 3	65 ± 6
	MONO	138 ± 5	84 ± 6	42 ± 3	61 ± 8	139 ± 3	64 ± 5
Valor p*	Genotipo	0.720	0.827	0.127	0.199	0.362	0.373
	Alimentación	0.0001	0.0001	0.0001	0.489	0.0001	0.001
	Interacción	0.325	0.477	0.860	0.043	0.656	0.165

**Tabla 15 :** Concentraciones de los lípidos plasmáticos y lipoproteínas en función del genotipo tras las distintas dietas. \* Anova para medidas repetidas. Media ± ET. CT: colesterol total. TGL: triglicéridos.

El polimorfismo A/G en la posición -844 de la región promotora no influyó en los cambios de los lípidos plasmáticos y apolipoproteínas tras las dietas. A pesar de ello encontramos una interacción en los triglicéridos entre el genotipo y el tipo de alimentación recibida ( $p < 0.043$ ).

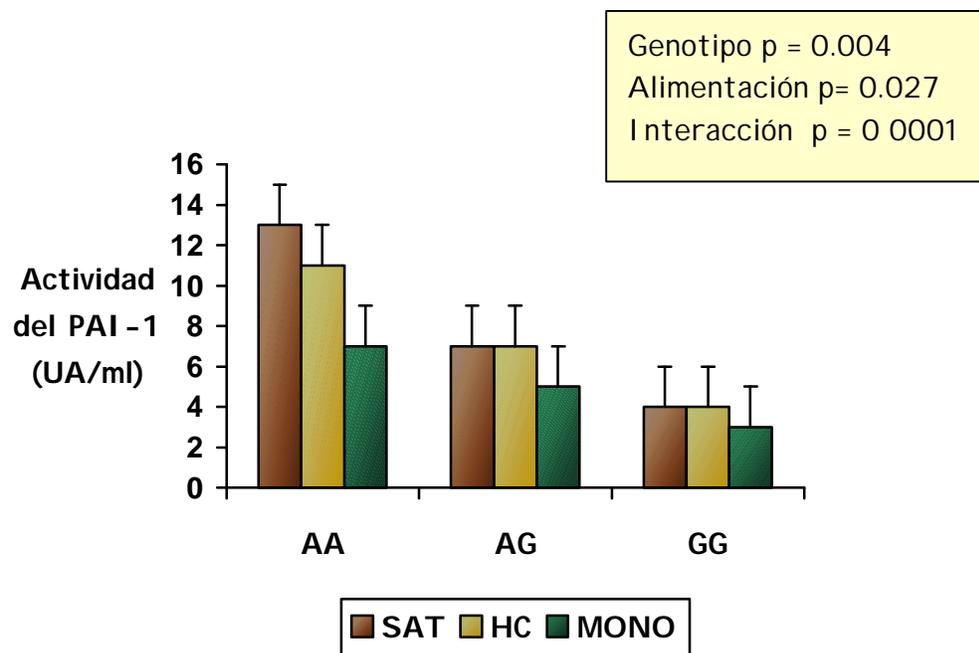
**d) Influencia de la alimentación sobre el PAI-1 según el polimorfismo -844 AG.**

En este momento dividimos a las personas según el polimorfismo -844 AG de la región promotora del PAI-1, y analizamos las modificaciones que se inducían tras los distintos periodos del estudio sobre la actividad del PAI-1 y la concentración del PAI-1 antigénico.

Genotipo	Alimentación	PAI-1 act (UA/ml)	PAI-1 ag (ng/ml)
AA	SAT	12 ± 2	53 ± 8
	HC	11 ± 1	33 ± 3
	MONO	7 ± 1	40 ± 5
AG	SAT	7 ± 1	47 ± 4
	HC	7 ± 1	36 ± 5
	MONO	5 ± 1	27 ± 4
GG	SAT	4 ± 1	34 ± 6
	HC	4 ± 1	30 ± 4
	MONO	3 ± 1	27 ± 4
Valor p*	Genotipo	0.004	0.09
	Alimentación	0.027	0.05
	Interacción	0.027	0.0001

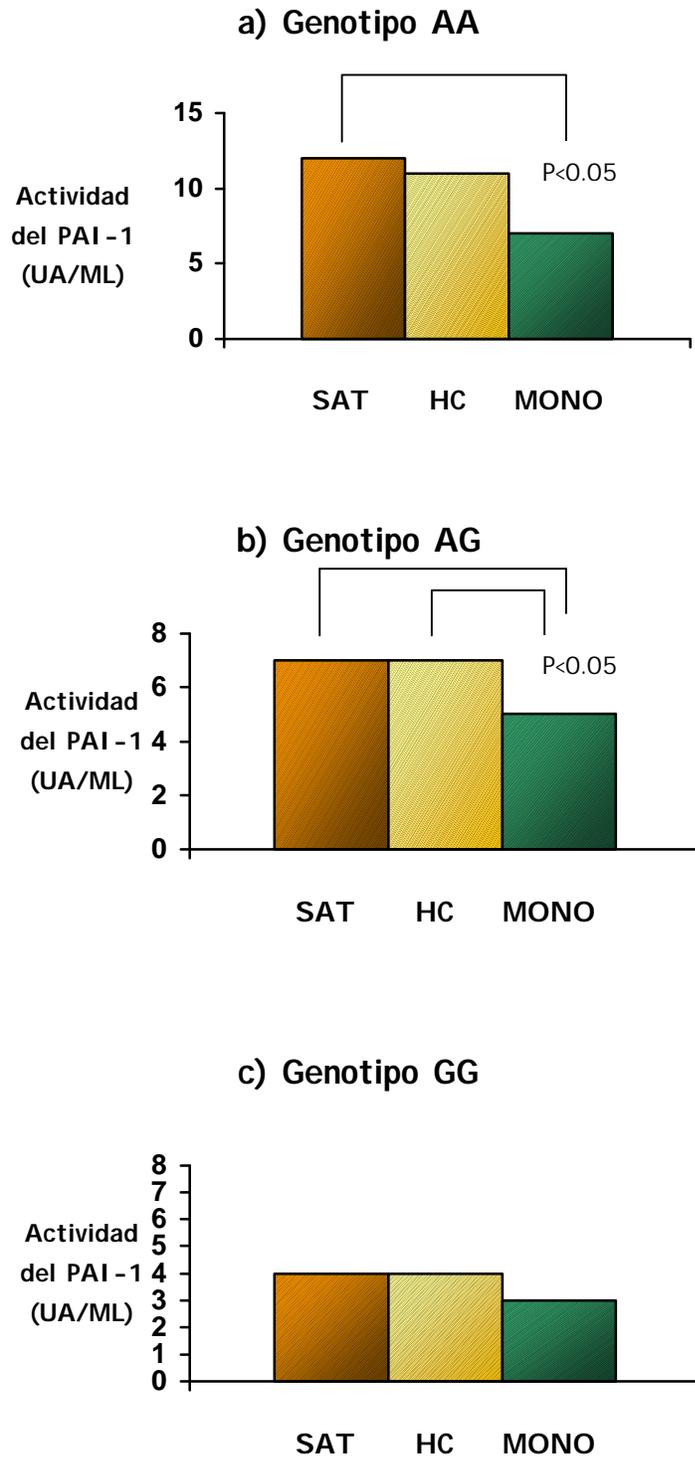
**Tabla 16:** Actividad del PAI-1 y PAI-1 antigénico en las distintos periodos alimentarios y en función del polimorfismo A/G. \* : Anova para medidas repetidas media ± ET.

Observamos que existía una influencia del genotipo en la expresión del PAI -1 de forma, que los individuos con el genotipo AA presentaron los niveles más elevados de PAI -1, los homocigotos para el alelo G concentraciones más bajas y los individuos con el genotipo AG presentaban niveles intermedios. Tanto la alimentación como el genotipo influyen en la expresión de la actividad del PAI -1, existiendo una interacción significativa entre ellos.



**Figura 14:** Modificaciones de la actividad del PAI -1 en función del genotipo en las tres dietas.

A continuación en la figura 15 (a,b,c) mostramos una distribución en tablas de la concentración plasmática del (PAI -1 Ag) y la actividad del PAI -1.



**Figura 15:** Influencia de los distintos periodos alimentarios sobre la actividad del PAI-1 en los individuos con genotipo AA (a), AG (b) y GG (c).  $P < 0.05$ .

La alimentación MONO indujo un descenso de la actividad del PAI -1 al compararla con la SAT en los portadores del genotipo AA (fig 15 a). Este mismo tipo de nutrición contribuyó al descenso de la actividad de esta proteína en las personas con el genotipo AG, en relación con las otras dos formas de alimentación (figura 15 b). Sin embargo la actividad del PAI -1 en los homocigotos para el alelo G no fue modificada por los distintos modelos alimentarios (figura 15 c).

#### 4. Test de supresión de insulina con somatostatina.

##### 4.1. Glucemias Basales

En la tabla 17 presentamos los niveles de glucosa basales tras cada uno de los periodos de intervención dietética. La modificación de la grasa no indujo cambios en las glucemias basales ( $p=0,75$ ) de los individuos del estudio.

	SAT	HC	MONO	Valor p*
<b>GLUCOSA (mg/dl)</b>	87 ± 1	86 ± 1	86± 1	0.75

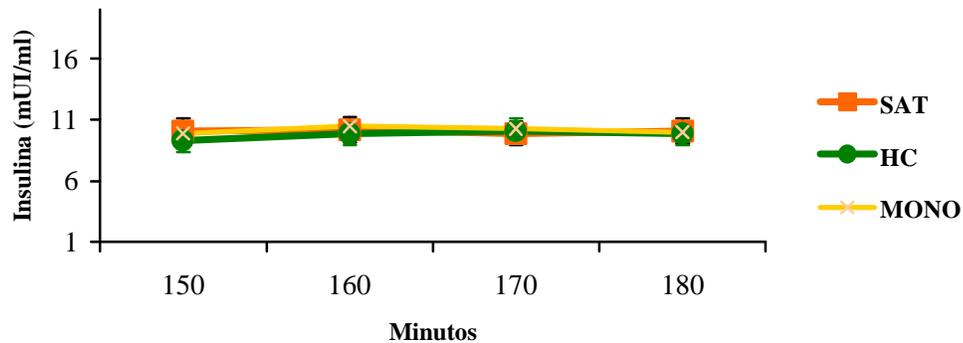
**Tabla 17.** Glucosa basal (mg/dl) tras cada periodo alimentario. Expresado como media ± ET. \* Anova para medidas repetidas.

##### 4.2 Test de resistencia a la insulina

Al final de cada uno de los tres periodos de intervención dietética se determinó la respuesta periférica a la acción de la insulina mediante el test de supresión de insulina con somatostatina,

A partir de 150 minutos de iniciado el test conseguimos el estado de equilibrio para la glucosa, en el cual, los valores de glucosa se mantuvieron constantes. La media de glucosa e insulina de las cuatro últimas determinaciones se utilizan para calcular las concentraciones de glucosa e insulina en estado de equilibrio. Dado que en esta situación los niveles plasmáticos de insulina se mantienen constantes, la concentración de glucosa

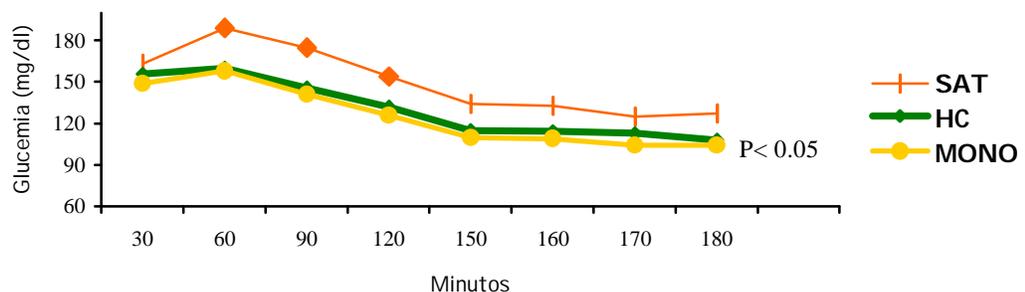
en el estado de equilibrio constituye una medida de la sensibilidad a la insulina (figura 16). De este modo cuanto mayor sea la concentración de glucosa en estado de equilibrio, mayor resistencia a la insulina tendrá el individuo en cuestión y al contrario.



**Figura 16:** Niveles de insulina en estado de equilibrio durante los últimos minutos del test de supresión con Insulina- Somatostatina, realizado tras cada periodo del estudio.

#### 4.3 Glucemia durante el test de supresión de Insulina

A continuación en la figura 17 mostramos las glucemias durante el test de resistencia a la insulina.



**Figura 17:** Niveles de glucosa media en estado de equilibrio durante el test de supresión de insulina tras el consumo de las distintas alimentaciones.

	SAT	HC	MONO	Valor P*
Glucosa media (Mg/dl)	128± 8	110 ± 6 <sup>a</sup>	107 ± 6 <sup>a</sup>	0.005

**Tabla 18:** Glucosa media tras realizar el test de resistencia a la insulina en los tres periodos alimentarios. Expresado como media ± ET. \*Anova para medidas repetidas. a:  $p < 0.05$  vs SAT.

La glucosa media en estado de equilibrio fue significativamente mayor tras el consumo de una alimentación rica en grasa saturada comparada con la obtenida tras una rica en hidratos de carbono o en grasa monoinsaturada (tabla 18).

### 5. Correlaciones entre lípidos plasmáticos y actividad del PAI -1.

En la tabla 19 mostramos la correlación de la actividad del PAI -1 con las concentraciones de lípidos y apolipoproteínas plasmáticas. También indicamos la correlación con la glucosa media tras el test de supresión de insulina con somatostatina, como marcador de resistencia a la insulina, y el pliegue subescapular, como indicador de adiposidad.

Correlaciones		R	P
<b>Actividad del PAI -1</b>	Apo A	-0.192	0.006
	Apo B	0.205	0.003
	Colesterol Total	0.150	0.024
	c-LDL	0.155	0.020
	c-HDL	0.032	0.338
	Triglicéridos	0.088	0.125
	Glucosa media	0.195	0.009
	P. subescapular	0.281	0.003

**Tabla 19:** Correlaciones entre el PAI -1 y los lípidos, lipoproteínas plasmáticas y glucosa media tras el test de supresión con Insulina. Correlación de Spearman. P subescapular: pliegue subescapular.

Observamos que existía una correlación positiva entre la actividad del PAI -1 y la concentración de colesterol total, c-LDL y apo B. También fue positiva la correlación con la concentración media de glucosa tras el test de resistencia a la insulina. Sin embargo se demuestra una correlación negativa entre la actividad del PAI -1 y la concentración de apo A1. Utilizamos la media del pliegue subescapular como medida de adiposidad, y obtuvimos una correlación positiva entre éste y la actividad del PAI -1.

## 6. Análisis de Regresión Múltiple

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente beta	Múltiple R <sup>2</sup>	Cambio R <sup>2</sup>	Valor de p
PAI -1 actv	Glucosa media	0.05	0.018	0.012	0.082
	Apo A1	-0.38	0.075	0.06	0.005
	Apo B	0.09	0.036	0.030	0.602
	C-HDL	0.19	0.004	-0.006	0.01
	Triglicéridos	0.02	0.016	0.011	0.092
	P. Subescapular	0.240	0.070	0.072	0.001
	Polimorfismo AG	-0.27	0.119	0.114	0.005
	Polimorfismo 4G5G	-0.22	0.139	0.134	0.001

**Tabla 28:** Análisis de Regresión Múltiple.

En la tabla 28 se muestra el análisis de regresión múltiple utilizando como variable dependiente la actividad del PAI-1 y como variables independientes la medida del pliegue subescapular, la glucosa media, la apo A, apo B, c-HDL, triglicéridos y los genotipos de la región promotora del gen del PAI-1 el 4G5G en la posición -675 y el AG en la posición -844. Observamos que las variables predictoras de la actividad del PAI-1 fueron fundamentalmente los polimorfismos 4G/5G y el A/G. De ellos, el primero predice un 13% de la variabilidad de la actividad del PAI-1, y el segundo un

11%. Además contribuyen a la expresión de la actividad del PAI -1 el c-HDL, y la apo A1, en un 0.6% y 6% respectivamente. El pliegue subescapular como indicador de obesidad central se ha introducido también en el análisis, explicando un 7% de la variabilidad de la actividad del PAI -1.

## **V. DISCUSIÓN.**



EL PAI -1 es el principal inhibidor de la fibrinólisis y está implicado en diferentes procesos fisiológicos del organismo, como es la angiogénesis, la fertilización, la reparación de heridas, la carcinogénesis y la proliferación celular<sup>239</sup>. Quizás de ellos el más interesante, desde el punto de vista de la aterotrombosis, es su participación en la fibrinólisis. Se conocen distintos moduladores de la secreción del PAI -1, de los cuales uno de los más importantes es la insulina. Los componentes del síndrome de resistencia a la insulina, así como otros factores como el sedentarismo, el stress y el consumo de alcohol y tabaco se han relacionado con la producción de PAI -1. En nuestro trabajo estudiamos, en un primer lugar, las variaciones inducidas en las cifras de PAI -1 por tres alimentaciones distintas. Posteriormente, estudiamos los cambios debidos a las diferentes dietas en la sensibilidad periférica a la insulina, y estudiamos si existía relación entre ambos. También analizamos las cifras del PAI -1 según los polimorfismos de la región promotora del gen de esta proteína, para demostrar la influencia de la genética en los niveles de PAI -1 y su relación con los cambios en la alimentación.

Nuestro estudio, que puede definirse como cuasi-experimental, consistió en una intervención dietética sobre un grupo de personas, con un detallado plan de controles para garantizar su fiabilidad. Todos los voluntarios que participaron en él siguieron el mismo tipo de alimentación rica en grasa saturada durante el primer período, posteriormente, de forma aleatorizada y cruzada, se continuó con una alimentación rica en grasa monoinsaturada y con otra rica en hidratos de carbono. La comida

---

<sup>239</sup> Sprengers ED, Kluft C. **Plasminogen Activator Inhibitors**. Blood 1987;69:381-387.

del almuerzo y la cena fue administrada en una sala del Hospital Reina Sofía de Córdoba bajo nuestra supervisión y la de un dietista del equipo. El desayuno y la merienda fueron consumidos por los participantes, según nuestras instrucciones, en las cafeterías de las facultades de Medicina y Ciencias de Córdoba. El trabajo se realizó entre los meses de Enero y Abril para minimizar los efectos estacionales y la tensión académica. Cada uno de los participantes disponía de un diario personal, para anotar todos aquellos acontecimientos que pudiesen afectar el seguimiento del estudio. Todas las demás exigencias de un buen estudio están recogidas en este trabajo. El cálculo del tamaño muestral se determinó de acuerdo a la variable principal (variaciones de la actividad del PAI -1). Se escogieron tanto varones como mujeres sanos, con un IMC medio de 23 y 20 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Además, se instruyeron para que mantuviesen constante su estilo de vida, a lo largo de todo el estudio. Como se sabe, los cambios en el peso corporal también influyen en la cuantificación de lípidos plasmáticos<sup>240,241</sup>, y en las características cualitativas de las lipoproteínas. Por ello se ajustó individualmente la ingesta calórica de cada participante, para mantenerla constante, de forma que no hubo diferencias significativas en los diferentes periodos dietéticos. Para el diseño de cada periodo se emplearon alimentos comunes, evitando el uso de fórmulas preparadas. De esta forma el tipo de alimentación fue muy parecida a la que habitualmente se consume en nuestro medio. El contenido de colesterol

---

<sup>240</sup> Dattilo Am, Kris-Etherton PM. **Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis.** Am J Clin Nutr 1992;56:320-328.

<sup>241</sup> Katzel LI, Krauss RM, Goldberg AP. **Relationship of plasma TG and HDL-c concentrations to body composition and plasma insulin levels are altered in men with small low density lipoprotein particles.** Arterioscler Thromb 1994;14:1121-1128.

se mantuvo constante. Por último, los resultados se ajustaron a los objetivos deseados.

Cuando analizamos a todos los participantes globalmente, observamos la influencia del diferente contenido y tipo de grasa sobre el perfil lipídico. Nuestros resultados son similares a los estudios previos<sup>242</sup>, ya que la alimentación rica en hidratos de carbono y la rica en grasa monoinsaturada descendieron las cifras de CT, c-LDL y apo B, en relación con la rica en grasa saturada. La influencia de estas dos dietas, rica en hidratos de carbono y Mediterránea, sobre el c-HDL y los triglicéridos fue diferente. Tras administrar la dieta Mediterránea no se produjo un descenso mayor en las concentraciones plasmáticas de triglicéridos comparada con la saturada. La alimentación rica en hidratos de carbono indujo un descenso de la concentración de c-HDL en plasma, lo que podría amortiguar el efecto beneficioso de este tipo de nutrición. Sin embargo, tras la dieta Mediterránea, observamos mayores niveles de c-HDL en relación con las obtenidas tras la rica en hidratos de carbono. Este hecho, observado también por otros autores<sup>243,244</sup>, es una de los pilares básicos sobre los que se apoya el potencial beneficio de la alimentación rica en grasa monoinsaturada, frente la rica en hidratos de carbono, de forma que globalmente la alimentación Mediterránea induciría un perfil lipídico menos aterogénico.

---

<sup>242</sup> Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, et al. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** *Atherosclerosis* 1999; 145: 351-358.

<sup>243</sup> Grundy SM. **Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol.** *N Engl J Med* 1986; 314: 745-748.

<sup>244</sup> Katan M, Grundy S, Willet W. **Should a low-fat high-carbohydrates diet be recommended for everyone beyond the low fat diet.** *N Eng J Med* 1999; 337: 562-567

Al finalizar cada uno de los tres períodos de intervención, se determinaron la actividad y la concentración antigénica del PAI-1. Para ambos se empleó una técnica basada en un análisis de ELISA, manteniendo constantes la temperatura y el tiempo de análisis. Las muestras se manejaron con sumo cuidado, para evitar la contaminación por plaquetas, las cuales son una fuente importante de almacén de PAI-1. La determinación de PAI-1 funcional (actividad) detecta PAI-1 activo libre, mientras que la de PAI-1 antigénico mide PAI-1 activo libre, el inactivo latente y también el incorporado a los complejos formados con t-PA o u-PA.

La influencia de los ácidos grasos de la dieta, sobre el sistema fibrinolítico, está descrita en numerosos trabajos, aunque los resultados no siempre son concordantes, dependiendo fundamentalmente del diseño. Con relación a los ácidos grasos saturados, por lo general los estudios demuestran que ejercen una influencia negativa, al incrementar las cifras de PAI-1<sup>245,246,247</sup>. Fundamentalmente se ha observado este efecto con las dietas ricas en ácido palmítico<sup>248</sup>.

Los hallazgos de los estudios, que analizan la acción de los ácidos grasos poliinsaturados sobre la fibrinólisis, son más dispares. Mehta et al<sup>249</sup> reportan que la toma de aceite de pescado causa una disminución de la

---

<sup>245</sup> Avellone G, Di Garbo V, Cordova R, Scaffidi L, Bompiani GD. **Effects of mediterranean diet on lipid, coagulative and fibrinolytic parameters in two randomly selected population samples in western Sicily.** Nutr Metab Cardiovasc Dis 1998;8: 287-296

<sup>246</sup> López- Segura F, Velasco F, López-Miranda J, Castro P, López Pedrera R, et al. **Monounsaturated Fatty Acid-Enriched Diet Decreases Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type 1.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; 16:82-88

<sup>247</sup> Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, et al. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** Atherosclerosis 1999; 145: 351-358.

<sup>248</sup> Temme EHM, Mensik RP, Hornstra G. **Effect of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on blood coagulation and fibrinolysis.** Thromb Haemost 1999; 81: 259-263.

<sup>249</sup> Mehta J Lawson D, Saldeen TJ. **Reduction in plasminogen activator inhibitor- 1 (PAI-1) with omega-4 polyunsaturated fatty acid (PUFA) intake.** Am heart J 1988;116:1201-1206

actividad del PAI-1, que es paralela al descenso de los triglicéridos, mientras que Schmidt et al<sup>250</sup> observan un aumento dosis-dependiente de su actividad y un descenso de los triglicéridos, durante el tratamiento con aceite de pescado. Sin embargo, otros trabajos no demuestran influencia alguna de la alimentación rica en n-3, aunque si observan un aumento de la actividad del PAI-1, junto con un incremento de las cifras de triglicéridos, tras la suplementación con n-6<sup>251</sup>.

Los estudios que determinan el efecto de la dieta rica en grasa monoinsaturada sobre la fibrinolisis, son más homogéneos. La mayoría demuestran que la alimentación Mediterránea, rica en ácidos grasos monoinsaturados, produce un descenso en la actividad del PAI-1<sup>252,253</sup>. En estudios previos, realizados por nuestro grupo, analizamos la influencia de la dieta rica en aceite de oliva sobre las concentraciones de PAI-1 en varones jóvenes sanos. Observamos que dicha dieta disminuía las cifras de PAI-1, con relación a las obtenidas tras una dieta saturada<sup>254</sup>, o una rica en hidratos de carbono<sup>255</sup>. Los cambios observados en la actividad se correlacionaron positivamente con los de las concentraciones de insulina<sup>254,255</sup>. Además la alimentación Mediterránea produjo una

---

<sup>250</sup> Schimdt EB, Varming K, Ernst E, Madsen P, Dyerberg J. **Dose-response studies on the effect of w3 polyunsaturated fatty acids on lipids and haemostasis.** Thromb Haemost 1990; 63:1-5

<sup>251</sup> Toft I, Bonna KH, Ingebretsen OC, Nordoy A, Jenssen T. **Fibrinolytic function after dietary supplementation with omega 3 polyunsaturated fatty acids.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 814-819.

<sup>252</sup> Avellone G, Di Garbo V, Cordova R, Scaffidi L, Bompiani GD. **Effects of mediterranean diet on lipid, coagulative and fibrinolytic parameters in two randomly selected population samples in western Sicily.** Nutr Metab Cardiovasc Dis 1998; 8: 287-296.

<sup>253</sup> Temme EHM, Mensik RP, Hornstra G. **Effect of diets enriched in lauric, palmitic or oleic acids on blood coagulation and fibrinolysis.** Thromb Haemost 1999; 81: 259-263.

<sup>254</sup> Pérez-Jiménez F, Castro P, López-Miranda J, Paz-Rojas E, Blanco A, López-Segura F, Velasco F, Marín C, Fuentes F, Ordovas JM. **Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat.** Atherosclerosis 1999; 145: 351-358.

<sup>255</sup> López-Segura F, Velasco F, López-Miranda J, Castro P, López Pedrera R, Blanco A, Jiménez-Pereperez J, Torres A, Trujillo J, Ordovas JM, Pérez-Jimenez F. **Monounsaturated Fatty Acid-Enriched Diet Decreases Plasma Plasminogen Activator Inhibitor Type 1.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996; 16: 82-88.

disminución de las cifras plasmáticas de factor von Willebrand y del inhibidor del factor tisular. Los resultados que hemos obtenidos en este trabajo, realizado en hombres y mujeres jóvenes sanos, son similares a los de los dos previos. La actividad del PAI-1 fue menor tras la alimentación Mediterránea, en comparación con la saturada y la rica en hidratos de carbono. El PAI-1 antigénico fue menor tanto tras la alimentación Mediterránea como la rica en hidratos de carbono, respecto al observado tras la enriquecida en grasa saturada. El descenso de la actividad del PAI-1 se correlacionó positivamente con las modificaciones de las concentraciones de colesterol total, c-LDL y Apo B y negativamente con las de Apo A-1.

El mecanismo, a través del cual los ácidos grasos de la dieta modulan la secreción de PAI-1, está por dilucidar. Existen, sin embargo, numerosas hipótesis sobre el mismo. Se conoce que las VLDL inducen la secreción de PAI-1, en cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano<sup>256</sup>. Recientemente se ha descrito una zona respondedora a la acción de las VLDL, en el gen del PAI-1, que mediaría la transcripción inducida por estas lipoproteínas<sup>257</sup>. Este factor de transcripción, VLDL-inducible (VLDLRE), se localizaría entre los residuos -672 y -657 de la región promotora, y su actividad se ve influenciada por el polimorfismo 4G/5G, localizado adyacente a esa región. Los trabajos que analizan el efecto de los ácidos grasos sobre la secreción de PAI-1 en cultivos de células endoteliales,

---

<sup>256</sup> Stiko-Rahm A, Wiman B, Hamsten A, Nilsson J. **Secretion of endothelial cells activator inhibitor-1 from cultured human umbilical endothelial cells is induced by very low density lipoprotein.** *Arteriosclerosis* 1990; 10:1067-1073.

<sup>257</sup> 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.

demuestran que el palmítico y el esteárico no la modifican<sup>258</sup>. Sin embargo, tanto el ácido oleico, como el linoleico, el linolénico y el ecosapentanoico incrementan el RNAm y la secreción del PAI-1 por estas células. El linoleico y el ecosapentanoico aumentaron también la transcripción de este factor. La región del gen, que responde a estos ácidos grasos, coincide con la zona del gen VLDL-sensible, previamente descrita. Esta sería una de las vías a través de la cual los ácidos grasos modularían la secreción del PAI-1, aunque otros factores deben de influir sobre ella, ya que los resultados de los estudios "in vivo"<sup>259</sup> comentados anteriormente no coinciden con los obtenidos "in vitro".

La dieta Mediterránea, rica en aceite de oliva influye positivamente sobre las cifras de lípidos plasmáticos, la oxidación de las lipoproteínas, la función endotelial y los factores incluidos en el síndrome de resistencia a la insulina. Estos factores pueden ser determinantes de las cifras de PAI-1. En el estudio PRIME<sup>260</sup> (Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction), realizado en 10.000 hombres sanos, el 23 % de la variabilidad del PAI-1 dependía de los parámetros de este síndrome (IMC, índice cintura-cadera, triglicéridos, c-HDL, actividad física y diabetes). Como veremos más adelante, la alimentación Mediterránea va a modificar, de acuerdo con estudios previos, algunos de los componentes que

---

<sup>258</sup> Nilsson L, Banfi C, Diczfalusy U, Tremoli E, Hamsten A, et al. **Unsaturated fatty acids increase plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells.** *Arterioscler thromb vasc Biol* 1998;18:1679-1685.

<sup>259</sup> Grant PJ, Kruiyhof EKO Felley CP, Felber JP, Bachman F. **Short term infusions of insulin, triacylglycerol and glucose do not result in elevation of plasma plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in man.** *Clin Sci* 1990; 79: 513-516.

<sup>260</sup> Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, Evans A, Luc G, Ferreires J et al. **Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10500 male participants in a prospective study of myocardial infarction. The PRIME Study.** *Thromb Haemost* 1998; 80 : 749-757.

determinan la resistencia a la insulina, modulando de forma indirecta la secreción de PAI -1.

A pesar de que se ha demostrado en varios trabajos la relación existente entre el PAI -1 y el índice de masa corporal<sup>261,262</sup> y los triglicéridos<sup>263</sup>, en el nuestro no la hemos constatado. Una explicación para ello es que en la mayoría de los estudios existe una gran variabilidad en los valores de los triglicéridos, y algunos están realizados en personas con hipertrigliceridemia<sup>264,265</sup>. Por el contrario, los participantes en el nuestro eran voluntarios sanos no obesos, con niveles basales de triglicéridos normales. Aunque los varones tenían cifras de triglicéridos mayores que las mujeres, no existieron diferencias en la concentración basal de PAI -1 entre ambos grupos. No encontramos la relación que previamente se ha descrito en otros trabajos entre el IMC y el PAI -1, quizás porque en nuestro estudio todos los participantes tenían un IMC <28 kg/m<sup>2</sup>, y en dichos niveles el IMC es un criterio poco discriminativo de adiposidad.

La distribución de la grasa es un hecho importante a considerar en la relación entre la regulación del PAI -1 y el síndrome de resistencia a la insulina. Hay dos tipos de distribución de la grasa, el central o visceral y el

---

<sup>261</sup> Mavri A, Stregna M, Krebs M, Sentoenik J, Geiger M, et al. **Impact of adipose tissue on plasma plasminogen activator inhibitor-1 in dieting obese women.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1582-1593.

<sup>262</sup> 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.

<sup>263</sup> 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.

<sup>264</sup> Zitoun D, Bara L, Basdevant A, Samama MM. **Levels of factor VIIc Associated with decreased tissue factor pathway inhibitor ad increased plasminogen activator inhibitor-1 in dyslipidemias.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 77-81.

<sup>265</sup> Zambrana JL, Velasco F, Castro P, Concha M, Valles F, et al. **Comparision of bezafibrate versus lovastatin for lowering plasma insulin, fibrinogen, and plasminogen activator inhibitor-1 concentrations in hyperlipemic heart transplant patients.** *Am J Cardiol* 1997;80:836-840.

genitofemoral o periférica. La obesidad central, con acumulo de grasa visceral, es característica del síndrome de resistencia a la insulina. Se sabe que, en el hombre, el tejido adiposo sintetiza PAI -1, y que la grasa visceral produce más PAI -1 que la subcutánea<sup>266</sup>. Por este motivo, analizamos las cifras de PAI -1 con relación a los parámetros indicadores de obesidad central, como la medida del pliegue subescapular. Encontramos una correlación entre PAI -1 y pliegue subescapular, apoyando la idea de que existe una interrelación entre los factores que integran el síndrome de resistencia a la insulina<sup>267,268</sup> y la regulación del PAI -1.

Uno de los métodos más utilizados para estudiar la sensibilidad a la insulina, es el test de supresión con somatostatina. Este es una modificación del primero descrito por Shen y Reaven<sup>269</sup>, quienes consiguieron un estado de equilibrio exógeno, de glucosa e insulina, durante la inhibición farmacológica de la secreción de insulina y de la producción de glucosa, mediante la administración de insulina, propranolol y epinefrina. La concentración de glucosa plasmática, en el estado de equilibrio, resultante de la infusión de glucosa, es una medición de la resistencia de los tejidos a la captación de la glucosa.

---

<sup>266</sup> Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, et al. **Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue. Possible link between visceral fat accumulation and vascular disease.** Diabetes 1997; 46: 860-867.

<sup>267</sup> Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, et al. **Increase plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients-relationship with plasma insulin.** Thromb Haemost 1989;61:370-373.

<sup>268</sup> Panahloo A, Mohamed-Ali V, Lane A, Green F, Humphries S, et al. **Determinants of plasminogen activator inhibitor 1 activity in treated NIDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor gene.** Diabetes 1995;44: 37-42.

<sup>269</sup> Shen SW, Reaven GM, Farquhar J. **Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes.** J Clin Invest 1970; 49: 2151-2160.

En nuestro estudio sustituimos la epinefrina y propranolol por somatostatina, tal y como se describe en trabajos más recientes<sup>270</sup>. La somatostatina inhibe la neoglucogénesis, la secreción endógena de insulina, el glucagón y la hormona de crecimiento (GH). Por otra parte, no interfiere en el metabolismo lipídico, como ocurre con la epinefrina que tiene acciones antilipolíticas. El test de supresión de insulina con somatostatina, proporciona una medida precisa de la sensibilidad periférica a la insulina, en comparación con la determinación de glucosa basal o tras una sobrecarga oral de glucosa. La insulina y glucosa exógenas se ajustan en todos los individuos, atendiendo a los metros cuadrados de superficie corporal. La utilización de la glucosa será proporcional a los niveles de glucosa plasmáticos. De este modo cuanto mayor sea la concentración de glucosa en estado de equilibrio, mayor resistencia a la insulina tendrá la persona en cuestión y al contrario.

En este trabajo realizamos el test de supresión de la insulina al finalizar cada período de dieta. La concentración media de glucosa fue más elevada tras la alimentación rica en grasa saturada. Este hallazgo estaría de acuerdo con estudios previos, que demostraron una relación directa entre el consumo de este tipo de grasa y la concentración de insulina en ayunas<sup>271</sup>. Además, se ha observado un aumento del riesgo de desarrollar intolerancia hidrocarbonada y diabetes tipo 2 cuando se consumían este tipo de alimentación. Nuestro grupo ha realizado un trabajo previo donde estudiamos el efecto de una alimentación Mediterránea y otra rica en

---

<sup>270</sup> Storlien LH, Pan DA, Kriketos AD, Baun LA. **High fat diet induces fat resistance. Lessons and implications from animal studies.** Ann N Y Acad Sci 1993; 683: 82-90.

<sup>271</sup> Maron DJ, Fair JM, Haskell WL. **Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease.** The Stanford Coronary Risk Intervention Project Investigators and Staff. Circulation 1991; 84: 2020-2027.

hidratos de carbono sobre el metabolismo de la glucosa “in vivo” e “in vitro”, voluntarios jóvenes sanos. Observamos que comparado con la alimentación saturada, tanto la rica en hidratos de carbono como la Mediterránea inducían una disminución de la glucosa plasmática en estado de equilibrio y un aumento en la captación de 2-deoxiglucosa por los monocitos periféricos, todo esto indica una mejoría en la sensibilidad a la insulina<sup>272</sup>. Ni en el estudio anterior, ni en el que comentamos, hemos encontrado diferencias en la concentración media de glucosa entre la alimentación Mediterránea y la rica en hidratos de carbono. Este hecho lo atribuimos a que nuestros participantes son personas sanas, sin dificultad para el manejo de los hidratos de carbono. Todos estos hallazgos indican que la mejoría de la resistencia a la insulina es otro de los efectos beneficiosos de la alimentación Mediterránea.

Se ha descrito previamente una concentración y actividad de PAI-1 superior en hombres que en mujeres, con un papel modulador de la actividad del PAI-1 por parte de las hormonas<sup>273</sup>, aunque no todos los trabajos demuestran estas diferencias<sup>274</sup>. Henry et al<sup>275</sup> estudiaron, en una población de padres e hijos, la concentración de PAI-1, y compararon la de las madres frente a los padres, y las de los hijos frente a las hijas. Encontraron que existían mayores concentraciones de PAI-1 en los varones adultos y no en los adolescentes. La razón de esto parece hallarse en concordancia con la

---

<sup>272</sup> Pérez- Jiménez F, López- Miranda J, Pinillos MD, Gómez P, Paz E, et al. **A Mediterranean and High-carbohydrates diets improve glucose metabolism in healthy males and females.** Diabetologica (En prensa)

<sup>273</sup> Gebara OCE, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, et al. **Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potencial in the Framingham offspring Study.** Circulation 1995; 91: 1952-1958.

<sup>274</sup> Eliasson M, Evrin P, Lundblad D, Asplund K, Ranby M. **Influence of gender, age, and sampling time on plasma fibrinolytic variables and fibrinogen : a population study.** Fibrinolysis 1993; 7: 316-323.

<sup>275</sup> Henry M, Tregouët DA, Alessi MC, Aillaud MF, Visvikis S, et al. **Metabolic Determinants are much more important than genetic polymorphisms in determining the PAI-1 activity and antigen plasma concentrations.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 84-91.

aparición de factores favorecedores del síndrome de resistencia a la insulina en los varones adultos. Algunos estudios han mostrado que la testosterona puede modular las cifras de PAI -1, a través de su influencia en la acumulación de la grasa, particularmente la grasa visceral<sup>276</sup>. Nuestros resultados no muestran diferencias significativas entre varones y mujeres, probablemente debido a que todos ellos eran jóvenes y no obesos.

Como se ha referido previamente, el gen del PAI -1 ha sido mapeado en el cromosoma 7, y contiene 9 exones y 8 intrones. En la actualidad se han descrito 8 polimorfismos. De éstos, se ha comprobado que el polimorfismo 4G/5G de la región promotora ejerce una influencia importante sobre las cifras de PAI -1 antigénico y su actividad. Los homocigotos para el alelo 4G (genotipo 4G/4G) tienen concentraciones plasmáticas un 25% mayores que los homocigotos para el alelo 5G (genotipo 5G/5G)<sup>277</sup>. Cuando analizamos las cifras de PAI -1 agrupando a los voluntarios según dicho polimorfismo, obtuvimos datos concordantes con los anteriores trabajos, ya que la actividad y la concentración del PAI -1 fueron superiores en los homocigotos 4G/4G (más de un 30%), intermedios en los 4G/5G y más bajos en los 5G/5G. Los estudios "in vitro" han demostrado una unión diferente de las proteínas reguladoras de la transcripción en ese lugar del gen. En este sentido, se ha comprobado que la presencia de 4 guaninas (alelo 4G) se asocia con un aumento de la transcripción, dado que al promotor sólo se uniría la proteína activadora y no la represora. Sin embargo, cuando existen 5 guaninas (alelo 5G) también se une a esta zona

---

<sup>276</sup> Sprengers ED, Kluft C. **Plasminogen Activator Inhibitors**. Blood 1987; 69: 381-387.

<sup>277</sup> Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, bavenholm P, Hamsten A. **Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor1 gene is associated with myocardial infarction**. Proc natl Acad Sci USA 1995; 92: 1851-1855.

la proteína represora, lo que disminuiría la unión del activador<sup>278</sup>. Por otra parte, otros trabajos "in vitro" demuestran un incremento en la transcripción del gen estimulado por citoquinas asociado a la presencia del alelo 4G, cuando se compara con el alelo 5G<sup>279</sup>. Además, se ha demostrado una relación más constante entre el genotipo 4G/4G y cifras más altas de PAI -1 en los sujetos con hipertrigliceridemia<sup>280</sup>, indicando una interacción específica del genotipo con el factor que determina las concentraciones de triglicéridos. Estos hallazgos han sido corroborados al identificarse una zona, en la región promotora del gen del PAI -1, que es sensible a las VLDL, localizada adyacente a la zona 4G/5G<sup>281</sup>. También se ha observado que los triglicéridos aumentan la producción de PAI -1 por los hepatocitos "in vitro", efecto que está mediado por el receptor de LDL y potenciado por la insulina<sup>282</sup>. Estos hallazgos clínicos y de laboratorio indican que el síndrome de resistencia a la insulina, a través de la acción de los triglicéridos, altera la síntesis del PAI -1.

En nuestros datos no hemos observado que los voluntarios 4G/4G, con cifras más altas de PAI -1, muestren mayores concentraciones de triglicéridos. Sin embargo, si hemos comprobado que los portadores del alelo 4G, tanto homocigotos como heterocigotos, tienen concentraciones más altas de c-LDL y de Apo B. Este hallazgo, que sólo se ha descrito

---

<sup>278</sup> Eriksson P, Kallin B, van't Hooft FM, bavenholm P, Hamsten A. **Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor1 gene is associated with myocardial infarction.** Proc natl Acad Sci USA 1995; 92: 1851-1855.

<sup>279</sup> 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.

<sup>280</sup> Sprengers ED, Kluft C. **Plasminogen Activator Inhibitors.** Blood 1987; 69: 381-387.

<sup>281</sup> 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

<sup>282</sup> Sironi L, Mussoni L, Prati L, et al. **Plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis and m RNA expression in HepG2 cells are regulated by VLDL.** Arterioscler Thromb vas Biol 1996; 16: 89-96.

anteriormente en una ocasión<sup>283</sup>, creemos que está en estrecha relación con lo anteriormente expuesto. Dado que los participantes de nuestro estudio son jóvenes sanos, con un metabolismo lipídico muy eficaz, quizás el aumento de c-LDL y Apo B reflejen un incremento del paso de VLDL a LDL, siendo estas VLDL las responsables de las mayores concentraciones de PAI -1 en nuestros voluntarios.

Otros de los aspectos que analizamos fue la posible interacción entre los factores genéticos y ambientales, determinando la relación entre los polimorfismos del PAI -1 y la respuesta a los cambios en la alimentación. Observamos que los individuos con el genotipo 4G4G presentaban concentraciones más elevadas de PAI -1 antigénico, y mayor actividad del PAI -1, tras los tres diferentes tipos de alimentación. Además, la alimentación Mediterránea si descendió las cifras de PAI -1 antigénico y su actividad. Sin embargo, en los homocigotos 5G5G no existía modificación de la actividad del PAI -1 con los cambios de la alimentación. Estas personas tiene una actividad del PAI -1 baja, independientemente de la nutrición recibida. No están muy claros los mecanismos implicados en estas modificaciones. Lo más probable es que los homocigotos 4G4G, al carecer de algunos de los mecanismos represores en la transcripción del PAI -1, sean más vulnerables a la acción de la grasa de la dieta. En este sentido, la alimentación Mediterránea ejercería un importante efecto beneficioso en estos individuos, mediante la mejoría de los factores implicados en la

---

<sup>283</sup> Song J, Yoon YM, Jung HJ, Hong SH, Park H, et al. **Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and coagulation factor VII Arg353-Gln Polymorphism in Korean patients with coronary artery disease.** J Korean med Sci 2000; 15: 146-152.

resistencia a la insulina, en la oxidación de las LDL<sup>284</sup> y en la acción de diversas citoquinas<sup>285</sup>.

El otro polimorfismo estudiado ha sido el AG en la posición -844 de la región promotora del gen del PAI-1. Hemos observado, de la misma manera que acontecía con el polimorfismo anterior, una mayor actividad y concentración de PAI-1 antigénico, en los sujetos homocigotos AA, y menores en los portadores del genotipo GG. Esta relación está menos estudiada en la literatura, aunque se sabe que este polimorfismo influye también sobre la transcripción, ya que se localiza en una secuencia de ADN de unión a una proteína *ets*, que podría estar implicada en la transcripción del gen del PAI-1<sup>286</sup>.

La respuesta a la dieta fue también marcada en los portadores del genotipo AA, en los cuales la alimentación Mediterránea descendió los valores de PAI-1 de forma importante, con relación a las otras dietas. La razón de que los resultados sean similares en los dos polimorfismos estudiados puede estar en relación con el hecho que el polimorfismo 4G/5G, en la posición -675, está en desequilibrio genético con el A/G en la posición -844 de la región promotora<sup>287</sup>.

En resumen, en este trabajo hemos confirmado que la alimentación Mediterránea, además de ejercer un amplio efecto beneficioso sobre los lípidos plasmáticos y sobre la resistencia a la insulina, disminuye las

---

<sup>284</sup> Vaisanen S, Baumstark MW, Penttila I, Bouchard C, Halonen P, et al. **Small, dense LDL particle concentration correlates with plasminogen activator inhibitor type -1 (PAI-1) activity.** *Thromb Haemost.* 1997; 78: 1495-1499.

<sup>285</sup> Cesari M, Rossi GP. **Plasminogen activator type 1 in ischaemic cardiomyopathy.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 6: 1378-1386.

<sup>286</sup> Wasyluk B, Hahn SL, Giovane A. **The Ets family of transcription factors.** *Eur J Biochem* 1993; 211:7-18.

<sup>287</sup> Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, et al. **Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 851-858.

cifras de PAI -1. Las mutaciones del promotor del gen del PAI -1, 4G/5G, y A/G en las posiciones -675 y -844, respectivamente van a favorecer un incremento en los niveles de PAI -1. Además, hacen a los portadores de dichas mutaciones, más vulnerables a los factores ambientales. En estas personas la alimentación Mediterránea contrarrestaría, en parte, ese efecto negativo del genotipo.

## **VI . CONCLUSIONES.**



## **1. CONCLUSIÓN PRINCIPAL.**

El polimorfismo 4G/5G de la región promotora del gen del PAI -1 condiciona la concentración plasmática de esta proteína (PAI -1 antigénico) así como la actividad (PAI -1 funcional). Los portadores del alelo 4G presentaron los mayores niveles de PAI -1 y una mejor respuesta a la alimentación Mediterránea. Los homocigotos para el alelo 5G presentaron baja concentración de PAI -1 independientemente de la alimentación recibida.

## **2. CONCLUSIONES SECUNDARIAS.**

2.1. La alimentación Mediterránea ejerce un efecto favorable sobre la resistencia a la insulina y esto se correlaciona con la actividad de PAI -1.

2.2. Los portadores del alelo A del polimorfismo A/G en la posición -844 del promotor del gen del PAI -1 muestran mayores valores plasmáticos de esta proteína frente a los portadores del alelo G. Sin embargo los primeros se benefician de la alimentación rica en grasa monoinsaturada al descender la concentración plasmática de PAI -1.



## **ABREVIATURAS.**



CML: células musculares lisas.

CT: Colesterol total.

DHA: Ácido docosahexanoico.

EPA: Ácido eicosapentanoico.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HTA: Hipertensión arterial.

FvW: Factor von Willebrand.

FVIIa: Factor VII activado.

FT: Factor Tisular.

HC (alimentación): Alimentación rica en hidratos de carbono.

IAM: Infarto agudo de miocardio.

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia.

IL: Interleucina.

IMC: Índice de masa corporal (peso en Kg/altura en metros<sup>2</sup>).

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

LDL-mm: LDL mínimamente modificada.

LDL-N: LDL nativa.

LDL-ox: LDL oxidada.

LPS: Lipopolisacárido bacteriano.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1.

MONO: Ácido graso monoinsaturado.

PA: Activadores del plasminógeno.

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

PBS: "Buffer" fosfato salino.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>.

POLI: Ácido graso poliinsaturado.

SAT: ácido graso saturado.

TFPI : Inhibidor de la ruta de activación del factor tisular.

TG: Triglicéridos.

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-alfa.

t-PA: Activador tisular del plasminógeno.

u-PA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad