

APROXIMACIÓ MULTIFACTORIAL AL PROCÉS DE L'ARTERIOSCLEROSI EN LA DIABETIS MELLITUS

TIPUS 2:

**Estudi conjunt de factors genètics protrombòtics
(polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries),
factors d'inflamació, factors de la matriu extracel·lular
(metaloproteïna PAPP-A) i valoració de la utilitat de
la pulsioximetria en el cribatge de l'aterosclerosi
subclínica**

Memòria presentada per

Silvia Pellitero Rodríguez

per optar al grau de DOCTOR EN MEDICINA I CIRURGIA

Treball realitzat sota la direcció de

Anna Sanmartí Sala i Jordi Lluís Reverter Calatayud

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA



FACULTAT DE MEDICINA

Barcelona, juny 2010

A Rubén, mi marido, y a mi hija Lucía.

A Gumer y Ana, mis padres.

Agraïments	9
Abreviatures	12
1. PRESENTACIÓ DE LA TESI	15
2. INTRODUCCIÓ	17
2.1. FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2	18
2.1.1. Teixit adipós i inflamació sistèmica	18
2.1.1.1 Citocines i adipocitocines estudiades.....	19
2.1.1.1.1 Interleucina-6	19
2.1.1.1.2 Factor de necrosi tumoral- α	20
2.1.1.1.3 Adiponectina	21
2.1.1.1.4 Proteïna C reactiva	22
2.1.2. Inflamació sistèmica i diabetis mellitus tipus 2	23
2.2. L'ARTERIOSCLEROSI A LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2	26
2.2.1 Aterotrombosi	27
2.2.1.1 Paper de les plaquetes a l'aterotrombosi	30
2.2.1.2 Cascada de la coagulació i fibrinòlisi	32
2.2.2 Estat protrombòtic a la diabetis mellitus tipus 2	33
2.2.2.1 Hiperglicèmia i aterotrombosi	34
2.2.2.1.1 Inhibidor de l'activador del plasminogen	35
2.2.2.1.2 Fibrinogen	35
2.2.2.2 Hiperglicèmia i disfunció endotelial	36

2.2.2.3 Alteracions plaquetàries en la DM2	37
2.2.2.3.1 Alteracions plaquetàries extrínseques en la DM2.....	38
2.2.2.3.2 Alteracions plaquetàries intrínseques en la DM2.....	39
2.3. FACTORS DE RISC GENÈTIC RELACIONATS AMB LES GLICOPROTEÏNES PLAQUETÀRIES EN EL DESENVOLUPAMENT DE TROMBOSI ARTERIAL	41
2.3.1 Glicoproteïnes de membrana plaquetària.....	42
2.3.2 Polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries	43
2.3.2.1 Polimorfisme genètic GP Ib-alfa	43
2.3.2.2 Polimorfisme genètic GP Ia/IIa	46
2.3.2.3 Polimorfisme genètic del complex GP IIb/IIIa	48
2.3.2.4 Polimorfismes plaquetaris i DM2.....	51
2.4. METALOPROTEÏNASES	53
2.4.1 Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)	53
2.5. MÈTODES DE CRIBATGE D'ATEROSCLEROSI SUBCLÍNICA	58
2.5.1 Ecografia carotídia.....	58
2.5.2 Índex turmell-braç	59
2.5.3 Pulsioximetria	60
3. HIPÒTESI DE TREBALL	61
3.1 Paper de la metaloproteïnasa PAPP-A en la DM2	62
3.2 Relació de la metaloproteïnasa PAPP-A amb l'arteriosclerosi carotídia i la morfologia de les plaques carotídies en la DM2	62

3.3. Relació dels polimorfismes de les GP implicades en l'adhesió, agregació i activació plaquetària amb el procés de l'arteriosclerosi en la DM2.....	63
3.4 Utilització de l'oximetria de pols com a mètode de cribatge d'aterosclerosi subclínica en pacients amb DM2.....	63
4. OBJECTIUS.....	64
4.1 Estudiar la relació de la metaloproteïna PAPP-A amb el control glicèmic i amb els paràmetres inflamatoris i hemostàtics en la DM2.....	65
4.2 Estudiar la relació de l'eix PAPP-A/IGF-1 amb l'arteriosclerosi carotídia en pacients amb DM2 i control glicèmic estable	66
4.3 Estudi de la distribució dels polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries Ib (receptor del factor von Willebrand), Ia/IIa (receptor del col.lagen) i Iib/IIIa en pacients afectes de DM2 en funció de la presència d'aterotrombosi arterial clínic i d'aterosclerosi carotídia subclínica, i en comparació amb controls no diabètics sense malaltia cardiovascular.....	67
4.4 Estudiar la utilitat de l'oximetria de pols i de l'índex turmell-braç com a eines de cribatge d'aterosclerosi carotídia en pacients amb DM2.....	68

5. MATERIAL I MÈTODES	70
5.1 Subjectes d'estudi	71
5.1.1 Grup control	71
5.1.2 Pacients diabètics	71
5.2 Mètodes	72
5.2.1 Dades clíniques	72
5.2.2 Dades analítiques bioquímiques i hormonals	73
5.2.3 Dades analítiques. Estudi d'hemostàsia	75
5.2.4 Estudi genètic dels polimorfismes plaquetaris	76
5.2.4.1 Polimorfisme de la GPIb-afa (VNTR).....	77
5.2.4.2 Polimorfismes de la GP Ia/IIa (807C/T i 873 G/A).....	77
5.2.4.3 Polimorfisme de la GP IIb/IIIa (PI ^{A1} /PI ^{A2}).....	78
5.2.5 Avaluació ecogràfica	79
5.3 Anàlisi estadístic	80
6. INVESTIGACIÓ I RESULTATS. ESTUDIS PUBLICATS	82
6.1. Primer estudi	83
<i>Pregnancy-Associated Plasma Protein-A levels are related to glycemic control but not to lipid profile or hemostatic parameters in type 2 diabetes</i>	
<i>Diabetes Care. 2007;30(12):3083-5</i>	
6.2. Segon estudi	84
<i>Association of the insulin-growth factor-i (IGF-I)/ Pregnancy-Associated Plasma Protein-a (PAPP-A) system and adipocytokine levels with the presence and the morphology of carotid plaques in type 2 diabetes mellitus patients with stable glycaemic control.</i>	

Eur J Endocrinol. 2009;160(6):925-32.

6.3 Tercer estudi85

Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes

Thrombosis and Haemostasis. 2010; 103: 630-637

6.4. Quart estudi86

Utilidad de la pulsioximetría en el cribado de la aterosclerosis carotídea en pacientes afectados de diabetes mellitus tipo 2

Med Clin (Barc). 2010. doi:10.1016/j.medcli.2009.11.041

7. DISCUSSIÓ CONJUNTA87

7.1 Les concentracions de la PAPP-A estan relacionades amb el control glicèmic però no amb el perfil lipídic ni amb els paràmetres hemostàtics en la DM288

7.2 L'associació de l'eix IGF-I/ PAPP-A i les concentracions d'adipocitocines amb la presència i la morfologia de les plaques carotídies en pacients amb DM2 i amb control glicèmic estable.....90

7.3 Estudi dels polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries Ib, IaIIa, IIbIIIa i la trombosi arterial i l'arteriosclerosi subclínica carotídia en la DM2.....92

7.4 Utilitat de la pulsioximetria en el cribatge de l'arteriosclerosi carotídia en pacients afectes de DM295

8. CONCLUSIONS97

Sumari

9. CONCLUSIONS FINALS100

10.BIBLIOGRAFIA102

AGRAÏMENTS

A la Dra. Anna Sanmartí, mi Jefa de Servicio y codirectora de tesis por transmitirme sus conocimientos y sobre todo, por su cariño y su apoyo humano en todos los momentos difíciles.

Al Dr. Jordi Reverter, codirector de la tesis, por haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto y por haber facilitado, apoyado mi trabajo y haberme animado en todo momento, viendo siempre el lado más positivo.

Al Dr Juan Carlos Reverter y a la Dra Dolors Tàssies, por haberme animado a introducirme en el mundo de la hemostasia y por su ayuda inestimable en el estudio genético plaquetario y en la elaboración de esta tesis.

A Yolanda, a la Dra Marisa Granada y a la Dra M. Cruz Pastor de los laboratorios hormonal y bioquímico, que me guiaron y me animaron por el mundo de las pipetas.

A la Dra. Isabel Salinas, por sus ideas y apoyo en todo momento.

A mis compañeras de Endocrinología y Nutrición, Dra Anna Lucas, Dra Eva Aguilera, Dra Nuria Alonso, Dra Berta Soldevila, Dra Clara Joaquin, Dra Eulàlia Colomé, Dra Rocío Puig y a todo el equipo de dietistas, cuya amistad me ha acompañado y animado durante todos estos años de realización de la tesis doctoral.

A la Dra Pizarro por su apoyo y colaboración.

A las enfermeras del Servicio, Maribel Cuadrado, Carmen Pérez e Isabel Ordóñez por su apoyo incondicional y su inestimable ayuda en la recogida de muestras.

A mis excompañeros de Endocrinología del Hospital Clínic, on los que inicié mi formación en esta especialidad, por haberme guiado y motivado a continuar trabajando.

A todos los médicos residentes posteriores a mí porque su presencia e ilusión son un continuo estímulo.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia, en especial a mis padres, por su apoyo y ánimos constantes ante todos los retos que he tenido en estos años y por supuesto, a Rubén y Lucía por su paciencia, apoyo y cariño.

ABREVIATURES

ACC	artèria caròtida comú
AGE	<i>advanced glycoxidation end products</i> (productes avançats de glicosilació)
DM1	diabetis mellitus tipus 1
DM 2	diabetis mellitus tipus 2
DS	desviació estàndard
FvW	factor von Willebrand
GP	glicoproteïna
HDL-c	colesterol lligat a lipoproteïnes d'alta densitat
HTA	hipertensió arterial
IC	interval de confiança
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (molècula d'adhesió intercel·lular)
IGFBP4	<i>insulin-like growth factor binding</i> (proteïna d'unió del factor de creixement similar a la insulina tipus 4)
IGF-I	<i>insulin-like growth factor 1</i> (factor de creixement similar a la insulina tipus 1)
IL	interleucina
IMC	índex de massa corporal
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> (proteïna quimiotàctica dels macròfags tipus 1)
MMP	metal·loproteïnasa
NFκβ	<i>nuclear factor κβ</i> (factor nuclear de transcripció kappa beta)
OR	<i>odds ratio</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor</i> (inhibidor de l'activador del plasminògen)

PAPP-A	<i>pregnancy - associated plasma protein-A</i> (proteïna plasmàtica tipus A associada a la gestació)
PCR	proteïna C reactiva
PCRus	proteïna C reactiva ultrasensible
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> (factor de creixement derivat de les plaquetes)
ProBMP	proteïna bàsica major eosinofílica
RCP	reacció en cadena de la polimerasa
SaO ₂	saturació de oxigen
TG	triglicèrids
TGF-β ₁	<i>transforming growth factor beta-1</i> (factor de creixement i transformació beta-1)
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i> (factor de necrosi tumoral-α)
TNFR	receptor del TNF-α
TX	tromboxà
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i> (molècula d'adhesió vascular)
VNTR	<i>variable tandem number repeats</i> (número variable de repeticions)

1. PRESENTACIÓ DE LA TESI DOCTORAL

Aquesta tesi es presenta en forma de compendi de publicacions segons la normativa aprovada per la Comissió de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona.

El seu nucli principal són articles originals que han estat publicats en revistes en les que el doctorand es el primer signant de tots ells.

Aquests articles intenten fer una aproximació al procés de l'aterosclerosi i de l'aterotrombosi a la diabetis mellitus tipus 2. Per això, hem estudiat en un grup de pacients diabètics, la relació de l'aterotrombosi i l'aterosclerosi carotídia amb els polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries, amb les citocines, i amb l'eix IGF-I i la metalloproteïna PAPP-A. També hem avaluat en el mateix grup de pacients, la utilitat de la pulsioximetria com a mètode de cribatge d'aterosclerosi.

Aquest estudi ha estat finançat per l'Ajut a la Recerca Gonçal Lloveras de la Societat Catalana de Diabetis, l'anys 2005 (investigador principal Dr. Jordi Lluís Reverter Calatayud). Aquest ajut va ser concedit per recomanació de l'AGAUR (Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca).

2. INTRODUCCIÓ

2.1 FISIOPATOLOGIA DE LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

2.1.1 Teixit adipós i inflamació sistèmica

La diabetis mellitus tipus 2 (DM 2) és una malaltia crònica heterogènia caracteritzada per un estat de resistència a la insulina associat a un defecte funcional de les cèl·lules beta pancreàtiques. Un 85% dels pacients amb DM 2 tenen resistència a la insulina en el moment del diagnòstic. A l'etiologia de la resistència a la insulina participen factors genètics, l'obesitat o l'excés de greix corporal i factors ambientals, que van des de factors nutricionals i hormonals a l'envelliment. L'obesitat és un factor important en la patogènia de la resistència a la insulina i per tant, de la DM 2 (1).

Tradicionalment, el teixit adipós havia estat considerat un reservori passiu d'energia en forma de triglicèrids, però en la última dècada s'ha reconegut a l'adipòcit com un agent secretor i receptor de nombroses senyals, estant implicat en la coordinació d'una gran varietat de processos biològics com el metabolisme energètic, la funció neuroendocrina i la funció immunitària (2). Així, el teixit adipós secreta una gran varietat de substàncies bioactives, anomenades adipocitocines, com l'adiponectina i la resistina, algunes citocines proinflamatòries, com el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), les interleucines (IL)-6, IL-8, IL-18 i l'antagonista del receptor de la IL-1beta (IL-1 β), substàncies vasoactives com l'endotelina i factors procoagulants com l'inhibidor de l'activador del plasminogen-tipus 1 (PAI-1). Algunes d'aquestes citocines amplifiquen la resposta inflamatòria mitjançant l'estimulació de la síntesi hepàtica de proteïnes de la fase aguda inflamatòria, com la proteïna C reactiva (PCR) (3) i com es descriu més endavant, generen resistència a la insulina. Per altra banda, l'adiponectina secretada pels adipòcits s'associa de manera positiva amb la sensibilitat a la insulina (4).

S'ha demostrat que, tant al model animal com a l'humà, existeix una infiltració del teixit adipós pels macròfags, predominantment al teixit adipós visceral, que es correlaciona positivament amb l'índex de massa corporal (IMC), la grandària de l'adipòcit i la quantitat total de greix (5-7). Donat que els adipòcits expressen receptors per algunes citocines, s'ha postulat que els macròfags presents en el teixit adipós podrien ser, per una banda font de citocines proinflamatòries i, per altra, podrien modular l'activitat secretora dels adipòcits gràcies a una intercomunicació entre ambdós tipus de cèl·lules. Així els adipòcits funcionarien com font i objectiu de senyals que perpetuarien la resposta inflamatòria (5, 6).

2.1.1.1 Citocines i adipocitocines estudiades

2.1.1.1.1 *Interleucina-6:*

La IL-6 és una citocina multifuncional produïda per diferents tipus cel·lulars, com són les cèl·lules del sistema immunològic, les cèl·lules endotelials, els fibroblastos, els miòcits i els adipòcits. El teixit adipós, sobretot el visceral, que produeix 3 vegades més IL-6 que el subcutani, contribueix al 30% de la seva concentració en sang perifèrica. La producció i la concentració d' IL-6 es correlaciona significativament amb l'IMC i altres mesures d'adipositat corporal (8). A l'igual que el TNF- α , la IL-6 està relacionada amb la resistència a la insulina, ja que ambdues citocines estimulen la lipòlisi incrementant la concentració dels àcids grassos lliures, que disminueixen l'acció de la insulina al fetge i al múscul esquelètic. Per altra banda, la concentració d'aquesta citocina al fluid intersticial del teixit adipós, s'incrementa de forma paral·lela a l'augment de la glucosa i la insulinèmia que es produeix postprandrialment, pel què s'ha suggerit que podria modular el metabolisme glicèmic en aquest teixit. La seva concentració perifèrica és tres

vegades més elevada en els pacients amb DM2 i obesos que en pacients no obesos i s'ha proposat com factor predictiu de DM 2 en humans (5, 9).

2.1.1.1.2 *Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α):*

El TNF- α és una citocina produïda principalment pel teixit adipós, involucrada en la regulació de nombroses funcions immunològiques i inflamatòries. També està implicat en la patogènia de la resistència a la insulina i de les alteracions del metabolisme glicèmic i lipídic associat a la DM 2 (10,11). A més, estimula l'expressió del PAI-1 pels adipòcits, pel què s'ha proposat que aquesta citocina podria ser el nexse d'unió entre la resistència a la insulina, la inflamació, la inhibició de la fibrinòlisi i l'estat protrombòtic que caracteritzen a la DM2 (12, 13). El TNF- α s'expressa com una proteïna transmembrana de 26-KD que dona lloc a una forma soluble de 17-KD biològicament activa (14). El seu mecanisme d'acció és a través de dos receptors, el receptor del TNF- α (TNFR) tipus 1 i el TNFR2: el TNFR1 és responsable dels mecanismes de proliferació, diferenciació y apoptosi cel·lular, mentre que el TNFR2 ho és de les accions metabòliques (15). Al 1993 es va demostrar que la neutralització del TNF- α produïa una millora de la resistència a la insulina en ratolins obesos, suggerint un vincle directe entre el TNF- α i la resistència a la insulina associada a l'obesitat (16). Tanmateix, en humans la infusió d'anticossos neutralitzadors del TNF- α a pacients diabètics tipus 2 no va modificar les concentracions de glicèmia ni la sensibilitat a la insulina (17). S'han proposat diversos mecanismes per explicar l'associació entre el FNT- α i la resistència a la insulina, com la disminució de la expressió gènica del principal transportador de glucosa (GLUT-4) i la inhibició de la fosforilació activadora del receptor de la insulina (18). Les concentracions plasmàtiques d'aquesta citocina s'han associat a un risc incrementat de patir malaltia coronària (19) en la població general.

2.1.1.1.3 Adiponectina

L'adiponectina és una adipocitocina de 247 aminoàcids amb un paper clau en la homeostasi energètica i en la sensibilitat a la insulina. És l'adipocitocina present en major concentració en sang perifèrica. S'expressa específicament pels adipòcits diferenciats del teixit adipós subcutani (20). Les concentracions plasmàtiques d'adiponectina es correlacionen negativament amb l'obesitat (21), la dislipèmia diabètica (22), la malaltia cardiovascular (23), la resistència a la insulina i la DM2 (24). Tanmateix, les concentracions circulants d'adiponectina es correlacionen més estretament amb la hiperinsulinèmia i la insulinoresistència que amb l'obesitat o el greix corporal (24). De fet, un estudi realitzat en una població d' indis Pima, caracteritzats per la seva elevada resistència a la insulina, les concentracions d'adiponectina estaven més lligades a la sensibilitat a la insulina que a les mesures d'adipositat (25). Per això, s'ha suggerit que la hipoadiponectinèmia dels pacients amb obesitat i DM2 vindria determinada per la resistència a la insulina, i no per l'obesitat. Estudis en animals d'experimentació han contribuït a un major coneixement del paper i de l'acció de l'adiponectina. L'administració d'adiponectina reverteix la resistència a la insulina en models d'obesitat i DM 2 en roedors (26). Pel contrari, ratolins transgènics que sobreexpressen aquesta hormona es caracteritzen per tenir una major sensibilitat a la insulina (27). S'ha proposat un locus de susceptibilitat per la DM 2 i la síndrome metabòlica al cromosoma 3q27, on es localitza el gen que codifica l'adiponectina (28).

Els mecanismes a través dels quals l'adiponectina millora la resistència a la insulina no són del tot coneguts. Un mecanisme proposat és que l'adiponectina disminueix els àcids grassos lliures al incrementar la seva oxidació al múscul esquelètic (27,29). Això resultaria en una disminució dels triglicèrids al múscul, que s'associa a una millora de la sensibilitat a la insulina (30). A més, l'adiponectina estimula la captació de glucosa pels adipòcits i el múscul per la via de les proteínquineses (31).

El TNF- α , inhibeix la síntesis d'adiponectina i aquesta la d' IL-6 i de les molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM-1) i vascular VCAM-1 i la E-selectina (32). També estimula la secreció de citocines antiinflamatòries (com la IL 10, i la IL1RA) i la proliferació dels precursors mielomonocítics, la fagocitosi i la producció de TNF- α pels macròfags. Per tot això, es considera una citocina immunosupressora (4,24). A més, s'ha suggerit que té una funció protectora de l'arteriosclerosi, ja que troballes experimentals demostren que l'adiponectina s'acumula a la paret dels vasos danyats i inhibeix, de forma dosi-dependent, l'acció estimuladora del TNF- α sobre l'adhesió dels monòcits circulants durant el procés de la formació de la placa d'ateroma (32). Els ratolins *knockout* per adiponectina tenen concentracions elevades de TNF- α , augment de la resistència a la insulina independentment de la seva obesitat i un alt risc d'arteriosclerosi (33).

2.1.1.1.4 Proteïna C reactiva :

La PCR és un marcador d'inflamació crònica, de risc cardiovascular i de resistència a la insulina (34,35). Es sintetitza en la fase aguda inflamatòria a nivell hepàtic mitjançant l'estimulació per altres citocines proinflamatòries, com la IL-6. Diferents treballs han demostrat que les seves concentracions plasmàtiques estan elevades en l'obesitat i en la DM, i que es correlaciona positivament amb els índex d'adipositat (com el pes, l'IMC i la massa grassa total) i amb la resistència a la insulina. La PCR elevada s'associa a un risc incrementat d'accident vascular cerebral, infart agut de miocardi i malaltia arterial perifèrica (36). Encara que no podem extreure conclusions de tipus causa-efecte entre la PCR i la malaltia arterioscleròtica arrel dels estudis observacionals, existeix evidència experimental de que la PCR és un estímul potent d'aterogènesi (37). Estudis *in vitro* demostren que l'administració de PCR a cèl·lules endotelials i als monòcits promou l'aterosclerosi, mitjançant diferents mecanismes, com són l'estímul de síntesi de molècules que afavoreixen l'adhesió dels monòcits a les cèl·lules endotelials

(38,39) l'augment de la proliferació de cèl·lules musculars vasculars i l'increment de la vasoconstricció a través de la disminució de la concentració d'òxid nítric i de prostaciclina i l'augment de l'endotelina-1 (40). Per altra banda, la PCR estimula la síntesi de PAI-1 per les cèl·lules endotelials (41).

2.1.2. Inflamació sistèmica i diabetis mellitus tipus 2

Aproximadament un 85% dels pacients amb risc de desenvolupar DM2 presenten resistència a la insulina (32,42,43). La resistència a la insulina es caracteritza per una reducció de la sensibilitat a la insulina dels teixits implicats en el metabolisme de la glucosa, com són el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós. A més, existeix resistència a la insulina en les cèl·lules implicades en la malaltia vascular com les cèl·lules endotelials, els macròfags i els miòcits cardíacs.

En els últims anys la manera d'entendre l'etiologia i les complicacions de la DM2 s'ha modificat considerablement. S'ha hipotetitzat que la DM2 és una malaltia inflamatòria que s'associa, per una banda a un estat de resistència a la insulina i de disfunció progressiva de la cèl·lula beta, i per altre, a una disfunció endotelial i a un estat protrombòtic. Estudis recents situen al teixit adipós com el nexa entre inflamació, resistència a la insulina i protrombosi, a través de l'acció de les citocines inflamatòries com la IL-6, IL-1, IL-18 i el TNF- α (*Figura 1*). Les citocines atrauen leucòcits i monòcits i incrementen l'expressió de molècules d'adhesió vascular, amplien la resposta inflamatòria amb l'alliberament d'altres citocines i de reactants de fase aguda com la PCR i el fibrinogen. En conjunt, les citocines activen alguns receptors i factors de transcripció, com el receptor dels productes avançats de glicosilació (AGE) i el factor nuclear kappa-beta (NF κ β), que condueixen a disfunció i apoptosi de la cèl·lula beta, a

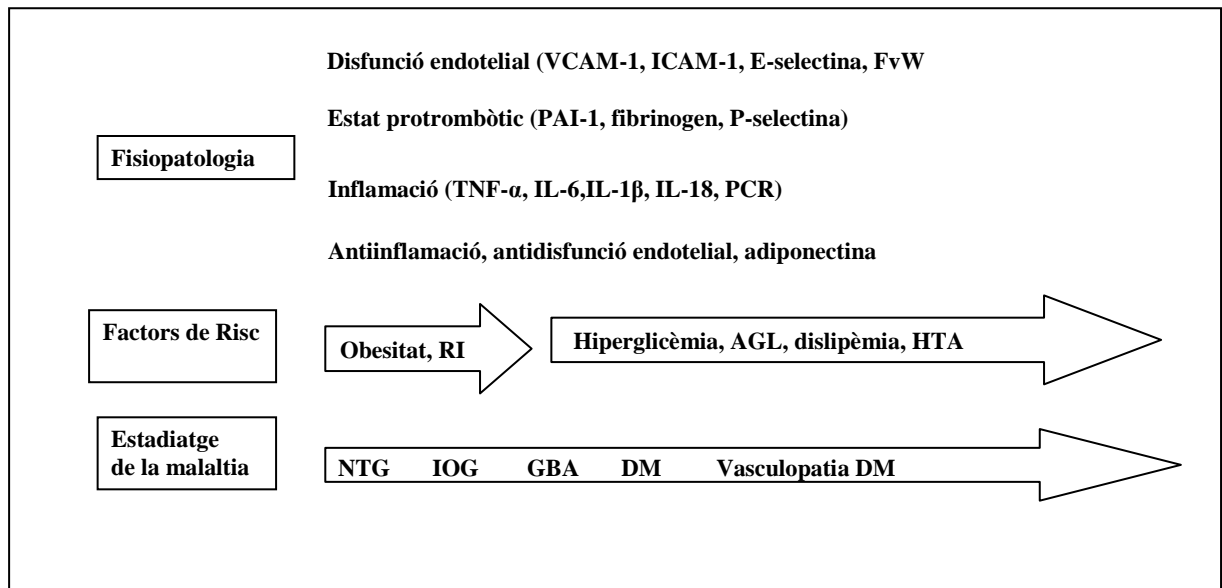
una disminució de la sensibilitat a la insulina i a disfunció endotelial (43, 44). A més, els adipòcits, les cèl·lules endotelials i els macròfags sota l'estímul de les citocines, augmenten l'expressió de PAI-1 i de factor tissular, que juntament amb la hiperactivació plaquetària pel fibrinogen, condueixen a un estat protrombòtic.

Dades epidemiològiques de grans estudis han demostrat que la relació entre la inflamació i la resistència a la insulina no és merament correlativa, sinó que realment és causal. En aquest sentit, s'han realitzat diferents estudis que han demostrat que determinats factors inflamatoris, reactants de fase aguda i factors protrombogènics, són forts predictors de DM 2 (35,45,46). També s'ha demostrat que la disminució de l'adiponectina és un predictor independent del desenvolupament de DM2 (47-49) i que el seu augment, induït per la reducció ponderal, s'associa amb reducció del risc de DM2 (43).

En conclusió, l'estat d'inflamació crònica té un paper fonamental en la generació d'un estat de resistència a la insulina i en el desenvolupament de la DM2 i de les seves complicacions vasculares. De fet, la investigació de la patogènia de la malaltia cardiovascular durant les últimes dos dècades, ha ajudat a entendre que els processos bioquímics implicats serien els mateixos que aquells implicats en la defensa contra l'hoste, incloent la coagulació sanguínia, la inflamació i la resposta immunitària.

Figura 1.

Inflamació, disfunció endotelial, i estat procoagulant: diagrama conceptual que explica les vies fisiopatològiques i els factors de risc per progressar a DM i a les seves complicacions.



NGT, tolerància normal a glucosa; IOG, intolerància oral a la glucosa; GBA glicèmia basal alterada; AGL, àcids grassos lliures.

Adaptat de Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(9):3171-82 (43).

2.2. L'ARTERIOSCLEROSI A LA DIABETIS MELLITUS TIPUS 2

La DM2 és un dels principals factors de risc independents de malaltia cardiovascular. Les malalties cardiovasculars són la principal causa de mortalitat dels pacients amb diabetis mellitus, de tal manera que els pacients diabètics tenen un risc cardiovascular de dos a quatre vegades superior que la població general (42,50). Les complicacions cardiovasculars atribuïbles a l'arteriosclerosi són responsables del 70-80% de totes les causes de mort en els pacients diabètics, i representen més del 75% del total de les hospitalitzacions per complicacions diabètiques. A més, l'arteriosclerosi al pacient diabètic es desenvolupa de manera més ràpida i precoç, i es caracteritza per una afectació més greu i generalitzada, que a la població no diabètica (50,51). Els pacients diabètics tenen una major incidència d'altres factors de risc cardiovasculars clàssics com l'obesitat, la hipertensió arterial (HTA) i la dislipèmia. Tanmateix, s'accepta que l'associació dels factors de risc cardiovascular clàssics no explicarien l'alt risc cardiovascular que s'associa a la DM2. Hi ha cada cop més evidència que l'arteriosclerosi és el resultat de la interacció entre els factors metabòlics (resistència a la insulina, inflamació, hiperglicèmia) i les alteracions de l'hemostàsia protrombogèniques (funció endotelial, plaquetes, coagulació i fibrinòlisi) que caracteritzen a la DM2 (13,52,53). A més, tots aquests factors contribueixen a desencadenar l'acceleració de la malaltia cardiovascular isquèmica, degut al desenvolupament de trombosi aguda sobre la superfície trombogènica d'una placa arterioscleròtica erosionada o trencada.

2.2.1 Aterotrombosi:

L'arteriosclerosi és una malaltia progressiva de la paret arterial en la que intervenen múltiples factors (inflamatoris, dipòsit de lípids, remodelat vascular, fibrosi i trombosi) que s'interrelacionen entre sí. S'ha proposat l'arteriosclerosi com una malaltia inflamatòria, donat que les diferents citocines inflamatòries predisposen a la formació de la placa d'ateroma (53). El desenvolupament progressiu de les lesions arterioscleròtiques (placa d'ateroma) i la seva estreta associació amb les complicacions trombòtiques, són conegudes globalment com aterotrombosi. Les plaques arterioscleròtiques es desenvolupen al llarg de molts anys de manera asimptomàtica. Aquelles plaques fines, amb nucli necròtic i infiltrades per macròfags, són d'alt risc de fissura i ruptura. La ruptura de la placa precipita l'activació i l'agregació plaquetària, i la formació del coàgul ric de fibrina oclusiu, que genera isquèmia en els teixits dependents del vas arterial trombosat.

El procés de l'aterotrombosi es pot dividir en cinc fases sense solució de continuïtat (*Figura 2*):

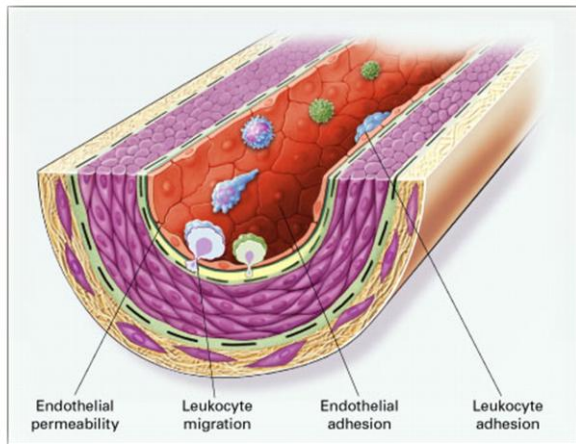
La *primera fase* consisteix en una disfunció endotelial que estimula el dipòsit, acumulació i oxidació de lipoproteïnes de baixa densitat a les cèl·lules de la íntima, per augment de la seva permeabilitat. A la *segona i tercera fases* existeix un reclutament de cèl·lules inflamatòries a l'endoteli, mediat per les lipoproteïnes de baixa densitat oxidades i per algunes citocines (proteïna quimiotàctica dels macròfags -MCP-1-, IL-8, factor de creixement derivat de les plaquetes-PDGF-), i un creixement de la placa en formació. Durant aquestes fases existeix també un reclutament i una proliferació de cèl·lules musculars. També té lloc un cúmul progressiu de lípids a les cèl·lules endotelials i als macròfags, formant-se cèl·lules escumoses (*foam cells*) dins d'una matriu extracel·lular de col·lagen i elastina (estimulat pel TNF- α i la MCP-1). Simultàniament al cúmul de

leucòcits i monòcits/macròfags, s'acumulen i s'adhereixen plaquetes. A mesura que progressa la lesió i la placa en formació madura, la superfície es calcifica i es forma una capa fibrosa, resultat de l'estimulació de citocines i factors de creixement (IL-1, TNF- α , PDGF i factor de creixement i transformació beta-1 -TGF- β 1-). Durant la *quarta fase* la capa fibrosa exterior es trenca o la superfície de la lesió s'erosiona, exposant el contingut protrombòtic de la placa a la circulació (factor tissular, factor VII de la via extrínseca de la coagulació), activant-se la cascada de la coagulació resultant en trombosi i oclusió arterial. L'aprimament progressiu de la capa fibrosa exterior sembla degut al continu flux de macròfags, que alliberen metaloproteïnases que degraden la matriu vascular i causen hemorràgia des dels *vasa vasorum* o des de la llum arterial.

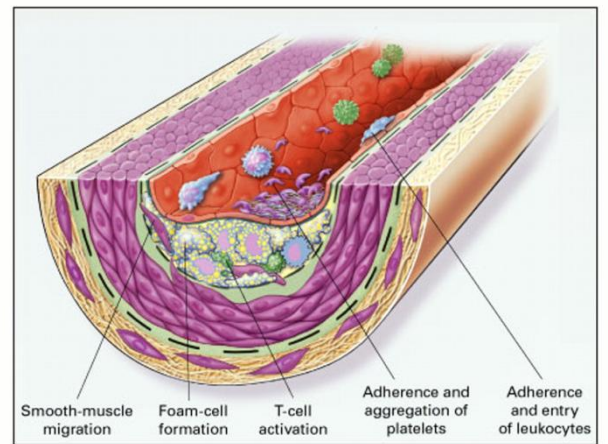
En aquest procés les plaquetes tenen un paper primordial, resultant en la formació del trombe ric en plaquetes sobre la placa erosionada (*cinquena fase de formació del trombe plaquetari*). Progressivament, les lesions inicials (trombus plaquetaris) acumulen lípids i recluten macròfags i cèl·lules escumoses fins que es fibrosen. Les lesions més inestables són aquelles que es trenquen per fissures, hemorràgies o per formació de trombe. Quan el flux sanguini es veu limitat per aquest trombe, apareix la clínica isquèmica. Tanmateix, l'aterotrombosi és molt complexa donat que no totes les lesions erosionades generaran clínica isquèmica, ja que les plaques arterioscleròtiques passen per cicles continus de trencament, formació de trombe i reparació.

Figura 2. Esquema de la formació de la placa arterioscleròtica.

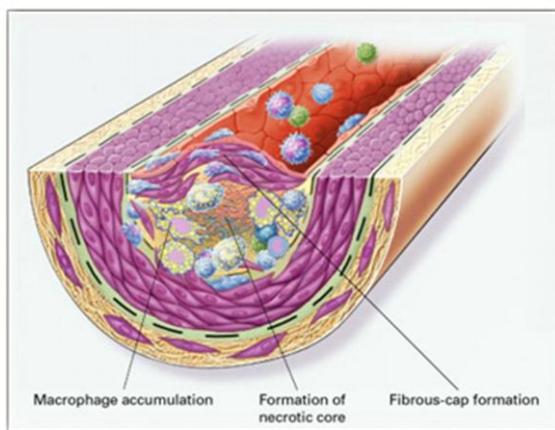
Disfunció endotelial en l'arteriosclerosi



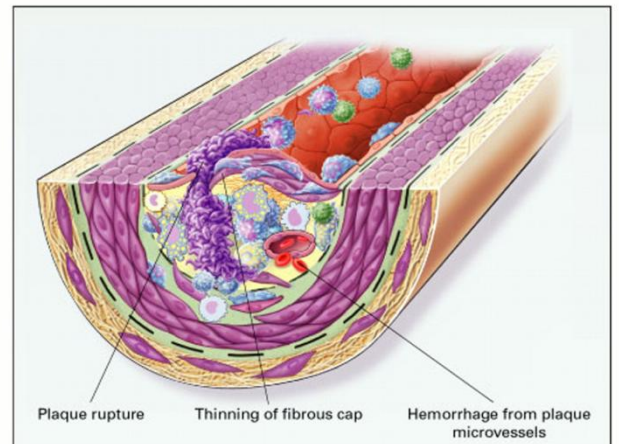
Formació de placa de greix



Formació de placa arterioscleròtica complicada



Placa fibrosa inestable



Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 14;340:115-26 (53).

2.2.1.1 Paper de les plaquetes a l'aterotrombosi:

Les plaquetes són fragments citoplasmàtics enucleats que es produeixen com a conseqüència de la fragmentació dels megacariòcits. Circulen per la sang en forma de disc biconvex i tenen una càrrega elèctrica negativa. La seva membrana externa constitueix una bicapa fosfolipídica que, un cop activada la plaqueta, queda carregada negativament (el que afavoreix l'acció dels enzims de la coagulació) amb unes glicoproteïnes (GP) (que actuen com a ponts d'unió a components plasmàtics necessaris per la formació del coàgul). Les plaquetes formen la base del procés reparador de la coagulació, mitjançant la formació del trombe plaquetari als punts de lesió endotelial, que frena inicialment l'hemorràgia. Les fases per la formació del coàgul són tres: la unió de la plaqueta a la superfície, fet conegut com *adhesió plaquetària*; el canvi de forma o *activació plaquetària* i la unió plaqueta-plaqueta o *agregació plaquetària*.

a) *Adhesió de les plaquetes:*

Les plaquetes s'adhereixen en qüestió de segons al subendoteli vascular de les àrees de lesió que han quedat denudades. Els components subendotelials que activen aquesta adhesió són el col·lagen, el factor von Willebrand (FvW), la fibronectina, la laminina i la trombospondina. El complex GPIb/IX/V és bàsic pel procés d'adhesió plaquetària, mitjançant la seva unió al FvW del subendoteli denudat. Per altra banda, la GP Ia/IIa s'uneix al col·lagen del subendoteli, però requereix del FvW per establir la interacció col·lagen-GPIa/IIa. Les plaquetes unides al FvW (via complex GPIb/IX/V) i al col·lagen (via GPIa/IIa) canvien la seva conformació fent-se més esfèriques i per tant, augmenten la superfície de contacte amb el subendoteli, fent la unió amb aquest molt resistent a les forces de cisalla que comporta el flux sanguini. Tanmateix, aquesta unió continua sent reversible.

b) Activació de les plaquetes :

El procés pel qual les plaquetes formen part integral del coàgul es coneix com activació. El col·lagen és un important modulador de l'activació plaquetària a través dels seus receptors. Les plaquetes tenen dos receptors principals pel col·lagen, la GPIa/IIa i la GPVI, i un tercer receptor indirecte, el FvW, que s'uneix a la GPIb. La unió més estable és la de la GPIa/IIa al col·lagen, formant una capa de plaquetes activades que serviran com a niu per la conversió de protrombina a trombina. La GPVI s'uneix dèbilment al col·lagen, però té un paper en la transducció de senyals que condueix a l'activació plaquetària. La unió dels receptors de les plaquetes al col·lagen desencadena una sèrie de senyals intracel·lulars mediat pel calci, que resulten en la contracció de les plaquetes i l'alliberació de substàncies activadores de la coagulació (serotonina, ADP, PAI-1, FvW, PDGF, TGF- β 1), en la síntesi de tromboxà (TX)A₂ (vasoconstrictor i activador) i en un increment de l'expressió en superfície del receptor GP IIb/IIIa. Simultàniament, altres factors activadors circulants, com el TXA₂ i l'ADP, amb altres agonistes (adrenalina i alfa-trombina) activaran a les plaquetes. L'òxid nítric i la prostaciclina, alliberats per l'endoteli sa, inhibeixen l'activació plaquetària. Un altre pas en l'activació de les plaquetes consisteix en l'exposició de càrregues negatives a la seva membrana fosfolípida, fet que activa la cascada de la coagulació, generant fibrina que uneix plaquetes adjacents i a més, és un potent estimulador de l'activació plaquetària.

c) Agregació de les plaquetes:

La unió de les plaquetes entre sí i sobre les fixades al subendoteli, determina la formació d'agregats de plaquetes. Durant l'activació de les plaquetes el complex GP-IIb/IIIa canvia la seva conformació i això permet la unió al fibrinogen soluble, que forma ponts interplaquetaris i afavoreix l'estabilitat del trombe. A més, la Gp-IIb/IIIa s'uneix a altres factors solubles (FvW, fibronectina i vitronectina) que afavoreixen l'adhesió de les

plaquetes. D'aquesta manera, el complex GP-IIb/IIIa interacciona amb el subendoteli i participa en fer progressar el dipòsit de les plaquetes.

2.2.1.2 Cascada de la coagulació i fibrinòlisi:

La formació del trombe plaquetar s'acompanya de l'activació de la cascada de la coagulació, que genera trombina.

Les fases de la coagulació consisteixen en una cascada de proenzims que, quan s'activen, condueixen a l'activació del complex protrombinasa, que converteix la protrombina en trombina. La cascada de la coagulació es pot descriure iniciant-se amb l'activació del factor tissular unit a les membranes cel·lulars. El factor tissular interacciona amb el factor VII, iniciant la cascada amb activació del factor IX, que activa al factor X, que genera trombina des del factor II. Aquestes reaccions tenen lloc sobre la superfície cel·lular activada. El factor V i el VIII actuen com acceleradors de la coagulació. La trombina catalitza la transformació del fibrinogen en fibrina, qui s'estabilitza per la unió amb el factor XIII. La fibrina forma la matriu del trombe, produïnt un coàgul estable.

La cascada de la coagulació està contrarestada per la fibrinòlisi que consisteix en una sèrie d'activadors (activador tissular de plasminogen i l'uroquinasa activadora del plasminogen) que regulen la conversió del plasminogen en plasmina. La plasmina és l'enzim clau de la fibrinòlisi, doncs regula la fragmentació de la fibrina en productes de degradació. El PAI tipus 1 i 2, i la lipoproteïna a són inhibidors naturals de la fibrinòlisi. La coagulació i la fibrinòlisi estan en equilibri i sota control genètic. El trombe pot expandir-se ocluint el vas sanguini totalment dependent d'aquest equilibri. Els factors que estimulen la progressió del trombe són la ruptura de la placa d'ateroma, l'estenosi vascular, el baix flux sanguini, la concentració elevada de fibrinogen i de PAI-1 i les

plaquetes activades. Els factors que limiten la progressió del trombe són, entre d'altres, l'alt flux sanguini i l'estimulació de la fibrinòlisi.

2.2.2. Estat protrombòtic a la diabetis mellitus tipus 2:

Com ja s'ha mencionat abans, donat que s'ha objectivat que determinats marcadors d'inflamació (com són les citocines o els reactants de fase aguda) són predictors importants pel desenvolupament de DM2 (34) i de malaltia cardiovascular (36,37), s'ha hipotetitzat que la resistència a la insulina i l'aterosclerosi tindrien un base inflamatòria comuna (53). La diabetis s'associa a un estat protrombòtic caracteritzat per una activació persistent de les vies trombogèniques i una disminució de la fibrinòlisi. Juhan i cols. van descriure, per primer cop, que la resistència a la insulina s'associa a un inhibició de la fibrinòlisi degut a un increment de les concentracions de PAI-1 (54). A més, com s'ha descrit prèviament fins ara, les citocines inflamatòries que generen resistència a la insulina, estimulen la producció hepàtica de reactants de fase aguda com són la PCR, el fibrinogen i el PAI-1, així com altres factors procoagulants (com el FvW, el factor VII i el factor tissular) (55,56). Així mateix, a la DM2 existeixen concentracions disminuïdes de factors antitrombòtics com la antitrombina i la proteïna C (42, 43, 57, 58). Per altra banda, l'estrès oxidatiu s'associa a l'activació de factors de transcripció, que activen gens que codifiquen mediadors de l'aterogènesi, amplificant la resposta inflamatòria dins del procés de l'aterosclerosi (1). La relació entre la resistència a la insulina i la trombosi es confirma pel fet que familiars de primer grau de pacients amb DM2, que tenen resistència a la insulina però no DM2, presenten elevades concentracions de PAI-1, de factor VII i de fibrinogen (59). Aquest encavalcament entre la resistència a la insulina i certs component de la coagulació (factor VII, PAI-1,

fibrinogen), recolzaria la teoria de l'origen comú (*the common soil hypothesis*) de que la diabetis i la malaltia vascular tenen els mateixos factors etiopatogènics (53,60).

Seguidament, es descriu en detall la relació entre DM i la predisposició a aterotrombosi:

2.2.2.1. Hiperglicèmia i aterotrombosi

La situació d'hiperglicèmia, a través dels AGE, desencadena un augment de l'estrès oxidatiu, que genera una resposta inflamatòria en la capa adventícia de la paret vascular, amb infiltració macrofàgica, i un procés de neovascularització dels *vasa vasorum*. Aquests fets condueixen a quimiotaxi i activació dels macròfags amb cúmul lipídic (formació de cèl·lules escumoses) i a hemorràgia dins de la placa arterioscleròtica (61,53). Les lesions arterioscleròtiques dels pacients diabètics presenten un contingut major de lípids, amb més trombe, més infiltració per macròfags i més concentració de PAI-1, i per tant, són més friables o inestables que les plaques arterioscleròtiques del subjectes sense diabetis. Per altra banda, a la DM s'ha descrit un increment de les metaloproteïnases (MMP)-2 i -9 macrofàgiques que predisposen a la degradació de la matriu extracel·lular (62). La matriu extracel·lular proporciona la plataforma estructural i funcional dels vasos sanguinis i l'equilibri entre la síntesi i la seva degradació serà la clau en el desenvolupament de la lesió arterioscleròtica, el remodelat vascular i la ruptura de la placa (62). A més, en situació d'hiperglicèmia, la glicació proteica afavoreix la formació de trombus resistents a la fibrinòlisi.

En conclusió, tots aquests canvis comporten que els pacients amb DM tinguin unes lesions arterioscleròtiques d'alt risc de ruptura i per tant, de trombosi (57).

Tant el PAI-1 com el fibrinogen s'han proposat com a nexes d'unió entre la inflamació, la trombosi i la DM2:

2.2.2.1.1 *Inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1):*

El PAI-1 és un dels factors més importants en l'associació entre la resistència a la insulina i els factors de la coagulació. El PAI-1 és una proteïna de síntesi hepàtica i endotelial que inhibeix al factor tissular activador del plasminogen i, per tant, la formació de plasmina i la fibrinòlisi. L'expressió de PAI-1 pot ser estimulada pel TNF- α , la insulina (63), la glucosa i el factor de creixement similar a la insulina tipus 1 (IGF-I) (13,55), tots ells factors implicats en la fisiopatologia de la DM2. També, dades de la literatura apunten a que els adipòcits viscerals són responsables de la secreció de PAI-1 (13,64). El PAI-1 en la placa arterioscleròtica inhibeix la migració de les cèl·lules musculars llises vasculares. Donat que en la DM2 existeixen concentracions elevades de PAI-1 a la placa arterioscleròtica, aquestes són fines, vulnerables a la ruptura i a la formació d'un trombe (65). En diferents estudis s'ha observat que les concentracions de PAI-1 estan elevades en la síndrome coronària aguda, amb una correlació molt significativa amb la DM (13,66). Mc Gill i cols. van descriure que els pacients diabètics presentaven concentracions de PAI-1 tres vegades més elevades que els no diabètics (67). L'estudi ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) va concloure que PAI-1 era un marcador precoç de resistència a la insulina, doncs les concentracions de PAI-1 es detectaven més elevades en aquells que desenvolupaven diabetis posteriorment, suggerint que les alteracions de la fibrinòlisi s'inicien amb la resistència a la insulina, independentment de la glicèmia (45).

2.2.2.1.2 *Fibrinogen:*

El fibrinogen regula la trombogènesi, la viscositat sanguínia i l'agregació plaquetària. S'ha suggerit que és un factor de risc independent de malaltia cardiovascular (68). També s'ha associat valors elevats de fibrinogen amb l'engruiximent de la íntima-mitja carotídia (69). Els mecanismes implicats en l'associació del fibrinogen i

la trombosi arterial són l'augment de la formació de la fibrina i de la viscositat sanguínia, de l'agregació plaquetària i de la proliferació de les cèl·lules musculars llises. A més, el fibrinogen és un reactant de fase aguda, relacionat amb la inflamació crònica que s'associa a l'arteriosclerosi i a la DM (66). S'ha proposat que el fibrinogen actuaria com a nexa entre inflamació i coagulació donat que durant el procés de la fibrinolisi genera els productes de degradació de la fibrina, els quals estimulen la producció d'IL-6 pels monòcits, sent la IL-6 l'estímul més potent de síntesi del mateix fibrinogen (55).

2.2.2.2 Hiperglicèmia i disfunció endotelial:

L'endoteli vascular té un paper important en el manteniment de l'homeostasi vascular. A més de secretar mediadors que regulen la contractilitat arterial, actua com a barrera que impedeix l'extravasació de proteïnes circulants i interactua amb proteïnes i cèl·lules circulants per regular la inflamació, la coagulació i la fibrinòlisi. La hiperglicèmia i l'estrès oxidatiu, a través de la generació dels AGE, inhibeixen la sintasa d'òxid nítric i activen al NF κ B (71). També les citocines proinflamatòries (IL-6, TNF- α i la PCR), que estan augmentades en la DM, s'han associat a disfunció endotelial, a través de l'activació del NF κ B (42,43). El NF κ B és l'activador més potent de disfunció endotelial. Regula l'expressió de gens que codifiquen citocines inflamatòries, proteïnes de fase aguda, molècules d'adhesió, metaloproteïnases i la síntesi del factor tissular per les cèl·lules endotelials i els monòcits, generant trombosi (53,70). Per tant, la disfunció endotelial genera inflamació, vasoespasme i trombosi a través de: a) increment de l'adhesivitat endotelial de macròfags, leucòcits i plaquetes per augment d'expressió de VCAM-1 i factor tissular; b) increment de la permeabilitat de macròfags a la subíntima vascular; c) disminució de la vasodilatació per disminució de la síntesi de factors vasodilatadors com l'òxid nítric i la prostaciclina, i d) increment de la producció de

factors vasoconstrictors com l'endotelina i els prostanoids (60,71). Per tant, la DM2 i l'estat oxidatiu i proinflamatori que s'associa a la resistència a la insulina, s'associa a disfunció endotelial, que amplia la resposta inflamatòria a nivell local i predisposa a l'aterosclerosi.

2.2.2.3 Alteracions plaquetàries a la DM2:

Des de fa més de dos dècades s'ha descrit que les plaquetes en la DM2, i també en la DM1, presenten un estat d'hiperactivació, per diferents mecanismes (72), com són l'augment d'exposició o del número de GP implicades en l'adhesió i agregació plaquetària (73), la disminució de la fluïdesa de membrana o l'alteració del metabolisme plaquetari que genera augment de síntesi del TX, entre altres (74) (*Taula 1*). Les plaquetes hiperactivades localment alliberen substàncies potencialment aterogèniques como són el PDGF i el TGF- β 1, que són els principals mediadors de la proliferació de les cèl·lules musculars llises arterials i del desenvolupament de l'arteriosclerosi a través d'un augment en l'expressió dels receptors de trombina (75).

Taula 1.

Alteracions de la funció plaquetària en la DM

▪ Augment de l'expressió de molècules d'adhesió dependents d'activació plaquetària (GPIIb-IIIa, P-selectina)
▪ Reducció de la fluïdesa de membrana
▪ Increment de la mobilització intracel·lular de calci i magnesi
▪ Increment del metabolisme de l'àcid araquidònic <ul style="list-style-type: none">○ Increment de la síntesi del TXA2
▪ Disminució de la síntesi de prostaciclina
▪ Disminució de la síntesi d'òxid nítric
▪ Disminució de les concentracions d'antioxidants

2.2.2.3.1 Alteracions plaquetàries extrínseques en la DM2:

El procés d'adhesió/agregació està regulat per una sèrie de factors com l'òxid nítric i la prostaciclina, que són antiagregants secretats contínuament per l'endoteli sa. La insulina antagonitza als factors proagregants com l'ADP o el col·lagen, estimula la síntesi dels antiagregants òxid nítric i prostaciclina i inhibeix la síntesi de PAI-1 per l'endoteli (76). Per tant, la insulina seria antitrombogènica, i en situació de resistència a la insulina com la DM2, existeix una falta d'inhibició dels factors proagregants i una disminució de la síntesi dels factors antiagregants, generant unes plaquetes hiperactivades (74,77,78). A més, la glicació no enzimàtica de les proteïnes de la membrana plaquetària, altera la seva fluïdesa i augmenta l'agregabilitat (74,77,79). També, l'oxidació dels lípids i de les proteïnes de la membrana plaquetària estan

augmentats a la DM2 (80). L'associació observada entre la peroxidació lipídica i el marcador plasmàtic de generació de trombina (fragment 1+2 de la protrombina) suggereix que els lípids oxidats de les plaquetes actives podrien afavorir l'acoblament i activació del complex protrombinasa (80, 81).

Per altra banda, l'estat d'estrès oxidatiu a la DM2 promou l'activació de les plaquetes, a través de l'alteració de la homeòstasi del calci intraplaquetari i de l'activació de les proteases implicades en l'activació de la GPIIb/IIIa (77-79,82,83).

Aquest augment de l'activitat plaquetària es reflexa en què els pacients DM2 presenten una major síntesi plaquetària de TX que els subjectes no diabètics (84). Aquest augment del TX, sembla no ser degut a la malaltia vascular en sí, sinó a l'alteració metabòlica associada a la DM2 (85). El fet que la síntesi del TX (84) i els marcadors d'activació plaquetària (81, 86,87) disminueixin amb la millora del control glicèmic aniria a favor de que la hiperactivació plaquetària seria una conseqüència de les alteracions metabòliques que acompanyen a la DM2. A més, normalment la DM2 s'associa a dislipèmia, que també s'ha associat a activació plaquetària (84,88).

Recentment, s'ha demostrat que els pacients amb DM1 i nefropatia diabètica presenten un estat d'hiperactivació plaquetària (89).

2.2.2.3.2 Alteracions plaquetàries intrínseques en la DM2:

A la literatura existeix controvèrsia sobre si les alteracions plaquetàries són mera conseqüència de que a la DM les lesions arterioscleròtiques són més prevalents o si són alteracions intrínseques de les plaquetes, que precedeixen a la malaltia cardiovascular, pròpies de la DM *per se*. S'ha proposat que la hiperactivació plaquetària resultaria de la formació de plaquetes, a partir dels megacariòcits amb unes característiques més trombogèniques; plaquetes amb un volum augmentat (90,91) amb capacitat augmentada

de síntesi del TXA₂ i amb un número incrementat de GP funcionals com la GPIb i GP IIb/IIIa que predisposen a la seva activació (73,91,92).

L'augment del volum de les plaquetes, pot reflexar plaquetes hiperactivades o plaquetes grans amb agregabilitat augmentada. S'ha observat que l'increment de GP IIb-IIIa és paral·lel amb l'augment de l'agregabilitat de les plaquetes al fibrinogen en pacients amb DM2 (74), i que la quantitat de GP Ib i GP IIb/IIIa mesurades en les plaquetes actives, supera a l'esperable per l'augment del volum. Tschoepe i cols., van descriure per primer cop, que la GPIb i la GP IIb/IIIa estan expressades amb major proporció a la superfície de les plaquetes dels pacients diabètics, respecte als no diabètics i van proposar que la hiperactivació de les plaquetes en la DM és deguda a una alteració primària. Aquesta hipòtesi ve recolzada pel fet que les plaquetes circulants de pacients prediabètics, o recentment diagnosticats de DM, estan hiperactivades (73,92). Per altra banda, el canvi conformacional de la GPIIb/IIIa, que té lloc durant l'activació plaquetària, està regulat per una calpaïna (93) de la que s'ha descrit un polimorfisme, que s'ha suggerit, que està associat a la DM2 (94), recolzant l'existència d'un estat de plaquetes hiperactivades a la DM2.

2.3 FACTORS DE RISC GENÈTIC RELACIONATS AMB LES GLICOPROTEÏNES PLAQUETÀRIES EN EL DESENVOLUPAMENT DE TROMBOSI ARTERIAL.

L'aterotrombosi és una malaltia complexa i multifactorial, resultat de les interaccions gen-gen i gen-ambient relacionats amb l'aterosclerosi i la trombosi, que originen un fenotip característic (95). L'elevat risc cardiovascular associat a la DM junt amb la heterogeneïtat clínica de la malaltia cardiovascular a la DM, no s'expliquen totalment pels factors de risc cardiovascular, pel què s'ha suggerit la possible existència d'altres factors afavoridors d'aquesta i de les seves complicacions trombòtiques (96). Part d'aquesta heterogeneïtat en el desenvolupament de l'arteriosclerosi i de les complicacions trombòtiques arterials podria atribuir-se a les característiques pròpies del pacient.

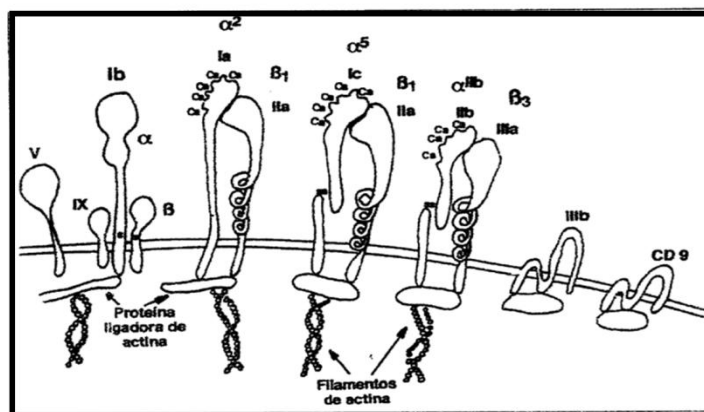
En resum, les alteracions endotelials i de la coagulació, associades a la inflamació i la resistència a la insulina en la DM2, podrien conduir a l'adhesió, agregació i activació plaquetàries, mentre que alhora canvis intrínsecs de les plaquetes dels pacients diabètics, contribuirien a un estat hiperactiu. Així, un camp d'investigació seria la troballa de determinats polimorfismes en el codi genètic dels megacariòcits dels pacients amb DM2, que expliquessin canvis funcionals de les GP cap a un estat de més trombogenicitat. Per exemple, l'al·lel PI^{A2} del polimorfisme PI^{A1}/PI^{A2} de la GPIIb/IIIa s'ha detectat elevat en els pacients diabètics tipus 2 respecte als no diabètics, independentment de l'aterosclerosi clínica (97), el què recolzaria la hipòtesi de que existeix una alteració primària a nivell de les cèl·lules mare de les plaquetes, en els pacients amb DM 2.

2.3.1. Glicoproteïnes de membrana plaquetària

Com s'ha mencionat prèviament, la membrana de la plaqueta té una composició de GP variable (Figura 3). Les GP clàssiques han estat subclassificades en diferents famílies: integrines (GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa), GP riques en leucina (GP Ib/IX/V) i selectines. S'ha descrit l'estructura primària d'algunes GP de la membrana plaquetària que intervenen en els processos d'adhesió i d'agregació i que són de gran importància en el funcionalisme plaquetari (98). En les últimes dècades hi ha hagut molts avenços en genètica molecular, havent-se identificat nombrosos polimorfismes (variacions genètiques freqüents en la població general) relacionats amb l'aterosclerosi i la trombosi arterial (95,99). En concret, els factors genètics que afecten a les GP implicades en l'adhesió i en l'activació plaquetària, podrien afavorir una trombocitopatia diabètica que fes a les plaquetes perifèriques més susceptibles d'activar la cascada de la coagulació (74).

Figura 3.

Esquema de l'estructura de les principals GP i receptors de membrana plaquetària. Es mostren les subunitats que formen les GP indicades.



2.3.2 Polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries:

Com s'ha mencionat, en les últimes dècades s'han descrit polimorfismes estructurals en els gens d'aquestes GP, que poden determinar alteracions en el seu funcionalisme (100-103). Els polimorfismes més rellevants des del punt de vista clínic són un polimorfisme de longitud del receptor del FvW a la GP Ib (100,101), un polimorfisme que determina la densitat del receptor del col·lagen a la GP Ia/IIa (102,103) i el polimorfisme estructural $PI^{A1/A2}$ de la GP IIb/IIIa. Recentment, en un estudi realitzat en 804 individus amb malaltia coronària greu, s'ha observat que el número de polimorfismes procoagulants associats es correlaciona amb un risc trombogènic elevat (104). Per tant, la combinació de polimorfismes protrombòtics podria ajudar a predir un infart agut de miocardi.

2.3.2.1. Polimorfisme genètic GP Ib-alfa

La GP Ib està formada per dues cadenes polipeptídiques, una cadena alfa de pes molecular de 143000 daltons i una cadena beta de 22000, que es troben lligades per ponts disulfur (105). És la principal sialoglicoproteïna de la membrana de les plaquetes i, com a tal, és responsable en gran mesura de la càrrega negativa de les plaquetes i del seu comportament electroforètic. És un receptor que intervé en l'adhesió de plaquetes no activades al FvW del subendoteli i a la trombina circulant, sota les condicions d'un alt coeficient de cisalla dels vasos de la microcirculació. El 70% de la GP Ib està associat a l'actina del citoesquelet, fet que pot condicionar tant el manteniment de la forma de les plaquetes, com la funció d'unió al FvW. El punt d'unió del FvW està localitzat a la part més externa de la porció extracel·lular de la subunitat Ib-alfa (98). El FvW és una

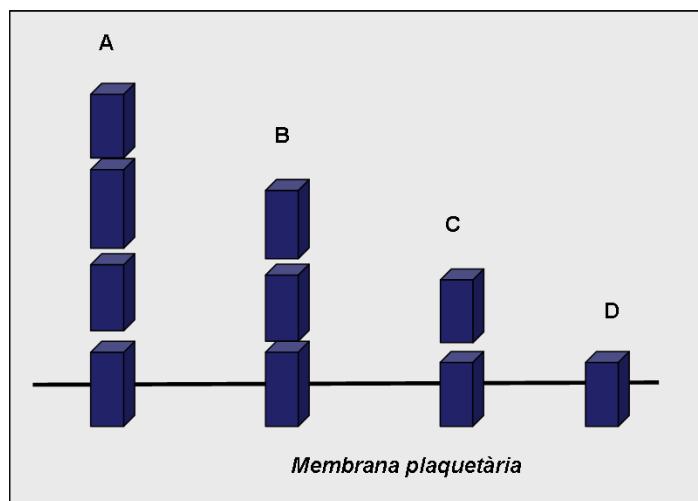
proteïna multimèrica constituent de la matriu subendotelial i que també està present en els grànuls alfa de les plaquetes, des d'on es secreta durant l'activació, i circula en la sang formant un complex amb el factor VIII de la coagulació (106).

S'han descrit 3 llocs de polimorfismes pel gen de la GPIb-alfa: el dimorfisme Kozak (-5T/C), el dimorfisme T/M 145 y el *variable number of tandem repeats* (VNTR). Ens centrarem en aquest últim.

Moroi i cols. (100) van descriure l'existència de polimorfismes de longitud al gen de la GP Ib-alfa a població japonesa, que definien quatre variants designades A, B, C i D en ordre de pes molecular decreixent. Posteriorment, es va localitzar aquest polimorfisme a la regió macroglicopeptídica de la cadena alfa i es va observar que era el resultat de la repetició de 39 parells de bases (VNTR) (una vegada: al·lel D, dues vegades: al·lel C, tres vegades: al·lel B i quatre vegades: al·lel A) al gen que codifica aquesta regió (Figura 3). Cada repetició dóna lloc a l'addició de tretze aminoàcids a la proteïna i això comporta una major longitud de la cadena alfa (cada repetició afegeix 32 angstroms) i el desplaçament cap a l'exterior del domini d'unió al FvW (101, 107). La freqüència d'expressió de les diferents variants genètiques és diferent segons la població estudiada (105). Als caucàsics, l'al·lel C és el més prevalent, amb freqüències del 80%, seguit del D i del B amb una freqüència del 10%, mentre que l'al·lel A és molt infreqüent (105). En canvi, en els japonesos la prevalença major és la de l'al·lel A (108,109). Aviat es va suggerir que les variants de més longitud podrien tenir alterada la susceptibilitat de les plaquetes a l'activació induïda per les característiques reològiques, procés que requereix de la interacció de la GP Ib i el FvW, afavorint d'aquesta manera els fenòmens trombòtics (105,108,110). Aquest polimorfisme s'ha relacionat amb un major risc de trombosi arterial en alguns estudis (108,110-112). En canvi, aquests resultats no han estat confirmats per altres treballs (113). Aquesta controvèrsia, fins i tot es reflexa en la

trobada en un anàlisi d'un subgrup de pacients inclosos en l'estudi ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*), que descriu que els afroamericans, però no els blancs, portadors de l'al·lel C, presenten un risc menor de malaltia cardiovascular (115). Per altra banda, l'impacte clínic d'aquest polimorfisme està qüestionat, perquè no s'ha trobat una clara evidència de que afecti l'adhesivitat i agregabilitat plaquetària (100), tot i que podria ser explicable perquè no s'ha comparat una mostra equiparable de pacients de cada subtipus de polimorfisme (A, B, C i D). Per aquest motiu, existeixen autors que no recolzen un paper d'aquest polimorfisme en la trombogenicitat dels pacients portadors.

Figura 4.



Representació esquemàtica de les variants fenotípiques de la GP Ib-alfa, segons el polimorfisme VNTR.

2.3.2.2. Polimorfisme genètic GP Ia/IIa

La GP Ia/IIa és el receptor pel col·lagen del subendoteli vascular (116). Aquest receptor activa el procés d'adhesió a la matriu extracel·lular i també està implicat en l'agregació de les plaquetes induïda pel col·lagen.

Kunicki i cols. van descriure per primera vegada que la unió de les plaquetes al col·lagen és proporcional a la densitat del receptor (GPIa/IIa) i, per tant, variacions d'aquesta densitat podrien tenir un impacte important en l'adhesió de les plaquetes al col·lagen (117). Els mateixos autors van descriure l'existència de dos polimorfismes silents en el gen de la subunitat Ia, que estan relacionats amb variacions de la densitat d'aquest receptor i de la seva funció (102). Els polimorfismes consisteixen en l'existència d'una citosina o una timina en posició 807 del gen (polimorfisme 807 C/T) i en l'existència d'una guanina o una adenina en posició 873 (polimorfisme 873 G/A). Ambdós polimorfismes s'hereten junts, de manera que l'al·lel 807C sempre s'hereta amb el 873 G i el 807 T amb el 873 A (*Figura 5*). Les freqüències al·leliques són: 0,68 pels 807 C i 873 G, i 0,32 pels 807 T i 873 A. La freqüència a la població sana és: 94,4% per els genotips 807 CC/873 GG i 807CT/873 GA i de 5,6% per els genotip 807TT/873AA. Kunicki i cols. van descriure que el genotip 807TT (873AA) s'associa amb la major densitat del receptor i el genotip 807CC(873GG) a la menor densitat, mentre que els genotipus heterozigots s'associaven a una densitat intermitja (102). Posteriorment, aquestes dades no van ser confirmades per alguns autors (118), però sí per altres (119-122). Però, donat que aquests polimorfismes no alteren la seqüència d'aminoàcids de la proteïna, queda per esbrinar si són directament responsables de les variacions de la densitat del receptor o si s'hereten conjuntament amb altres polimorfismes responsables, encara no identificats.

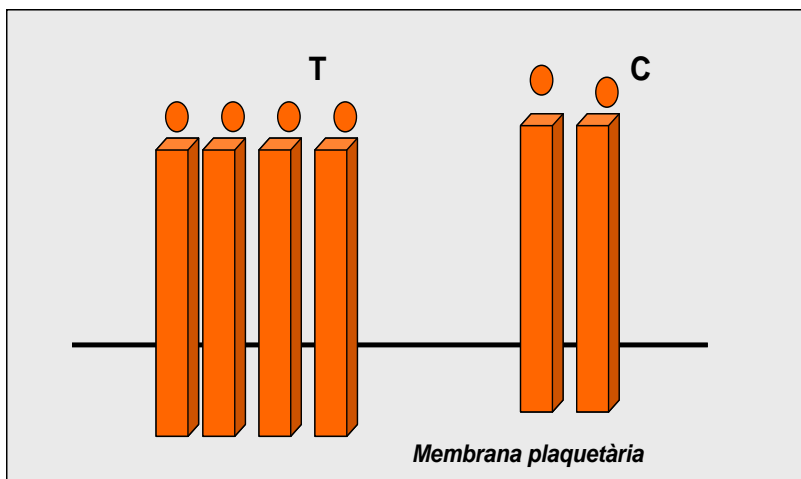
Moshfegh i cols. varen realitzar el primer estudi en població europea, en què es va associar l'al·lel T (A) del polimorfisme 807C/T amb el risc d'infart agut de miocardi, de tal manera que el polimorfisme homozigot 807T/873A s'associava a infart agut de miocardi amb un risc relatiu de 3,3 (103). Aquest resultat es va confirmar en un estudi realitzat en 2237 homes als que se'ls va practicar angiografia coronària, sobretot en el subgrup dels més joves (120). Posteriorment, altres estudis han confirmat aquesta relació entre l'al·lel 807T i el risc d'un episodi coronari (121) o d'ictus (122). Un estudi prospectiu realitzat en 12.139 dones europees va analitzar la relació entre l'al·lel 807T i la mortalitat cardiovascular, no observant cap relació significativa en la mostra total. En canvi, aquelles dones amb l'al·lel T que tenien un altre marcador de risc endotelial (fumadores, diabètiques o amb microalbuminúria patològica) presentaven un risc elevat de mortalitat cardiovascular (123). Per tant, el polimorfisme 807T/873A s'associa a un major risc de mortalitat cardiovascular en pacients que associen algun factor de lesió endotelial, basant-se en què l'endoteli sà fa prevenció de l'adhesió plaquetària (123). Altres estudis de casos-controls realitzats en població europea i japonesa no van trobar cap relació entre aquest polimorfisme i el risc vascular (118, 124-128). En un d'aquests estudis no es van observar diferències en la distribució del genotip 807TT entre els pacients amb malaltia coronària i els controls, però en canvi, els portadors d'aquest genotip tenien més risc de patir un infart agut de miocardi més precoçment que els no portadors (127). Els autors conclouen que el polimorfisme per sí mateix no s'associa a un major risc de malaltia coronària, però podria precipitar un event coronari agut en pacients amb lesions ateromatoses de base.

Algunes possibles explicacions de les discrepàncies trobades a la literatura sobre la implicació del polimorfisme 807T/C en la trombogènesi, podrien ser les diferències en les poblacions estudiades, com la grandària de la mostra, l'edat i l'ètnia, la implicació de nombrosos factors en la progressió de l'arteriosclerosi, que podrien haver interferit en els

resultats i la possible unió a altres polimorfismes, que s'hereten conjuntament i que no coneixem.

Figura 5.

Representació esquemàtica de les variants fenotípiques de la GPIa/IIa, segons el polimorfisme 807C/T.



2.3.2.3. Polimorfisme genètic complex GP IIb/IIIa

El complex IIb/IIIa és la GP més abundant a les plaquetes i té un important paper en els fenòmens d'adhesió i agregació, ja que és el principal receptor del fibrinogen. L'activació de les plaquetes comporta un canvi conformacional del domini extracel·lular de la GP IIb/IIIa (*inside-out signaling*) d'alta afinitat pel fibrinogen.

El gen que codifica la subunitat IIIa, localitzat en el cromosoma 17, presenta un polimorfisme C-1565-T a l'exó 2. Aquest polimorfisme determina la substitució d'una leucina per una prolina a l'aminoàcid 33 de la proteïna i això produeix una variant dial·lèlica $PI^{A1/A2}$. L'al·lel més freqüent (PI^{A1}) es troba en el 85% de la població caucàsica, mentre que la substitució Pro33 (PI^{A2}) apareix en el 15% dels individus de raça

blanca, en el 5-8% d'individus de raça negra i és virtualment absent en els asiàtics (125). La forma homozigota A^2/A^2 s'associa amb la púrpura postransfusional i la plaquetopènia neonatal aloimmunitària, entitats en què es formen anticossos contra l'al·lel A^1 . S'ha relacionat la presència de l'al·lel PI^{A^2} amb una major resposta agregant de les plaquetes a diversos agonistes (129). L'any 1996, Weiss i cols. van descriure per primera vegada, (130) una associació entre l'al·lel PI^{A^2} i el risc de trombosi coronària aguda (amb un risc relatiu de 6,2), que va ser més important en el subgrup de pacients amb edat inferior a 60 anys. Posteriorment, altres estudis han confirmat que el ser portador de l'al·lel PI^{A^2} augmenta el risc d'infart agut de miocardi (131-136), d'ictus (113, 137), de reestenosi coronària post-col·locació d'un stent (138,139) i de resistència a l'acció de l'inhibidor de GPIIb/IIIa abciximab (140). En un estudi de casos i controls, realitzat en pacients després d'haver patit un infart agut de miocardi, també es va trobar un augment del risc en els portadors d'aquest al·lel, que es va incrementar en els fumadors (de 1,8 a 13,7) (141). Posteriorment altres treballs han suggerit que el tabaquisme seria un modulador del risc d'ictus i de malaltia coronària aguda que comporta l'al·lel PI^{A^2} , probablement per modificacions a nivell del fibrinogen i de la seva unió a la plaqueta (142,143).

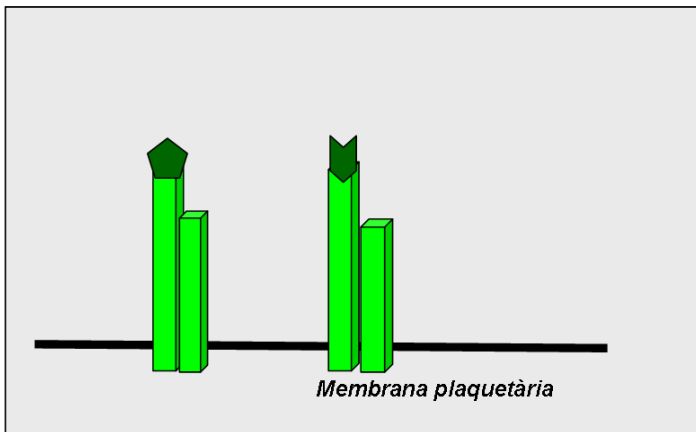
Tanmateix, altres estudis i metanàlisi han estat contradictoris (144-151). Un treball realitzat en una cohort de l'estudi Framingham no va trobar cap relació entre el polimorfisme PI^{A^2} i l'engruiximent íntima-mitja carotídia (152).

Al igual que amb el polimorfisme 807T/873A de la GPIa/IIa, Zotz i cols. no van trobar diferències respecte a la presència de l'al·lel PI^{A^2} entre els pacients amb malaltia coronària i els controls, però els portadors d'aquest al·lel tenien més risc de patir un infart agut de miocardi a una edat més precoç que els no portadors (127). Segons aquests resultats, el polimorfisme PI^{A^2} (i el polimorfisme 807T segons el mateix treball, com s'ha mencionat prèviament) seria un factor de risc de trombogenicitat. En base a això, no tindria sentit fer estudis de casos i controls en què els controls són individus sans amb

coronàries normals, ja que rarament, encara que siguin portadors d'un polimorfisme, desenvoluparan un episodi trombòtic agut. Un altre estudi, realitzat en una família amb molts membres afectats de malaltia cardiovascular precoç, va demostrar que la combinació dels polimorfismes en homozigosi PL^{A2} de GP IIb/IIIa i 807T de GP Ia/IIa s'associa a un augment d'unió de les plaquetes al col·lagen i de la seva activitat procoagulant (153). Per tant, amb aquest estudi es va demostrar que els polimorfismes associats donarien una conseqüència funcional (augment de la densitat dels receptors, de la unió al col·lagen i de l'activitat procoagulant) i una expressió clínica (infart precoç) (153).

Figura 6.

Representació esquemàtica de les variants fenotípiques de la GPIIb/IIIa, segons el polimorfisme $PL^{A1/A2}$



2.3.2.4. Polimorfismes plaquetaris i DM2

Els escassos estudis que hi ha publicats sobre la relació entre els polimorfismes plaquetaris i la DM2, s'han centrat en l'estudi del polimorfisme $PI^{A1/A2}$ i han tingut resultats contradictoris (97,154-156). Tschoepe i cols. (97) van descriure una prevalença de l'al·lel PI^{A2} de més del doble en un grup de 112 pacients amb DM2 respecte a 103 controls, que era més significativa si avaluaven només els pacients i controls sense malaltia cardiovascular prèvia. No es va trobar cap diferència en la distribució genotípica d'aquest al·lel entre els pacients amb DM2 amb i sense malaltia cardiovascular prèvia (29% i 44,2%, respectivament). Pel contrari, els controls amb malaltia cardiovascular documentada presentaven l'al·lel PI^{A2} (20,5%) més freqüentment que els que no tenien aquest antecedent (10,2%). Els autors van concloure que l'al·lel PI^{A2} s'associava a malaltia coronària, però que sobretot existia una associació significativa entre aquest al·lel i la DM2, apostant per una hipòtesi molt atractiva, de què la fisiologia de la GPIIb/IIIa podria estar implicada en la patogènia de la DM2, recolzant la hipòtesi de l'origen comú de la DM i la malaltia cardiovascular (60,97). Posteriorment, dos estudis realitzats en una població més ample de pacients amb DM2 i controls, no van trobar cap diferència significativa en la prevalença de l'al·lel PI^{A2} entre els pacients amb DM2 i els controls, ni quan es varen analitzar en funció de l'antecedent d'ictus (155,156). März i cols. tampoc van trobar cap relació entre el polimorfisme i els paràmetres del metabolisme de la glucosa, ni amb l'antecedent d'infart agut de miocardi o la presència de malaltia coronària confirmada per angiografia (156). Igualment, un altre estudi no va trobar cap diferència en la distribució de dos polimorfismes (el VNTR de la GP-Ib i el PI^{A1}/PI^{A2} de la GPIIb/IIIa) i la presència de malaltia cardiovascular en un grup de 215 pacients amb DM2 (154). Tampoc es va trobar cap associació entre el polimorfisme

PI^{A1/A2} i la DM2 en un treball realitzat en població japonesa (144). Respecte a les complicacions microvasculars de la DM2, els pocs estudis realitzats, no troben cap associació entre el polimorfisme PI^{A1/A2} de la GP-IIb/IIIa i la nefropatia (157-159) o la retinopatia diabètiques (158). En canvi, en un únic estudi (160) s'ha descrit una relació entre el polimorfisme 807T/873C de la GP Ia/IIa i la gravetat de la retinopatia diabètica, tant en pacients amb DM2 com amb DM1 de llarga evolució.

Els polimorfismes plaquetaris són una nova àrea de la genòmica humana que necessita ser estudiada amb detall. La controvèrsia sobre la seva implicació en el risc de malaltia trombòtica és deguda principalment a la falta d'estudis realitzats amb un bon disseny, prospectius i epidemiològics, ja que els estudis realitzats fins ara difereixen en grandària de mostra, en la ètnia i les malalties concomitants. Una altra explicació per les discrepàncies trobades seria que els polimorfismes estudiats estiguessin en desequilibri d'unió amb altres al·lels de risc, encara no identificats, o que la hiperactivació plaquetària, que comporta el polimorfisme per sí mateixa, no sigui un determinant en l'aterotrombosi, sinó un factor precipitant quan s'associa a altres factors de risc cardiovascular. A més, és necessària la realització d'estudis *in vitro* sobre la rellevància funcional d'aquests polimorfismes i la relació amb la clínica. Donat que les tres glicoproteïnes Ib, Ia/IIa, IIb/IIIa estan implicades en la formació del trombe plaquetari, és molt interessant estudiar els polimorfismes de les tres GP i fer un anàlisi combinat d'aquests factors amb diferents fases del procés arterioscleròtic. Existeix, doncs, la oportunitat de buscar estratègies per fer prevenció de malaltia trombòtica en pacients de risc.

2.4. METALOPROTEÏNASES

Donat que l'aterogènesi i la progressió de l'aterotrombosi estan directament relacionades amb la resposta inflamatòria, l'activació immunològica i la cascada de la coagulació i de la fibrinòlisi, s'ha generat un interès creixent en la troballa de biomarcadors circulants de risc cardiovascular. La matriu extracel·lular proporciona la plataforma estructural i funcional dels vasos sanguinis, pel qual les alteracions de la seva síntesi i/o degradació seran clau en el desenvolupament de la lesió arterioscleròtica, el remodelat vascular i el trencament de la placa d'ateroma. Això ha fet que algunes MMP s'hagin proposat com biomarcadors potencials de progressió arterioscleròtica.

Les MMP són endoproteases zinc-dependents, amb activitat col·lagenasa, que degraden les fibres del col·lagen, comprometent l'estabilitat de la placa arterioscleròtica i la integritat de l'endoteli de la membrana basal vascular. Per tant, són proteïnes que regulen el remodelat de la matriu extracel·lular i predisposen a la ruptura de les plaques d'ateroma. Existeixen tres tipus de MMP: MMP-1, expressada a l'interstici; MMP-2, col·lagenasa capaç de degradar el col·lagen de la membrana basal i la MMP-9, gelatinasa implicada en el remodelat ventricular (161).

2.4.1 Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A):

La PAPP-A és un enzim proteolític que forma part de la família de les metal·loproteïnes, produïda principalment pels sinciotrofobastos placentaris, però també pels fibroblastos, osteoblastos i cèl·lules musculars vasculares (162). Usualment es mesura en plasma pel cribatge de la trisomia 21 fetal al primer trimestre de la gestació. La forma circulat de la proteïna consisteix en un complex heterotetramèric format per 2 subunitats de 200 i 250 kDa, unides per enllaços covalents, a 2 molècules de 50 i 90 kDa

de la proforma de la proteïna eosinofílica bàsica major (proMBP), que ha estat identificada com l'inhibidor endogen de l'activitat proteolítica de la PAPP-A. Concretament, la PAPP-A degrada específicament la proteïna d'unió del factor de creixement similar a la insulina tipus 4 i 5 (IGFBP- 4,5), augmentant la concentració del IGF-I lliure a nivell local (163,164). Donat que l'IGF-I participa en el procés arterioscleròtic, la PAPP-A actuaria com factor modulador de l'acció d'IGF-I i per tant, s'ha hipotetitzat que podria estar implicada en la patogènia de l'aterosclerosi (162, 165-169).

Bayés-Genís i cols. van proposar per primera vegada en l'any 2001, que la PAPP-A podria utilitzar-se com marcador biològic d'inestabilitat de la placa arterioscleròtica. Van descriure que l'expressió local de PAPP-A a les cèl·lules i a la matriu extracel·lular de les plaques d'ateroma erosionades i amb major risc de trencament, era més elevada que a les plaques més estables (166). A més, els pacients amb síndrome coronària aguda presentaven concentracions perifèriques de PAPP-A més elevades que els que tenien malaltia coronària estable. Posteriorment, alguns treballs han corroborat aquests resultats (170,171) encara que altres estudis posteriors no ho han confirmat (172). S'ha proposat la seva utilització en el control i l'estratificació dels pacients que van als serveis d'urgències amb dolor toràcic, en substitució de la troponina (173) si bé, altres estudis són contradictoris (172,174). També s'ha suggerit que la concentració elevada de PAPP-A durant la síndrome coronària aguda és un bon predictor de repetició d'un event coronari, de necessitat de revascularització (167,171,175) i fins i tot, de mortalitat (176-178). Estudis angiogràfics en pacients amb malaltia coronària estable, han mostrat que la PAPP-A podria ser un marcador de la complexitat i extensió de les lesions coronàries (167,179). En canvi, respecte a la morfologia ecogràfica de les plaques carotídiès, i per tant de la seva estabilitat, i respecte a l'engruiximent íntima-mitja carotídia els resultats són contradictoris (180,181). Beaudeau i cols. van descriure una associació significativa

entre la PAPP-A circulant i l'ecogenicitat de les plaques carotídies, però no amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia en pacients no diabètics amb hipercolesterolèmia i alt risc cardiovascular (180). Un altre estudi posterior, va trobar que la PAPP-A es correlacionava de manera significativa i negativa amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia, i positiva amb marcadors inflamatoris de les plaques (181). En aquest últim estudi, Sangiorgi i cols. van descriure que les concentracions del RNA missatger de la PAPP-A eren quatre vegades més elevades en els pacients amb antecedent d'íctus respecte als controls, i que l'expressió local de PAPP-A fou més elevada en les plaques carotídies vulnerables o trencades, que a les plaques carotídies estables. Així mateix, en un altre treball realitzat en pacients majors de 65 anys amb arteriopatia simptomàtica de diferents etiologies, s'ha suggerit que la PAPP-A seria un marcador del procés d'aterosclerosi sistèmic i no només a nivell de la placa coronària (182). L'únic treball realitzat en pacients diabètics, ha suggerit que la PAPP-A podria ser predictor de l'engruiximent íntima-mitja carotídia i de l'índex turmell-dit en pacients amb DM2 i hipercolesterolèmia (183).

Ara bé, l'evidència científica actual demostra que l'IGF-I local afavoreix l'estabilització de la placa d'ateroma, encara que inicialment estudis *in vitro* van suggerir que l'IGF-I era proaterogènic (165,184). Actualment es coneix que l'IGF-I promou la reparació dels teixits danyats estimulant, per una banda la vasodilatació, la vasculogènesi i la sensibilitat a la insulina, i per altra banda, estimulant la proliferació endotelial i de cèl·lules musculars llises vasculares (168,169,184,185). Conti i altres autors hipotetitzen que la PAPP-A, a l'augmentar l'IGF-I lliure, podria reflectir una resposta local estabilitzadora de la placa d'ateroma i, per tant, ser conseqüència d'una resposta reparadora de la lesió trombòtica (162,184,185). De fet, grans estudis prospectius han descrit que el dèficit d'IGF-I s'associa a malaltia trombòtica (186-188) i estudis aleatoritzats amb placebo han demostrat que el tractament substitutiu dels pacients amb

dèficit de GH, millora l'engruiximent íntima-mitja carotídia (189) i el risc cardiovascular (190). També, s'ha descrit que la concentració d'IGF-I està inversament relacionada amb la hipoecogenicitat o inestabilitat de la placa carotídia arterioscleròtica (191) i amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia (169). Per altra banda, el tractament amb IGF-I millora el control glicèmic i la sensibilitat a la insulina del pacient diabètic (169,192) i la major biodisponibilitat d'IGF-I podria prevenir les complicacions vasculars dels pacients amb DM2 (186). Per altra banda, la relació entre PAPP-A i els paràmetres metabòlics com el colesterol (180,182,193) i la proteïna C reactiva ultrasensible (PCRus) és controvertida. La falta d'associació entre la PAPP-A i un marcador inflamatori agut reconegut com és la PCRus (171,177,183,193), així com la no disminució de la seva concentració amb estatines (193), qüestiona el paper de la PAPP-A en l'etiologia del procés inflamatori arterioscleròtic i la seva utilització com a marcador etiopatogènic de risc arterioscleròtic.

No obstant, donat que la PAPP-A és una metaloproteïnasa, podria degradar la matriu de la placa d'ateroma i ser causa d'inestabilitat. Ara bé, en contra d'aquesta hipòtesi, no es coneix cap altre funció proteolítica diferent a la de l'IGFBP-4 que allibera IGF-I (169) i, a més durant la gestació existeix un increment de 150 vegades en l'expressió d'aquesta proteïna sense cap risc d'isquèmia vascular (184). Estudis experimentals demostren que la PAPP-A inhibeix la inflamació (183, 194, 195) i la seva expressió a les cèl·lules vasculars augmenta després d'una lesió, suggerint que l'activació de l'eix PAPP-A/IGF-I forma part d'una resposta precoç reparadora (169,193). Treballs d'experimentació recents demostren que els animals *knockout* per PAPP-A són resistents a la reparació de la lesió vascular (196), recolzant el seu paper en la resposta local de reparació vascular.

Per altra banda, els valors de la PAPP-A dels diferents treballs no són comparables, degut a la utilització de mètodes de detecció diferents, alguns d'ells no adequats (197). La PAPP-A circula unida a la proMBP durant la gestació i lliure i/o

unida a proMBP (aquesta última en escassa proporció) fora del període de la gestació. Per aquest motiu els mètodes de detecció de la PAPP-A aplicats al període de la gestació, que detecten PAPP-A total (unida i no unida a la proMBP), no són adequats per determinar PAPP-A en l'estudi de la síndrome coronària aguda. Això ha creat controvèrsia sobre la importància com a marcador d'inestabilitat de la placa arterioscleròtica (193), ja que històricament els assajos utilitzats pel diagnòstic precoç de la síndrome de Down durant la gestació, són els mateixos que es van utilitzar en els treballs inicials de la síndrome coronària aguda (166,167,177,179). Recentment s'han comercialitzat altres tècniques de mesura monoclonals més específiques de PAPP-A que han estat utilitzats en alguns estudis que s'han revisat en el present treball (170,173,174,182).

2.5 MÈTODES DE CRIBATGE D'ATEROSCLEROSI SUBCLÍNICA

L'alt risc cardiovascular que presenten els pacients amb DM2 fa que sigui de gran interès la troballa d'eines diagnòstiques reproduïbles i senzilles d'utilitzar a les consultes, que ens permetin identificar als pacients diabètics en fases subclíniques de la malaltia arterioscleròtica, per poder intensificar el tractament dels factors de risc cardiovascular.

2.5.1 Ecografia carotídia

L'ecografia en mode B de l'artèria caròtida extracranial ha demostrat ser un mètode incruent, relativament econòmic i fiable en la detecció de l'arteriosclerosi carotídia (198). Aquesta és una tècnica ben validada per l'estudi de la presència i progressió de malaltia cardiovascular, que permet una visualització precisa de la morfologia de les estructures vasculars i de les plaques arterioscleròtiques carotídies (199). Donat que la malaltia arterioscleròtica és sistèmica i afecta a la major part d'artèries de mitjà i gran calibre de l'organisme, s'ha proposat l'ecografia carotídia com a mètode per explorar la càrrega arterioscleròtica d'un individu i el seu risc cardiovascular (198,200,201). Grans estudis prospectius han demostrat que l'engruiximent íntima-mitja carotídia és un factor de risc independent de la malaltia isquèmica coronària i d'ictus a la població general (202-205) i diabètica (206,207). Així mateix, s'ha descrit que la presència de plaques carotídies es correlaciona positivament amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia i també és un bon factor predictor d'episodis cardiovasculars independentment d'altres factors de risc cardiovascular (208,209). La detecció de plaques carotídies és tècnicament més senzilla que el mesurament de l'engruiximent íntima-mitja carotídia,

pel què s'ha proposat la seva identificació com marcador alternatiu d'arteriosclerosi subclínica (208,210). Les plaques carotídies arterioscleròtiques que són hipocogèniques (més negres) a l'ecografia en mode B són hemorràgiques i riques en contingut lipídic, mentre que les plaques carotídies hiperecogèniques (més blanques) tenen un major contingut de teixit fibrós amb calcificació (211). Aquesta diferent composició de les plaques carotídies fa que les hipocogèniques siguin més inestables, amb més tendència a trencar-se i trombosar-se. Treballs prospectius han corroborat aquest fet, demostrant que la presència d'aquest tipus de plaques carotídies s'associen a una major incidència d'episodis isquèemics cardiovasculars (212,213).

Tanmateix, l'ecografia carotídea no és una tècnica fàcilment aplicable a les consultes externes. Per aquest fet altres exploracions com l'índex turmell-braç s'han proposat per fer el cribatge de la malaltia arterial.

2.5.2 Índex turmell-braç

L'índex turmell-braç és una prova incruenta, senzilla, de baix cost i amb gran reproductibilitat. Estudis prospectius han posat de manifest que un índex turmell-braç inferior a 0,9 s'associa a una elevada prevalença de malaltia coronària i d'ictus i a una elevada mortalitat total a expenses de la mortalitat cardiovascular en població general i diabètica (215-219). L'índex turmell-braç disminuït s'ha proposat com predictor del risc cardiovascular, independent dels factors de risc cardiovascular clàssics en alguns estudis (219,220) encara que no en tots (221). L'associació de l'índex turmell-braç als factors de risc cardiovascular clàssicament utilitzats, incrementa el valor predictiu d'aquests (222). Ara bé, existeixen treballs en els que l'índex turmell-braç no va detectar pacients amb arteriosclerosi subclínica (223,224) i s'ha assenyalat que té una sensibilitat baixa per

detectar arteriopatia (225) i una elevada tasa de falsos positius d'arteriopatia perifèrica diabètica assintomàtica (226).

2.5.3. Pulsioximetria

La oximetria de pols o pulsioximetria mesura la saturació d'oxigen (SaO₂) en sang perifèrica, pel què s'ha suggerit que reflexa la perfusió tissular. Aquest fet fa que s'hagi utilitzat per determinar el pronòstic i l'evolució clínica de les lesions isquèmiques vasculars a extremitats inferiors (227). La determinació de la diferència entre la SaO₂ entre l'extremitat superior i l'inferior, s'ha investigat com a mètode de detecció d'arteriopatia perifèrica en la població general, amb resultats controvertits (228,229). Joyce i cols. van descriure que els pacients amb vasculopatia perifèrica simptomàtica presentaven uns valors de pulsioximetria a extremitats inferiors significativament disminuïts (228). Un altre estudi en què Jawahar i cols. van comparar la pulsioximetria amb l'índex turmell-braç en un grup de malalts amb clínica de vasculopatia perifèrica, la pulsioximetria no va detectar al 84% de pacients amb un índex turmell-braç patològic de 0,5 a 0,9, ni al 46% d'aquells amb un índex turmell-braç < 0,5 (229). Només existeix un estudi realitzat en pacients amb vasculopatia diabètica assintomàtica, en el què es va comparar la pulsioximetria (230) amb l'índex turmell-braç com a tècnica de cribatge. En aquest estudi la pulsioximetria tenia una bona concordança amb l'índex turmell-braç, i augmentava la seva sensibilitat quan ambdues tècniques s'utilitzaven en el cribatge de la malaltia. Aquests autors van proposar la pulsioximetria com a eina alternativa a l'índex turmell-braç pel cribatge de l'arteriopatia perifèrica diabètica (230). Tanmateix, un estudi experimental recent demostra que el mesurament de la SaO₂ no sempre reflexa la perfusió tissular, ja que podria estar disminuïda com a conseqüència d'una resposta adrenèrgica (231).

3. HIPÒTESI DE TREBALL

Es plantegen les següents hipòtesis que seran desenvolupades en els corresponents articles publicats.

3.1 Paper de la metaloproteïnasa PAPP-A en la DM2.

S'ha suggerit que les concentracions perifèriques de PAPP-A reflecteixen una resposta reparadora a nivell de la placa arterioscleròtica, a través de la seva acció reguladora de l'IGF-I local. L'expressió de PAPP-A podria modificar-se en funció del control glicèmic.

Primera hipòtesi: els pacients diabètics tindrien alterada aquesta resposta reparadora en funció del control glicèmic, independentment d'altres factors, com el control lipídic.

3.2 Relació de la metaloproteïnasa PAPP-A amb l'arteriosclerosi carotídia i la morfologia de les plaques carotídies en la DM2.

S'ha descrit que les concentracions perifèriques de PAPP-A reflecteixen una resposta reparadora a nivell de la placa arterioscleròtica, a través de la seva acció reguladora de l'IGF-I local. Els pacients amb aterosclerosi carotídia tindrien alterat aquest mecanisme reparador local de l'eix IGF-I/PAPP-A.

Segona hipòtesi: la disminució sèrica de PAPP-A i d'IGF-I s'associaria a un augment de l'engruiximent íntima-mitja carotídia i amb la presència de plaques carotídies, sobretot hipoecogèniques o inestables, podent-se utilitzar com a marcadors sèrics d'arteriosclerosi carotídia en la DM2 en la pràctica clínica.

3.3 Relació dels polimorfismes de les GP implicades en l'adhesió, agregació i activació plaquetària amb el procés d'arteriosclerosi a la DM2.

L'existència de polimorfismes plaquetaris protrombòtics, individualment o en associació, en alguns pacients amb DM2, explicaria el major risc d'arteriosclerosi (tant en fase inicial de plaques carotídies subclíniques, com en fase d'arteriotrombosi clínica), que tindrien aquells portadors d'aquesta variabilitat genètica.

Tercera hipòtesi: l'arteriosclerosi prematura i les trombosis arterials en els pacients diabètics amb un genotip predisposant, podrien ser degudes a una major adhesió plaquetària a zones vasculars concretes, donat que això tindria un efecte protrombòtic sobreafegit a la resta d'accions de la diabetis sobre l'hemostàsia o la biologia vascular.

3.4 Utilització de l'oximetria de pols com a mètode de cribatge d'aterosclerosi subclínica en pacients amb DM2

Donat que l'aterosclerosi és una malaltia sistèmica i que l'oximetria de pols s'ha proposat com a eina alternativa a l'índex turmell-braç en el cribatge de la vasculopatia perifèrica diabètica.

Quarta hipòtesi: la pulsioximetria podria ser una tècnica eficaç per detectar pacients amb DM2 que presentin arteriosclerosi subclínica avaluada en el territori carotídi.

4. OBJECTIUS DE L'ESTUDI

L'objectiu principal de l'estudi va ser analitzar en un grup de pacients amb DM2, diferents factors de risc de progressió d'aterosclerosi, en fase subclínica i clínica de la malaltia. S'estudia l'aspecte genètic, amb la determinació simultània de polimorfismes plaquetaris de possible risc trombogènic, marcadors inflamatoris i protrombòtics, i s'avaluen mesures clíniques de diagnòstic precoç d'aterosclerosi, comparant l'ecografia carotídia amb l'índex turmell-braç i l'oximetria de pols.

D'aquesta manera s'ha volgut fer una aproximació multifactorial al procés de l'aterosclerosi des del punt de vista fisiopatològic (estudi de plaquetes i marcadors implicats en la patogènia de la inflamació, estat de resistència a la insulina i protrombosi que caracteritzen a la DM2) fins a l'aspecte més pràctic de la clínica habitual de l'endocrinologia, com és el trobar eines diagnòstiques d'aterosclerosi en fases precoces, que siguin fàcils i assequibles.

Als apartats següents es descriuen en detall els objectius plantejats en la població estudiada, d'acord als treballs publicats en ordre cronològic.

4.1 Estudiar la relació de la metaloproteïna PAPP-A amb el control glicèmic i amb els paràmetres inflamatoris i hemostàtics en la DM2.

- Estudiar la distribució fisiològica de PAPP-A en funció del sexe, en un grup de subjectes control no diabètics i en pacients amb DM2 sense malaltia cardiovascular prèvia.
- Comparar les concentracions de PAPP-A i de paràmetres inflamatoris i protrombòtics, entre els controls i els pacients amb DM2 sense malaltia cardiovascular prèvia.

- Estudiar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i el control glicèmic en pacients amb DM2 i sense malaltia cardiovascular prèvia, tenint en compte el control lipídic.
- Estudiar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i altres factors inflamatoris i protrombòtics en pacients amb DM2.

Els objectius s'han assolit i han estat publicats en l'article:

Pellitero S, Reverter JL, Pizarro E, Pastor MC, Granada ML, Tàssies D, Reverter JC, Salinas I, Sanmartí A. Pregnancy-associated plasma protein-a levels are related to glycemic control but not to lipid profile or hemostatic parameters in type 2 diabetes. Diabetes Care. 2007; 30(12):3083-5

4.2 Estudiar la relació de l'eix PAPP-A/IGF-I amb l'aterosclerosi carotídia en pacients amb DM2 i control glicèmic estable

- Analitzar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i d'IGF-I amb la presència de plaques carotídies en pacients amb DM2.
- Analitzar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i d'IGF-I amb la morfologia de les plaques carotídies en pacients amb DM2.
- Estudiar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i d'IGF-I amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia en pacients amb DM2.
- Estudiar l'associació entre les concentracions plasmàtiques de PAPP-A i d'IGF-I amb altres factors inflamatoris (citocines, PCRus i adiponectina) i protrombòtics (fibrinogen, PAI-1) en pacients amb DM2.
- Analitzar la relació d'aquests marcadors inflamatoris i protrombòtics amb la presència de plaques carotídies en pacients amb DM2.

Els objectius s'han assolit i han estat publicats en l'article:

Pellitero S, Reverter JL, Granada ML, Pizarro E, Pastor MC, Tàssies D, Reverter JC, Salinas I, Sanmartí A. Association of the IGF1/pregnancy-associated plasma protein-A system and adipocytokine levels with the presence and the morphology of carotid plaques in type 2 diabetes mellitus patients with stable glycaemic control. Eur J Endocrinol. 2009;160(6):925-32

4.3 Estudi de la distribució dels polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries Ib (receptor del factor von Willebrand), Ia/IIa (receptor del col·lagen) i Iib/IIIa (receptor del fibrinogen) en pacients afectes de DM2 en funció de la presència d'aterotrombosi arterial clínica i d'aterosclerosi carotídia subclínica, i en comparació amb controls no diabètics sense malaltia cardiovascular

- Estudiar la distribució del polimorfisme de longitud de la GP Ib-alfa (VNTR), el polimorfisme de densitat de la GP Ia/IIa (807 C/T) i el polimorfisme $PI^{A1/A2}$ de la GP Iib/IIIa de les plaquetes en pacients diabètics i controls no diabètics, per comparar la seva distribució genotípica.
- Correlacionar els polimorfismes genètics descrits de les GP Ib-alfa, Ia/IIb i Iib/IIIa amb la presència de trombosi arterial en pacients amb DM2.
- Correlacionar els polimorfismes genètics descrits de les GP Ib-alfa, Ia/IIb i Iib/IIIa amb la presència d'arteriosclerosi carotídia subclínica en pacients amb DM2.

- Avaluar la relació dels polimorfismes genètics descrits de les GP Ib-alfa, Ia/IIb i IIb/IIIa amb els marcadors d'activitat plaquetària PDGF i TGF- β 1 en pacients amb DM2.
- Avaluar la relació de l'índex turmell-braç, les concentracions de factors inflamatoris (citocines, PCRus, adiponectina) i trombòtics (fibrinogen, PDGF i TGF- β 1) en pacients amb DM2, comparativament amb controls no diabètics i en funció de la història d' aterotrombosi clínica i d'aterosclerosi carotídia subclínica.

Els objectius s'han assolit i han estat publicats en l'article:

Pellitero S, Reverter JL, Tàssies D, Pizarro E, Monteagudo J, Salinas I, Aguilera E, Sanmartí A, Reverter JC. Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes". Thrombosis and Haemostasis. 2010; 103(3): 630-637

4.4 Estudiar la utilitat de l'oximetria de pols i de l'índex turmell-braç com a eines de cribatge d'aterosclerosi carotídia en pacients amb DM2

- Avaluar l'eficàcia de l'oximetria de pols per detectar pacients amb DM2 i aterosclerosi subclínica avaluada per ecografia carotídia.
- Avaluar l'eficàcia de l'índex turmell-braç per detectar pacients amb DM2 i aterosclerosi subclínica avaluada per ecografia carotídia.
- Avaluar la relació de les concentracions de factors inflamatoris (citocines, PCRus, adiponectina) i protrombòtics (fibrinogen) amb la presència de lesió arteriosclerosa carotídia, l'índex turmell-braç i l'oximetria de pols.

- Avaluar la relació entre l'engruiximent íntima-mitja carotídia i l'ecogenicitat de les plaques carotídies amb l'índex turmell-braç i l'oximetria de pols.

Els objectius s'han assolit i han estat publicats en l'article:

Pellitero S, Reverter JL, Pizarro E, Granada ML, Aguilera E, Sanmartí A. Utilidad de la pulsioximetría en el cribado de la aterosclerosis carotídea en pacientes afectados de diabetes mellitus tipo 2. Med Clin (Barc). 2010. doi:10.1016/j.medcli.2009.11.041.

5. MATERIAL I MÈTODES

5.1. SUBJECTES D'ESTUDI:

5.1.1 Grup control:

Els subjectes sans van ser voluntaris del personal sanitari de l'Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona i de l'Hospital de Mataró, que fossin no diabètics i sense història de malaltia d'arteriosclerosi clínica o trombòtica, autoimmunitària, hemorràgica, o d'avortaments de repetició. Els subjectes del grup control van ser comparables per edat, sexe i ètnia amb els pacients diabètics inclosos a l'estudi.

5.1.2 Pacients diabètics:

Es van incloure pacients amb DM2 procedents de dos centres hospitalaris (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona i Hospital de Mataró) de l'àrea sanitària del Barcelonès Nord i Maresme respectivament, entre febrer i juny del 2006. Es van reclutar pacients amb DM2 que acudien de manera consecutiva a control a les consultes externes d'Endocrinologia. El diagnòstic de DM2 fou realitzat d'acord als criteris de l'*American Diabetes Association* del 1997. Els criteris d'inclusió van ser: pacients diabètics en tractament amb dieta o antidiabètics orals al diagnòstic de la diabetis i amb absència d'anticossos contra la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD); absència de vasculopatia perifèrica simptomàtica (història de claudicació intermitent o amputació); absència de clínica d'agudització de malaltia cardiovascular durant els sis mesos previs a la inclusió; absència de malaltia inflamatòria sistèmica crònica i d'història activa o prèvia de neoplàsia, i absència de gestació. Va ser criteri d'exclusió una hemoglobina

glicosilada (HbA_{1c}) >7,5% en alguna determinació durant els 12 mesos previs. El protocol d'estudi fou aprovat pel Comitè Ètic de l'hospital.

5.2. MÈTODES

5.2.1 Dades clíniques:

En tots els pacients es va realitzar una història clínica completa i es va determinar la talla, el pes, l'IMC (pes en kg/talla en m²), el perímetre de cintura en centímetres, la pressió arterial sistòlica (PAS) i diastòlica (PAD) en mmHg (mitja de 2 determinacions amb un interval de 5 min, amb el subjecte en sedestació, amb monitor automàtic Omron®).

L'índex turmell-braç va ser determinat, després d'un repòs de mitja hora, mitjançant un ecògraf Doppler portàtil (Mini-Doppler, model ES-100X; Hadecco Inc®; Kawasaki, Japan) amb una freqüència d'emissió de 8 MHz i un esfigmomanòmetre de mercuri calibrat. Es va mesurar la PAS a la arteria tibial posterior i pèdia d'ambdues extremitats inferiors, i a l'arteria braquial d'ambdues extremitats superiors. El valor de l'índex turmell-braç per cada una de les extremitats inferiors fou el resultat de dividir la major PAS obtinguda en cada extremitat inferior (artèria tibial posterior o pèdia) entre la PAS major de qualsevol de les extremitats superiors. Es va utilitzar el valor de l'extremitat amb un menor índex turmell-braç per cada pacient. Es va considerar patològic quan l'índex turmell-braç era inferior a 0,9. Els pacients amb un índex turmell-braç superior a 1,3 es van excloure per evitar falses elevacions per calcificació arterial.

La SaO₂ a les extremitats determinada mitjançant l'oximetria de pols es va mesurar utilitzant un oxímetre Onyx 9500 (Nonin Medical Inc®. Plymouth, MN, USA). La SaO₂ es va mesurar a nivell del segon dit d'ambdues mans i el primer dit d'ambdós

peus, en decúbit supí i amb una elevació dels peus d'uns 30 cm amb el genoll estès. Es va considerar patològic si la SaO₂ mesurada als peus era inferior en més d'un 2% a la SaO₂ més elevada dels dits de les mans, o si la SaO₂ mesurada als dits dels peus disminuïa més d'un 2% amb l'elevació de l'extremitat inferior respecte al valor en posició supina (231).

La presència de malaltia macrovascular es va considerar si el pacient tenia història prèvia d'infart agut de miocardi, angor, ictus o arteriopatia perifèrica. La nefropatia diabètica fou avaluada en funció de l'excreció urinària d'albúmina (EUA) en orina de 24 hores en almenys dos de tres mostres consecutives. Es va considerar normoalbuminúria si la EUA fou inferior a 30 mg/24h, microalbuminúria si era de 30 a 300 mg/24h i proteinúria si era superior a 300 mg/24h. La retinopatia diabètica va ser avaluada amb càmera de retinografia no midriàtica, funduscòpia i/o angiografia fluorescència quan es considerava oportú, per un oftalmòleg especialitzat. La HTA es va definir com una PAS superior a 140 mmHg i/o una PAD superior a 90 mmHg o quan el pacient prenia algun fàrmac antihipertensiu. La hipercolesterolèmia es va definir com un colesterol total superior a 5,13 mmol/L o quan el pacient prenia algun fàrmac hipolipemiant.

5.2.2 Dades analítiques bioquímiques i hormonals:

L'extracció de sang es va realitzar al matí en dejuni amb l'individu assegut després d'un repòs de 30 minuts sense venooclusió. Dels pacients i controls es van obtenir per punció venosa mostres de sang en tubs amb EDTA i citrat sòdic, com a anticoagulants per l'obtenció de plasma, i tubs sense aditius, per la obtenció de sèrum.

Es van separar al.líquotes de sang total per l'obtenció de DNA. Les mostres de plasma i sèrum es van obtenir després de centrifugar durant 15 minuts.

Es van determinar en plasma la glucosa, el colesterol total, el colesterol lligat a les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL-c), els triglicèrids (TG) per tècniques rutinàries de bioquímica, immediatament després de la extracció. El colesterol no-HDL es va calcular com la diferència entre el colesterol total i l'HDL-c. La glucosa es va determinar pel mètode enzimàtic de glucosa-hexoquinasa utilitzant un autoanализador Modular (Roche Diagnostics, GmbH®, Mannheim, Germany). Les concentracions d'insulina van ser determinades mitjançant un immunoassaig automatitzat d'electroquimioluminiscència (Modular E, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Germany), amb una sensibilitat de 0,2 mUI/L. Els coeficients de variació interassaig van ser de 2,5%, 2,8% i 2,1 per una insulinèmia mitja de 6,4 mUI/L, 20,9 mUI/L i 88 mUI/L. Pel càlcul de la insulinoresistència es va utilitzar l'índex *HOMA*, que fou calculat a partir de les concentracions plasmàtiques en dejú d'insulina i glucosa [insulina (mU/l) x glucosa (mmol)/22,5] (232). La HbA_{1c} fou mesurada en mostres sanguínies amb EDTA per cromatografia líquida d'alta pressió utilitzant l'anализador automatitzat Adams A_{1c} HA-8160 (Arkray®, Kyoto, Japan) amb un coeficient de variació interassaig de 1,8% i 1,5% per una HbA_{1c} de 4,8% i 9,0%, respectivament (interval de referència: 4,0-6,0 %). La PCRus es va determinar en sèrum per nefelometria utilitzant BN-ProSpect® (Dade Behring, GMBH, Marburg, Germany) amb un coeficient de variació interassaig de 3,7% i 3,5% per concentracions de PCRus de 2,38 mg/L i 52,2 mg/L, respectivament.

La medicació de la PAPP-A ultrasensible fou realitzada en sèrum per un enzimoimmunoanàlisi (DSL, Active® US PAPP-A ELISA Diagnostic Systems Laboratories INC, Webster, TX, USA), amb un coeficient de variació interassaig de 8,5% i 5,3% per concentracions de PAPP-A de 2,5 mU/L i 10 mU/L, respectivament.

Les concentracions sèriques del TNF- α i de la IL-6 es van determinar amb un assaig immunomètric quimioluminiscent (Immulite One[®], DPC, Los Angeles, CA, USA). El coeficient de variació interassaig per TNF- α fou de 2,5% i 4,8% per concentracions de TNF- α de 96 pg/mL i de 567 pg/mL, respectivament. El coeficient de variació interassaig per IL-6 fou de 3,7% i de 5,9% per concentracions de IL-6 de 78 pg/mL i 459 pg/mL, respectivament.

Les concentracions sèriques d'adiponectina van ser mesurades utilitzant un radioimmunoanàlisi comercial de doble anticòs (Linco Research[®], Inc., St Louis, MO, USA). Els coeficients de variació intra e interassaig foren inferiors a 6,2% i a 9,2% respectivament, a concentracions mitjanes d'adiponectina de 3 μ g/mL, 6 μ g/mL i 15 μ g/mL. La sensibilitat de l'anàlisi fou de 1 μ g/mL. Totes les mostres de plasma van ser diluïdes a 1: 250 per obtenir un interval efectiu de 0,2-50 μ g/mL.

Les concentracions sèriques d'IGF-I van ser mesurades amb un assaig immunomètric quimioluminescent (Immulite[®] 2000, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA), amb una sensibilitat de 25 μ g/L. Els coeficients de variació intraassaig van ser de 6,3%, 3,9 % i 3,0 i els d'interassaig de 7,5 %, 3,5% i 4,0 % per concentracions d'IGF-I de 78,2 μ g/L, 247,3 μ g/L i de 552,8 μ g/L, respectivament.

5.2.3 Dades analítiques. Estudi d'hemostàsia:

El temps de protrombina i de tromboplastina parcial activada van ser determinats pel mètode automatitzat CA 1500 (Dade Behring[®], Marburg, Germany) utilitzant reactius estàndards (Thromborel and Actin FSL; Dade Behring[®]) i es van expressar com quocients (temps del pacient / temps del control). El fibrinogen fou determinat per la tècnica de Clauss (233) i el PDGF i el TGF- β 1 mitjançant una tècnica

d'ELISA (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA). El PAI-1 també va ser mesurat per ELISA (Trinity Biotech®, St Louis, MO, USA).

L'activitat de la proteïna C i de l'antitrombina, la proteïna S total i lliure, es van realitzar mitjançant tècniques cromogèniques i d'ELISA per descartar un dèficit d'aquestes proteïnes com factor de risc trombòtic. La mutació del factor V Leiden i la G20210A del gen de la protrombina es va realitzar per RCP (reacció en cadena de la polimerasa). Pel Factor V Leiden el DNA es va amplificar amb oligonucleòtids específics de la zona de la mutació dels que un està modificat per introduir un lloc diana per l'enzim de restricció Hind-III si existeix la mutació. El patró de restricció en gel d'agarosa mostra, si el genotip es normal, un sol fragment de 241bp i, si hi ha mutació, dues bandes de 209bp y 22bp. Per la mutació G20210A del gen de la protrombina l'amplificació es va realitzar mitjançant RCP d'un fragment de 345bp de la regió 3'-no codificant del gen de la protrombina utilitzant els oligonucleòtids descrits por Poort (234). Un dels oligonucleòtids estava modificat de manera que introduïa en el producte amplificat un lloc diana per l'enzim de restricció Hind-III en el cas d'existir la mutació. L'anàlisi del producte amplificat i digerit es va realitzar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa. Quan el genotip era normal s'obtenia un sol fragment de 345bp, mentre que quan existia la mutació s'obtenien dues bandes de 322bp i 23bp.

5.2.4 Estudi genètic dels polimorfismes plaquetaris:

El DNA va ser extret de 100 µL de sang total pel mètode de columna de gel (QIAamp DNA blood mini kit, Qiagen GmbH®, Hilden, Germany).

5.2.4.1. Polimorfisme de la GP Ib-alfa (VNTR)

El polimorfisme VNTR de la GP-Ib-alfa va ser determinat per un mètode de RCP descrit, amb poques modificacions (102). Es van utilitzar els oligonucleòtids següents: 5'-ACA CTT CAC ATG GAC TCC AT-3' (posició 1126-1145) i 5'-GGG TCA TTT CTG GAG CTT TC-3' (posició 2044-2025) . La RCP es va dur a terme en un volum de 50 µmL utilitzant un termociclador Techne Progene®. Cada mostra contenia 0.5 mg de DNA genòmic, 30 pM de cada oligonucleòtid, 100 mM de dNTP, 10 mM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂ i 1 U de Taq polimerasa. Cada mostra es va cobrir amb 50 mL d'oli mineral per evitar l'evaporació de la mostra durant l'amplificació. L'amplificació va consistir en 25 cicles de 95°C durant 60 segons, 52°C durant 90 segons i 72°C durant 90 segons. Els fragments obtinguts (520 pb per l'al·lel A, 480 pb per l'al·lel B, 440 pb per l'al·lel C i 400 pb per l'al·lel D) es van separar en un gel d'agarosa al 1,5% (Metaphor®, FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA). Els fragments foren visualitzats amb un transiluminador de U.V. després de la seva tinció amb bromur d'etidi i es van processar amb un analitzador d'imatges informatitzat.

5.2.4.2 Polimorfismes de la GP Ia/IIa (807C/T i 873G/A)

El polimorfisme 807C/T fou analitzat per RCP-RFLP com prèviament s'ha publicat (103). Per l'amplificació del fragment que conté el polimorfisme 807C/T es van utilitzar els oligonucleòtids: 5'-GTG TTT AAC TTG AAC ACA TAT AAA ACC- 3' (posició 715-741) i 5'-GAT TTA ACT TTC CCA GCT GCC TTC-3' (seqüència intrònica). Per l'amplificació del fragment que conté el polimorfisme 873G/A es van utilitzar els oligonucleòtids: 5'-ACC AGA GGT TCT CAT ATT AAC TTC-3' (seqüència intrònica) i 5'-CTC AGT ATA TTG TCA TGG TTG CAT TG-3' (posició 940-965). La RCP es va dur a

terme en cada cas en un volum de 50 µL utilitzant un termociclador Techne Progene®. Cada mostra contenia 0.5 mg de DNA genòmic, 15 pM de cada oligonucleòtid, 100 mM de dNTP, 10 mM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂ i 1 U de Taq polimerasa. Cada mostra es va cobrir amb 50 µL d'oli mineral per evitar l'evaporació de la mostra durant l'amplificació. L'amplificació va consistir en 30 cicles de 95°C durant 45 segons, 50°C durant 45 segons, 72°C per 90 segons i una extensió de 7 minuts a 72°C. Els productes de la RCP van ser digerits amb 10 U de l'enzim de restricció TaqI (Roche Diagnostics® GmbH, Mannheim, Germany) durant 2 hores a 65° C. La detecció es va fer per electroforesi en gel agarosa de 2%. El tamany esperat de les amplificacions fou de una banda de 115pb per l'al·lel T i dos bandes de 92pb 23 pb per l'al·lel C.

5.2.4.3 Polimorfisme de la GP IIb/IIIa (PI^{A1}/PI^{A2}):

Extracció de DNA genòmic com s'ha especificat anteriorment. Per l'amplificació de l'exó 2 del gen de la GPIIIa es van utilitzar els següents oligonucleòtids: 5'-TTC TGA TTG CTG GAC TTC TCT T-3' i 5'- TCT CTC CCC ATG GCA AAG AGT-3'. La RCP es va dur a terme en un volum final de 50 µL. Cada mostra contenia 0.5 µg de DNA genòmic, 10 pM de cada oligonucleòtid, 200 µM de dNTP, 10 µM de Tris HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂ i 2 U de DNA polimerasa. L'amplificació va consistir en 40 cicles de 95°C durant 2 min, 58°C durant 60 seg i 72°C durant 2 min. La detecció es va efectuar mitjançant digestió del producte amplificat amb 20 U de l'enzim de restricció MspI (Roche Diagnostics® GmbH, Mannheim, Germany) durant 16 hores a 37°C. La detecció es va realitzar per electroforesi en un gel d'agarosa al 3%. Els fragments foren visualitzats amb un transiluminador de U.V. després de la seva tinció amb bromur

d'etidi. La grandària esperada de les amplificacions foren de 221 pb i 45 pb, en el cas de l'al·lel PI^{A1}, i de 177pb, 50 pb i 45 pb, en el cas de l'al·lel PI^{A2}.

5.2.5 Avaluació ecogràfica:

Es va dur a terme a tots els pacients. L'exploració ecogràfica es va realitzar amb un ecògraf d'alta resolució en mode B (Acuson Sequoia ®C-256) amb un transductor elèctric lineal (Multifrequency 8L5®). Es van examinar 3 segments predeterminats de les artèries d'ambdós costats: caròtida primitiva (1 cm proximal al bulb carotidi), bifurcació/bulb (1-2 cm) i caròtida interna (1 cm. distal a la bifurcació). Els vasos es van estudiar amb ecografia en temps real i Doppler color mitjançant seccions longitudinals i transversals, amb rotació de 45° del coll del pacient cap el costat contralateral a l'estudiat, i amb el coll en situació neutra i en direcció anteroposterior. En cada estudi es van avaluar l'engruiximent íntima-mitja carotídia i les plaques carotídies d'ateroma, prenent la presència de plaques carotídies com criteri d'aterosclerosi carotídia. L'engruiximent íntima-mitja carotídia, definit com la distància existent entre la interfase llum carotídia-íntima i la interfase mèdia-adventícia de la paret distal, es va determinar a la zona lliure de plaques de la paret posterior de l'artèria caròtida comú (ACC) a 1 cm de la bifurcació, d'acord amb el consens de Mannheim (2004-2006) (200). Els resultats es van expressar com la mitja de 8 determinacions, 4 en cada costat. Les plaques carotídies es van definir com estretaments de la llum arterial de almenys 0,5 mm o un engruiximent focal de l'engruiximent íntima-mitja carotídia amb una altura $\geq 1,5$ mm o superior al 50% de l'engruiximent íntima-mitja carotídia adjacent. L'anàlisi de les plaques carotídies va incloure el nombre de plaques, la seva longitud màxima i les característiques ecoestructurals. El gruix de les plaques carotídies fou mesurat perpendicularment a la

paret arterial al lloc del màxim estretament, com la distància entre la mèdia-adventícia i la superfície de la lesió en la llum arterial. El número de plaques carotídies es va calcular des de 1 a 4 o més de 4 en tots els segments arterials. La morfologia de les plaques carotídies es va expressar en funció del grau d'ecogenicitat com hiperecogèniques, hipoecogèniques o anecoiques. La llum arterial fou utilitzada com estructura de referència per definir la hipoecogenicitat i l'eco produït per la mèdia-adventícia en la paret distal com la de la hiperecogenicitat. Quan varies plaques carotídies es detectaven en el mateix segment arterial, es va utilitzar l'ecogenicitat de l'associada a un major estretament de la llum arterial.

5.3. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Es va utilitzar el paquet estadístic SPSS (SPSS/ Windows version 12, SPSS ® Inc, Chicago, IL, USA) per l'anàlisi de les dades. La distribució normal de les variables es va avaluar mitjançant el test de distribució de Kolmogorov-Smirnov. Les variables descriptives van ser expressades com mitja \pm desviació estàndard (DS) si seguien una distribució normal, i com mitjana (rang interquartil) si no seguien una distribució normal. Les variables categòriques van ser expressades com percentatge i freqüències. Les diferències entre grups es van analitzar amb la t de Student i l'anàlisi de la varianza (ANOVA) per les variables normals, i el test de la U de Mann-Whitney i de Kruskal Wallis per les variables no normals. Les diferències en les proporcions es van analitzar mitjançant el test de la Chi quadrada. Les relacions entre variables quantitatives foren analitzades mitjançant el càlcul dels coeficients de correlació de Pearson o Spearman. L'equació de Hardy-Weinberg fou utilitzada per calcular la distribució genotípica esperable sota l'assumpció d'equilibri. Els números observats de cada genotip van ser comparats amb aquells esperats per una població amb equilibri de Hardy-Weinberg amb

el test de la Chi-quadrada. Es van calcular la odds ratio (OR) i els intervals de confiança (IC) de 95%. Les freqüències al·lèliques es van establir per recompte de gens. La grandària de la mostra va ser calculada utilitzant una correcció basada en l'aproximació normal a una distribució binomial. L'efecte dels polimorfismes va ser analitzat en quatre models assumint un efecte al·lèlic codominant, un efecte additiu, un efecte dominant i un efecte recessiu, respectivament. Es va seleccionar el model amb la millor associació. La significació estadística es va considerar per una $p < 0,05$.

6. INVESTIGACIÓ I RESULTATS.

Estudis publicats (en ordre cronològic)

6.1 Primer estudi

Pregnancy-Associated Plasma Protein-A levels are related to glycemic control but not to lipid profile or hemostatic parameters in type 2 diabetes.

Les concentracions de la proteïna plasmàtica associada a la gestació-A (PAPP-A) estan relacionades amb el control glicèmic però no amb el perfil lipídic o els paràmetres hemostàtics en la diabetes mellitus tipus 2.

Silvia Pellitero, Jordi L. Reverter, Eduarda Pizarro, M. Cruz Pastor, María Luisa Granada, Dolors Tàssies, Juan Carlos Reverter, Isabel Salinas i Anna Sanmartí

Diabetes Care. 2007;30:3083-5

Factor d'impacte 2008: 7,3

6.2 Segon estudi

Association of the insulin-growth factor-i (IGF-I)/ Pregnancy-Associated Plasma Protein-a (PAPP-A) system and adipocytokine levels with the presence and the morphology of carotid plaques in type 2 diabetes mellitus patients with stable glycaemic control

Associació de l'eix IGF-I/ proteïna plasmàtica associada a la gestació-A (PAPP-A) i les concentracions d'adipocitocines amb la presència i la morfologia de les plaques carotídiades en pacients amb diabetis mellitus tipus 2 amb control glicèmic estable

Silvia Pellitero, Jordi L. Reverter, María Luisa Granada, Eduarda Pizarro, M. Cruz Pastor, Dolors Tàssies, Juan Carlos Reverter, Isabel Salinas i Anna Sanmartí

Eur J Endocrinol. 2009;160:925-32.

Factor d'impacte 2008: 3,79

6.3 Tercer estudi

Polymorphisms in platelet glycoproteins Ia and IIIa are associated with arterial thrombosis and carotid atherosclerosis in type 2 diabetes.

Els polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries Ia i IIIa estan associats amb la trombosi arterial i l'arterosclerosi carotídia en la diabetis mellitus tipus 2.

Silvia Pellitero, Jordi L. Reverter, Dolors Tàssies, Eduarda Pizarro, Juan Monteagudo, Isabel Salinas, Eva Aguilera, Anna Sanmartí i Juan Carlos Reverter.

Thrombosis and Haemostasis. 2010; 103: 630-637

Factor d'impacte 2008: 3,80

6.4 Quart estudi

Utilidad de la pulsioximetría en el cribado de la aterosclerosis carotídea en pacientes afectados de diabetes mellitus tipo 2

Silvia Pellitero, Jordi L. Reverter, Eduarda Pizarro, M.Luisa. Granada, Eva Aguilera i Anna Sanmartí.

Med Clin (Barc). 2010. doi:10.1016/j.medcli.2009.11.041

Factor d'impacte 2008: 1,25

7. DISCUSSIÓ CONJUNTA

7.1. Les concentracions de la PAPP-A estan relacionades amb el control glicèmic però no amb el perfil lipídic ni amb els paràmetres hemostàtics en la DM2.

La PAPP-A regula l'expressió local d'IGF-I a través de la proteòlisi de la IGFBP-4, pel que podria estar involucrada en la patogènia de l'aterosclerosi (162,165,169). En treballs realitzats en pacients amb síndrome coronària aguda es va observar que aquests pacients presentaven concentracions de PAPP-A més elevades que els que tenien malaltia coronària estable (166,170,171). També altres treballs posteriors proposen la PAPP-A com marcador pronòstic durant la síndrome coronària aguda (167,171,175). Tanmateix aquests resultats són controvertits donat el fet de que l'IGF-I és una hormona reparadora durant el procés arterioscleròtic i que el seu dèficit es relaciona amb un alt risc cardiovascular (162,168,169,184), com s'ha descrit en la introducció, apartat 2.4.1.

Aquest estudi analitza la relació de la PAPP-A amb el control glicèmic, amb els paràmetres lipídics i hemostàtics, i amb l'índex turmell-braç en un grup de 175 pacients amb DM2 i control glicèmic estable, i ho compara amb un grup de 53 controls no diabètics, aparellats per edat i sexe, i sense història de malaltia cardiovascular.

La concentració sèrica de PAPP-A va ser més elevada en els homes que en les dones, tant en el grup de controls com en els pacients diabètics, d'acord amb resultats previs (167,179). La concentració de PAPP-A no va ser diferent en funció de la presència o absència d'un índex turmell-braç patològic o l'antecedent de microangiopatia diabètica. Per primer cop en un estudi comparatiu entre pacients diabètics i controls, es va observar que els pacients amb DM2, amb un bon control glicèmic promig, presentaven una concentració perifèrica de PAPP-A significativament inferior als controls no diabètics. A més, la concentració de PAPP-A es va correlacionar de manera

negativa i significativa amb la HbA_{1c}. Quan els pacients es van subdividir en funció de la mitja \pm DS de HbA_{1c}, aquells pacients amb una HbA_{1c} superior a 8,2% presentaven una concentració de PAPP-A inferior que els que la tenien inferior a 5,9% o entre 5,9 i 8,2%. No es van observar diferències significatives en la concentració de PAPP-A en funció del control lipídic en els pacients diabètics, ni tampoc en els controls quan es van subclassificar en hiper i normocolesterolèmics. Tampoc es va detectar cap correlació entre la PAPP-A i els paràmetres hemostàtics de coagulació (fragment 1+2 de protrombina, fibrinogen) i de fibrinòlisi estudiats (complex plasmina i antiplasmina).

Els nostres resultats contrasten amb els d'un estudi previ en què els pacients amb DM2 i amb hipercolesterolèmia tenien una concentració de PAPP-A significativament superior a la dels subjectes no diabètics, també amb hipercolesterolèmia (184). Ara bé, aquell estudi no va incloure grup control amb normocolesterolèmia i no es va controlar la influència del control glicèmic sobre l'expressió de PAPP-A, doncs els pacients tenien un control glicèmic deficient i molt variable.

En base a aquests resultats, es conclou que el control glicèmic podria influir en la regulació de l'expressió de la PAPP-A, i donat que l'IGF-I actua com a promotor de la reparació de la lesió arterioscleròtica, l'expressió de la PAPP-A podria reflectir un mecanisme reparador en l'arteriosclerosi, que estaria alterat en la DM2.

7.2 L'associació de l'eix IGF-I/PAPP-A i les concentracions d' adipocitocines amb la presència i la morfologia de les plaques carotídiades en pacients amb DM2 i amb control glicèmic estable

Aquest treball va incloure 125 pacients amb DM2, classificats en dos grups en funció de la presència o absència de plaques carotídiades, amb un perfil glicèmic similar de HbA_{1c} promig inferior a 7,5%. Es descriu, per primer cop a la literatura, que les concentracions perifèriques de PAPP-A i d'IGF-I no són diferents entre els pacients DM2 amb i sense plaques carotídiades, ni tampoc en funció de l'ecogenicitat de les plaques carotídiades. Aquests resultats van ser independents de l'antecedent de malaltia cardiovascular, de microangiopatia diabètica o del control lipídic. Tampoc la PAPP-A es va correlacionar amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia ni amb cap marcador inflamatori (IL-6, TNF- α , PCRus, adiponectina) o hemostàtic (fibrinogen, PAI-1) estudiats.

Els nostres resultats discrepen d'altres que proposen la PAPP-A com a marcador d'aterosclerosi precoç (180,182) i de síndrome coronària aguda (171,175,184). Donat que la PAPP-A regula l'expressió local de l'IGF-I actiu, i que l'IGF-I es considera una hormona reparadora durant el procés arterioscleròtic (168,169), la concentració elevada de PAPP-A, observada durant la síndrome coronària aguda en altres estudis, podria ser conseqüència d'un mecanisme reparador, i no ser la causa de la síndrome coronària aguda, com s'ha postulat. De fet, PAPP-A allibera l'IGF-I de la seva proteïna de unió IGFBP4, expandint les concentracions tissulars de IGF-I durant la isquèmia. Només un estudi previ va descriure en un grup de pacients amb DM2, que la PAPP-A es correlacionava amb l'engruiximent íntima-mitja carotídia (183), contràriament als nostres resultats, si bé incloïa pacients diabètics amb un control glicèmic deficient i molt variable. La principal diferència entre ambdós estudis, és que el nostre va incloure

pacients amb DM2 i un bon control glicèmic, evitant la influència que aquest pugui tenir en la resposta reparadora de PAPP-A/IGF-I sobre la placa d'ateroma. Així en un primer estudi, inclòs en aquest treball de tesi doctoral, que s'ha discutit prèviament, es va descriure que la PAPP-A es correlacionava negativament amb la HbA1c, suggerint que els pacients diabètics amb mal control glicèmic podrien tenir alterat aquest mecanisme reparador local. Tampoc es va observar cap relació entre PAPP-A i l'ecogenicitat de les plaques carotídies, resultat també controvertit a la literatura (180,181).

La falta d'associació observada entre la PAPP-A i coneguts marcadors inflamatoris de la DM2 com la PCR-us, IL-6 i el TNF- α , podria ser deguda al paper reparador complex de l'eix PAPP-A/IGF-I a nivell de la placa arterioscleròtica. En canvi, l'IGF-I es va correlacionar negativament amb la PCR-us, resultat que aniria a favor de que el dèficit d'IGF-I és un factor de risc cardiovascular, com s'ha suggerit prèviament (183).

Per tant, i malgrat la implicació de l'eix IGF-I/PAPP-A en el procés de l'aterosclerosi a nivell local, no podem considerar aquests dos paràmetres com a marcadors sèrics de presència i gravetat de les plaques carotídies en pacients amb DM2 i bon control glicèmic.

7.3 Estudi dels polimorfismes de les glicoproteïnes plaquetàries Ib, IaIIa, IIbIIIa i la trombosi arterial i l'arteriosclerosi subclínica carotídia en la DM2

En aquest treball es descriu la distribució genotípica dels polimorfismes de les GP implicades en els processos d'adhesió i activació plaquetàries, les GP Ib (VNTR), Ia/IIa (807C/T) i IIb/IIIa (PIA¹/A²), en un grup de 229 pacients amb DM2, comparativament amb la d'un grup de 229 controls no diabètics aparellats per sexe, edat i ètnia. També es descriuen les diferències en la distribució individual i associada dels polimorfismes VNTR de la GP Ib, 807C/T de la GP Ia/IIa i PIA¹/A² de la GP IIb/IIIa, en els pacients diabètics en diferents fases del procés de l'aterosclerosi, doncs es van classificar en subgrups en funció de la història d'aterotrombosi prèvia, de la presència d'aterosclerosi carotídia subclínica i l'absència tant d'events aterotrombòtics com d'aterosclerosi subclínica carotídia. Secundàriament, es van estudiar algunes citocines inflamatòries i determinats paràmetres d'activitat plaquetària procoagulant (PDGF i TGF-β1) en funció del polimorfisme present, per relacionar l'activitat i la genètica plaquetària.

Les plaquetes circulants dels pacients diabètics presenten un estat hiperactiu (75). Donat que diferents treballs han descrit que els portadors d'alguns polimorfismes de les GP de la membrana plaquetària són més susceptibles a la trombosi arterial (103,135,136), s'ha postulat que l'alt risc cardiovascular, que presenten alguns pacients diabètics, podria ser degut a que les seves plaquetes siguin genèticament més trombogèniques. Aquesta variabilitat genètica de les GP implicades en l'adhesió i activació plaquetària, conduiria a una "trombocitopatia diabètica", que afavoriria la propagació de les lesions ateroscleroses, amb la formació de trombus arterials.

Els nostres resultats descriuen per primera vegada, que la presència individual de l'al·lel 807T de la GPIa i de l'al·lel PIA² de la GP IIIa és més elevada en els pacients

diabètics que tenen l'antecedent d'arteriotrombosi clínica que els que no tenen. A més, la presència d'ambdós al·lels associats en el mateix pacient, s'associa a un major risc de aterotrombosi, que quan estan presents individualment.

També es descriu per primera vegada que la prevalença de l'associació de l'al·lel 807T de la GPIa i de l'al·lel P1A2 de la GP IIIa és més elevada en els pacients diabètics amb aterosclerosi carotídia subclínica, que en els pacients sense cap antecedent d'arteriosclerosi. En canvi, no es va observar cap associació entre el polimorfisme VNTR de la GPIb i cap fase d'aterosclerosi dels pacients diabètics inclosos al nostre estudi, al igual que altres estudis previs (114,154), si bé aquests estaven realitzats en població no diabètica.

Per tant, es pot concloure que la presència de les variants al·lèliques 807T de la GPIa i P1A² de la GP IIa/IIIa, i sobretot en associació, predisposa al desenvolupament de l'arteriosclerosi i aterotrombosi en la DM2. Aquest fet podria explicar el major risc cardiovascular que tenen alguns pacients amb DM2, no explicable pels factors de risc cardiovascular clàssics. Diferents treballs han mostrat una associació entre els polimorfismes 807T/C de la GP Ia/IIa i P1A¹/P1A² de la GPIIb/IIIa i el risc de trombosi arterial (103,135,136), en població general no diabètica. Tanmateix existeix, discrepància a la literatura (124,127,147,148) que podria explicar-se pel disseny dels estudis, les característiques dels pacients i els objectius avaluats. De fet, els polimorfismes estudiats podrien no ser factors determinants, per sí mateixos, del desenvolupament de l'arteriosclerosi en persones sanes, sinó que serien factors de risc de trombosi, al incrementar la trombogenicitat de les plaquetes, en subjectes que tenen lesions arterioscleroses de base. L'estudi conjunt dels tres polimorfismes plaquetaris proposats com factors determinants de trombosi a la literatura, podria haver permès trobar una associació entre la combinació de l'al·lel 807T de la GPIa i de l'al·lel P1A² de la GPIIIa amb

l'arteriosclerosi carotídia subclínica, no descrita prèviament quan s'estudiaven polimorfismes aïllats.

Un altre resultat a destacar és que no s'observa cap diferència significativa en la distribució genotípica dels polimorfismes de les GP Ib, Ia/IIa, IIb/IIIa entre els pacients diabètics i els controls no diabètics sense malaltia cardiovascular prèvia, d'acord amb alguns treballs (155,156), però no amb d'altres (97). Diferències en la grandària i selecció de les mostres podrien explicar aquests resultats. A més, el fet de que s'hagin inclòs pacients amb DM 2 en diferents fases del procés d'aterosclerosi (des dels que tenien l'antecedent d'algun episodi isquèmic per trombosi arterial, els que tenien plaques arterioscleròtiques carotídies de manera asimptomàtica i els que no tenien cap d'aquests antecedents), com ja s'ha mencionat prèviament, permet comparar el risc de trombogenicitat que comporta un substrat genètic determinat (en aquest cas, els polimorfismes de les GP esmentades) en subjectes que ja tenen un substrat d'arteriosclerosi (en aquest cas, la presència de plaques carotídies o d'arteriotrombosi), fet que no es pot concloure si es comparessin només amb controls sans.

A més, en el present treball, es va observar una associació entre els al·lels 807T i PIA^2 i els marcadors d'activitat plaquetària PDGF i TGF- β 1, suggerint que aquesta variabilitat genètica de les plaquetes podria contribuir a una major activitat plaquetària, expressada amb un major alliberament del contingut dels grànuls plaquetaris en un ambient proateroscleròtic, si bé caldrien estudis d'activitat plaquetària per confirmar aquesta hipòtesi.

7.4 Utilitat de la pulsioximetria en el cribatge de l'aterosclerosi carotídia en pacients afectes de DM2

En aquest treball es va estudiar l'eficàcia de la pulsioximetria per detectar arteriosclerosi subclínica carotídia en pacients amb DM 2 i comparar-ho amb l'índex turmell-braç. Es van incloure 105 pacients amb DM 2 sense història prèvia de vasculopatia perifèrica, classificats en funció de la presència o absència de plaques a l'ecografia carotídia, que fou el criteri considerat com indicador d'aterosclerosi subclínica. La pulsioximetria s'utilitza en el maneig clínic de lesions isquèmiques de les extremitats inferiors (227,228) i s'ha proposat com a tècnica alternativa a l'índex turmell-braç en el cribatge de la malaltia vascular perifèrica diabètica (230), encara que aquest és un resultat no corroborat i contradictori respecte a altres treballs anteriors no realitzats en població diabètica (229).

Els nostres resultats descriuen que l'avaluació per pulsioximetria, tant en la relació mà-pecu, com en la relació decúbit-elevació, no és diferent en funció de la presència o absència de plaques carotídies i d'índex turmell-braç patològic o normal, independentment de la història de macroangiopatia clínica. Tampoc es va observar que l'engruiximent íntima-mitja carotídia es modifiqui en funció de la presència de pulsioximetria patològica o normal. En canvi, es va observar que l'engruiximent íntima-mitja carotídia fou més elevat en els pacients amb plaques carotídies i en els tenen l'índex turmell-braç patològic. A més, els pacients amb plaques carotídies tenien l'índex turmell-braç patològic més freqüentment que els pacients que no les tenien.

De fet, es va observar una correlació negativa entre l'engruiximent íntima-mitja carotídia i l'índex turmell-braç i entre el número de plaques carotídies i l'índex turmell-

braç, en concordança amb els resultats de grans estudis prospectius que situen l'índex turmell-braç com a mètode útil en l'exploració de la macroangiopatia (215,216,219). Tanmateix, la sensibilitat de l'índex turmell-braç per detectar pacients amb plaques carotídies fou baixa, malgrat la correlació significativa que es va observar entre l'índex turmell-braç, i l'engruiximent íntima-mitja carotídia i el número de plaques carotídies.

També es va observar una correlació significativa i positiva entre l'engruiximent íntima-mitja carotídia i el número de plaques carotídies, recolzant la utilització de la determinació de plaques carotídies, alternativa a l'engruiximent íntima-mitja carotídia, com a marcador d'aterosclerosi carotídia (208,210). Per altra banda, es van observar correlacions significatives entre les citocines inflamatòries (IL-6, TNF- α i PCR-us) i entre alguna d'elles, en concret el TNF- α , i el número de plaques carotídies i l'engruiximent íntima-mitja carotídia, confirmant l'associació descrita a la literatura entre aterosclerosi i inflamació (43,60).

Davant d'aquests resultats, i malgrat que la pulsioximetria sigui una tècnica fàcil i accessible als ambulatoris, creiem que no resulta útil en el cribatge de la macroangiopatia central en pacients amb DM2, pel què no seria aconsellable el seu ús de manera sistemàtica. Per altra banda, davant dels resultats obtinguts, concloem que l'índex turmell-braç tindria una sensibilitat disminuïda per detectar pacients amb plaques carotídies, en concordança amb altres estudis publicats (218,223), malgrat la correlació observada entre l'índex turmell-braç i els marcadors d'aterosclerosi carotídia (presència de plaques carotídies i l'engruiximent íntima-mitja carotídia).

8. CONCLUSIONS

1. L'expressió de la metaloproteïna PAPP-A està influenciada pel control glicèmic en els pacients amb DM2.
2. La concentració perifèrica de PAPP-A és inferior en els pacients diabètics que en els controls no diabètics, donat que probablement tenen alterat el mecanisme reparador de l'eix PAPP-A/IGF-I del procés arterioscleròtic.
3. La concentració perifèrica de PAPP-A no és un bon marcador d'aterosclerosi carotídia en els pacients amb DM2.
4. La concentració perifèrica de PAPP-A no es correlaciona amb els marcadors perifèrics inflamatoris estudiats en la DM2, i probablement, la seva determinació no reflexa el seu paper local durant el procés de l'arteriosclerosi.
5. La distribució genotípica de les GP és similar entre pacients diabètics i controls no diabètics, és a dir, la DM2 *per se* no s'associa a cap polimorfisme de les GP implicades en l'adhesió i activació plaquetària.
6. La presència de les variants al·lèliques 807T de la GP Ia i P1A² de la GP IIIa, de manera individual, contribueixen a augmentar el risc de trombosi arterial als pacients amb DM2.
7. La interacció gen-gen de les GP Ia i IIIa contribueix a augmentar el risc de trombosi arterial i d'aterosclerosi subclínica en els pacients amb DM2.

8. Les variants al·lèliques 807T de la GP Ia i P1A² de la GP IIIa s'associen a una major activitat plaquetària, com es reflexa per l'augment d'expressió dels marcadors PDGF i TGF-β1 dels pacients diabètics portadors d'aquestes variants.

9. La pulsioximetria no és una bona tècnica de cribatge d'aterosclerosi subclínica en els pacients amb DM2.

10. L'índex turmell-braç es correlaciona de manera positiva amb marcadors d'aterosclerosi carotídia com són l'engruiximent íntima-mitja carotídia i la presència de plaques carotídies, però té poca sensibilitat com a tècnica de cribatge d'aterosclerosi subclínica als pacients amb DM2.

11. La presència de plaques carotídies en una exploració ecogràfica es confirma com a tècnica alternativa a l'engruiximent íntima-mitja carotídia per l'avaluació de l'aterosclerosi carotídia en els pacients amb DM2.

9. CONCLUSIONS FINALS

- El procés de l'aterotrombosi a la DM2 és multifactorial. El substracte genètic té una gran transcendència i podria explicar les diferències en la gravetat i/o extensió de les lesions vasculars.
- Els polimorfismes de les GP podrien tenir un paper determinant i podrien ser dianes terapèutiques per futurs tractaments per prevenir events aterotrombòtics.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr Atheroscler Rep.* 2004; 6:424-31.
2. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001; 60:329-39
3. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern. Med.* 1998; 128:127-37.
4. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2563-8.
5. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003; 112:1821-30.
6. Charriere G. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003; 278:9850-5.
7. Curat C, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R *et al.* From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages. Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes.* 2004; 53: 1285-92.
8. Fernández-Real JM, Vayreda M, Ricart W, Gutiérrez C, Broch m, Vendrell *et al.* Circulating IL-6 levels, blood pressure and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:1340-4.
9. Pradhan AD, Manson Je, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleucin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001; 286:327-34.
10. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. TNF- α a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 1994; 43:1271-2.

11. Grunfeld C, Feingold KR. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy*. 1991; 3:143-58
12. Cigolini M, Tonoli M, Borgato L, Frigotto L, Manzato F, Zeminian S, *et al.* Expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue: a role for TNF- α ? *Atherosclerosis*. 1999; 143:81-90.
13. Trost S, Pratley R, Sobel B. Impaired fibrinolysis in risk for cardiovascular disease in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2006; 6:47-54.
14. Moller De. Potential role of TNF- α in the patogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000; 11:212-7.
15. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med*. 1996; 334:1717-25.
16. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity- linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259:87-91.
17. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, Sopwith M, Taylor R. Effects of an engineered human anti-TNF- α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*. 1996; 45:881-5.
18. Hotamisligil GS, Murray D, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4854-8.
19. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankison SE, Joshipura K, *et al.* Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and women. *N Engl J Med*. 2004; 351:599-610.
20. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and

- adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145: 2273-82.
21. Arita Y, Kihra S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, *et al.* Paradoxal decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Comm*. 1999; 257:79-83.
 22. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:2764-9.
 23. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, *et al.* Plasma concentrations of a novel adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 2000; 20:1595-981.
 24. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:1930-5.
 25. Weyer C, Yudkin JS, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Pratley RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. *Atherosclerosis*. 2002; 161:233-42.
 26. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001; 7:941-6.
 27. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimosawa N, Hioki K, *et al.* Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and Apo E-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 2461-8.

28. Vionnet N, Hani El H, Dupont S, Gallina S, Francke S, Dotte S, *et al.* Genome wide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000; 67:1470-80.
29. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, *et al.* Proteolytic cleavage product of 30 kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:2005-10.
30. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003; 26:2442-50.
31. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated proteinkinase. *Nat Med.* 2002; 8:1288-95.
32. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H *et al.* Novel modulator of endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100:2473-6.
33. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, *et al.* Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem.* 2002; 277:25863-6.
34. Pickup JC. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:813-23.
35. Liu S, Tinker L, Song Y, Rifai N, Bonds DE, Cook NR, *et al.* A prospective study of inflammatory cytokines and diabetes mellitus in a multiethnic cohort of postmenopausal women. *Arch Intern Med.* 2007; 167:1676-85.

36. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, *et al.* C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon?. *Circulation*. 1999; 100:96-102.
37. Verma S, Devaraj S, Jialal I. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation*. 2006; 113:2135-50.
38. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, *et al.* C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2094-9.
39. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000; 102: 2165-8.
40. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, *et al.* Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*. 2002; 105:1890-6.
41. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation*. 2003; 107:398-404.
42. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*. 2007; 262:157-72.
43. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:3171-82.

44. Ehses JA, Böni-Schnetzler M, Faulenbach M, Donath MY. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans.* 2008; 36:340-2.
45. Festa A, Williams K, Tacy R, Wagenknecht L, Haffner S. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2002; 51:1131-7.
46. Meigs JB, O'donnell CJ, Tofler GH, Benjamin EJ, Fox CS, Lipinska I, *et al.* Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes.* 2006; 55:530-7.
47. Jalovaara K, Santaniemi M, Timonen M, Jokelainen J, Kesäniemi YA, Ukkola O, *et al.* Low serum adiponectin level as a predictor of impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus in a middle-aged Finnish population. *Metabolism.* 2008; 57:1130-4.
48. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009; 302:179-88.
49. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA, Kahn SE, *et al.* Diabetes Prevention Program. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes.* 2008; 57:980-6.
50. Nathan DM: Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328:1676-85.
51. Lüscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation.* 2003; 108:1655-61.

52. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE, McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med.* 2000; 133:81-91.
53. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-26.
54. Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M, Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost.* 1989; 61:370-3.
55. Tracy RP. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: an epidemiologic perspective. *Chest.* 2003; 124:49-57S.
56. Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, *et al.* Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:3399-405.
57. Moreno PR, Fuster V. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44:2293-300.
58. Zumbach M, Hofmann M, Borcea V, Luther T, Kotsch M, Müller M, *et al.* Tissue factor antigen is elevated in patients with microvascular complications of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1997; 105:206-12.
59. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. PAI-1 concentrations in first-degree relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes: metabolic and genetic associations. *Thromb Haemost.* 1997; 77:357-61.
60. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The

- common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 816-23.
61. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, *et al.* Diabetes- induced oxidative stress and low-grade-inflamation in porcine coronary plaques. *Circulation* 2003; 108:472-8.
62. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology.* 2005; 56:173-89.
63. Schneider, DJ, Absher, PM, Ricci, MA Dependence of augmentation of arterial endothelial cell expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by insulin on soluble factors released from vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 96:2868-76.
64. Alessi m, Peiretti F, Morangue P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue. Possible link between visceral fat accumulation and vasclar disease. *Diabetes.* 1997; 46:860-7.
65. Sobel BE. Coronary artery disease and fibrinolysis: from the blood to the vessell wall. *Thromb Haemost.* 1999; 82:8-13.
66. Jax TW, Peters AJ, Plehn G, Schoebel FC. Hemostatic risk factors in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes- a two year follow-up of 243 patients. *Cardiovasc Diabetol.* 2009;8:48.
67. McGill JB, Schneider DJ, Arfken CL, Lucore CL, Sobel BE. Factos responsible for impaired fibrinolysis in obese subjects nad NIDDM patients. *Diabetes* 1993; 43:104-9.
68. Fibrinogen Studies Collaboration, Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, *et al.* Plasma fibrinogen level and the risk

- of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis. *JAMA*. 2005; 294(14):1799-809.
69. Martínez-Vila E, Páramo JA, Beloqui O, Orbe J, Irimia P, Colina I, *et al*. Independent association of fibrinogen with carotid intima-media thickness in asymptomatic subjects. *Cerebrovasc Dis*. 2003; 16:356-62.
70. Palomo I, Alarcón M, Moore-Carrasco R, Argilés JM. Hemostasis alterations in metabolic syndrome. *Int J Mol Med*. 2006;18:969-74.
71. Hadi AR, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health and Risk Manag* 2007;3:853-76.
72. Sagel J, Colwell JA, Crook L, Laimins M. Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1975; 82:733-8.
73. Tschöepe D, Roesen P, Kaufmann L, Schauseil S, Kehrel B, Ostermann H, Gries FA. Evidence for abnormal platelet glycoprotein expression in diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*. 1990;20:166-70.
74. Colwell JA, Nesto RW. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. *Diabetes Care*. 2003; 26:2181-8.
75. Schini-Kerth vB, Bassus S, Fisslthaler B, Kirchmaier CM, Busse R. Aggregating human platelets stimulate the expression of thrombin receptors in cultured vascular smooth muscle cells via the release of transforming growth factor beta-1 and platelet-derived growth factor. *Circulation* 1997; 96:3888-96.
76. Anfossi G, Mularoni EM, Burzacca S, Ponziani MC, Massucco P, Mattiello L, *et al*. Platelet resistance to nitrates in obesity and obese NIDDM, and normal platelet sensitivity to both insulin and nitrates in lean NIDDM. *Diabetes Care*. 1998; 21:121-6.

77. Vinik AI, Erbas T, Park TS, Nolan R, Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24:1476-85.
78. Martina V, Bruno GA, Trucco F, Zumpano E, Tagliabue M, Di Bisceglie C, *et al*. Platelet cNOS activity is reduced in patients with IDDM and NIDDM. *Thromb Haemost*. 1998; 79:520-2.
79. Schneider DJ. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:525-7.
80. De Cristofaro R, Rocca B, Vitacolonna E, Falco A, Marchesani P, Ciabattoni G, *et al*. Lipid and protein oxidation contribute to a prothrombotic state in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2003;1:250-6.
81. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davì G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:1282-91.
82. El Haouari M, Rosado JA. Platelet signalling abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus: a review. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 41:119-23.
83. Randriamboavonjy V, Fleming I. Insulin, insulin resistance, and platelet signaling in diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32:528-30.
84. Davì G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, *et al*. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990; 322:1769-74.
85. Davì G, Gresele P, Violi F, Basili S, Catalano M, Giammarresi C, *et al*. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation*. 1997; 96:69-75.

86. Eibl N, Krugluger W, Streit G, Schratlbauer K, Hopmeier P, Schernthaner G. Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34:205-9.
87. Yngen M, Norhammar A, Hjerdahl P, Wallén NH. Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty. *Diab Vasc Dis Res.* 2006; 3:52-6.
88. Byrne CD. Triglyceride-rich lipoproteins: are links with atherosclerosis mediated by a procoagulant and proinflammatory phenotype? *Atherosclerosis.* 1999; 145:1-15.
89. Tarnow I, Michelson AD, Barnard MR, Frelinger AL 3rd, Aasted B, Jensen BR, *et al.* Nephropathy in type 1 diabetes is associated with increased circulating activated platelets and platelet hyperreactivity. *Platelets.* 2009; 20:513-9.
90. Tschoepe D, Roesen P, Esser J, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, *et al.* Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* 1991; 17:433-8.
91. Stratmann B, Tschoepe D. Pathobiology and cell interactions of platelets in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2005; 2:16-23.
92. Tschoepe D, Roesen P, Schwippert B, Gries FA. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost.* 1993; 19:122-8.
93. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Jackson SP. Calpain regulation of integrin alpha IIb beta 3 signaling in human platelets. *Platelets.* 2000; 11:189-98.
94. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, *et al.* Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2000; 26:163-75.

95. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:216-29.
96. Varughese GI, Tomson J, Lip GY. Type 2 diabetes mellitus: a cardiovascular perspective. *Int J Clin Pract.* 2005; 59:798-816.
97. Tschoepe D, Menart B, Ferber P, Altmann C, Haude M, Haastert B, *et al.* Genetic variation of the platelet- surface integrin GPIIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2003; 46:984-9.
98. Nurden AT. Polymorphisms of human platelet membrane glycoproteins: structure and clinical significance. *Thromb Haemost.* 1995; 74:345-51.
99. Páramo JA, Lecumberri R, Orbe J. Arterial thrombosis and genetic polymorphisms: too many actors, complex scenario. *Med Clin (Barc).* 2005;124:69-74.
100. Moroi M, Jung SM, Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib. *Blood.* 1984; 64:622-9.
101. Ishida F, Fyrihata K, Ishida K, Yan J, Kitano K, Kiyosawa K, *et al.* The largest variant of platelet glycoprotein Ibalpha has four tandem repeats of 13 amino acids in the macroglycopeptide region and a genetic linkage with methionine. *Blood* 1995; 86:1356-60.
102. Kunicki T, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha2-beta1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha2 gene coding sequence. *Blood.* 1997; 89:1939-43.
103. Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, *et al.* Association of two silent polymorphisms of platelet

- glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet*. 1999; 353:351-4.
104. Martinelli N, Trabetti E, Pinotti M, Olivieri O, Sandri M, Friso S, *et al.* Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients with advanced coronary atherosclerosis. *PLoS One*. 2008; 3:e1523.
105. Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. *Blood Coagul Fibrinol*. 1994; 5:97-119.
106. Meyer D, Girma JP. Von Willwbrand factor: structure and function. *Thromb Haemost*. 1993; 70:99-104.
107. Kunicki TJ. The influence of platelet collagen receptor polymorphisms in hemostasis and thrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:14-20.
108. Murata M, Matsubara Y, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, *et al.* Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation. *Circulation*. 1997; 96:3281-6.
109. Ishida F, Furihata K, Ishida K, Kodaira H, Han KS, Liu DZ, *et al.* The largest isoform of platelet membrane glycoprotein-Ib- α is commonly distributed in eastern Asian populations. *Thromb Haemost*. 1996; 76:245-7.
110. Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Corral J, Iniesta JA, Moraleda JM, *et al.* Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha associated with arterial thrombotic disease. *Blood*. 1998; 92:2771-6.
111. Zhang Y, Wang Y, Wang Y, Cui C, Huang P, Li X, *et al.* Platelet glycoprotein polymorphisms: risk, in vivo expression and severity of atherothrombotic stroke in Chinese. *Clin Chim Acta*. 2007; 378: 99-104.

112. Ozelo MC, Origa AF, Aranha FJ, Mansur AP, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF; *et al.* Platelet glycoprotein Ibalpha polymorphisms modulate the risk for myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 2004; 92:384-6.
113. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa Pl^a and GP Ib variable number tandem repeat polymorphisms and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1124-31.
114. Ito T, Ishida F, Shimodaira S, *et al.* Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Ib alpha and plasma von Willebrand factor antigen in coronary artery disease. *Int J Hematol.* 1999; 70:47-51.
115. Afshar-Kharghan V, Matijevic-Aleksic N, Ahn C, Boerwinkle E, Wu KK, López JA. The variable number of tandem repeat polymorphism of platelet glycoprotein Ibalpha and risk of coronary heart disease. *Blood.* 2004; 103:963-5.
116. Bennett JS. Molecular biology of platelet membrane glycoproteins. *Blood.* 1990; 27:186-204.
117. Kunicki TJ, Orchekowski R, Annis D, Honda Y. Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets. *Blood.* 1993; 82:2693-703.
118. Corral J, González-Conejero R, Rivera J, Ortuño F, Aparicio P, Vicente V. Role of the 807 C/T polymorphism of the alpha2 gene in platelet GP Ia collagen receptor expression and function--effect in thromboembolic diseases. *Thromb Haemost.* 1999; 81:951-6.
119. Ajzenberg N, Berroeta C, Philip I, Grandchamp B, Ducellier P, Huart V, *et al.* Association of the -92C/G and 807C/T polymorphisms of the alpha2 subunit gene with human platelets alpha2beta1 receptor density. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1756-60.

120. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood*. 1999; 93:2449-53.
121. Casorelli I, De Stefano V, Leone AM, Chiusolo P, Burzotta F, Paciaroni K, *et al.* The C807T/G873A polymorphism in the platelet glycoprotein Ia gene and the risk of acute coronary syndrome in the Italian population. *Br J Haematol*. 2001; 114:150-4.
122. Carlsson LE, Santoso S, Spitzer C, Kessler C, Greinacher A. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. *Blood*. 1999; 93:3583-6.
123. Roest M, Banga JD, Grobbee DE, de Groot PG, Sixma JJ, Tempelman MJ, *et al.* Homozygosity for 807 T polymorphism in alpha(2) subunit of platelet alpha(2)beta(1) is associated with increased risk of cardiovascular mortality in high-risk women. *Circulation*. 2000; 102:1645-50.
124. Lewandowski K, Swierczyńska A, Kwaśnikowski P, Elikowski W, Rzeźniczak M. The prevalence of C807T mutation of glycoprotein Ia gene among young male survivors of myocardial infarction: a relation with coronary angiography results. *Kardiol Pol*. 2005; 63:107-13.
125. Croft SA, Hampton KK, Sorrell JA, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, *et al.* The GPIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction. *Br J Haematol*. 1999; 106:771-6.
126. Morita H, Kurihara H, Imai Y, Sugiyama T, Hamada C, Sakai E, *et al.* Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene

- polymorphism and myocardial infarction in Japanese. An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost.* 2001; 85:226-30.
127. Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE, *et al.* Association of polymorphisms of platelet membrane integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (HPA-1b/PI^{A2}) and $\alpha_2\beta_1$ (α_2807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2005; 3:1522-9.
128. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Vaiopoulos G, Travlou A. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2007;118:189-96.
129. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L *et al.* Platelet GP IIIa PI^A polymorphisms display different sensitivities to agonist. *Circulation.* 2000; 101:1013-8.
130. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, *et al.* A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996; 334:1090-4.
131. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PI^A polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet.* 1996; 348:485-6.
132. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen B α 448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation.* 1997; 96:1424-31.

133. Goldschmidt-Clermont PJ, Coleman LD, Pham YM, Cooke GE, Shear WS, Weiss EJ. Higher prevalence of GP IIIa P1A2 polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123:1223-9.
134. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Penttilä A, Karhunen PJ. Glycoprotein IIIa Pl(A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36:1317-23.
135. Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG; Copenhagen City Heart Study: Platelet glycoprotein IIb/IIIa Pl(A2)/Pl(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42:661-7.
136. Grove EL, Ørntoft TF, Lassen JF, Jensen HK, Kristensen SD. The platelet polymorphism PlA2 is a genetic risk factor for myocardial infarction. *J Intern Med.* 2004; 255: 637-44.
137. Slowik A, Dziedzic T, Turaj W, Pera J, Glodzik-Sobanska L, Szermer P, *et al.* A2 allele of GpIIIa gene is a risk factor for stroke caused by large-vessel disease in males. *Stroke.* 2004; 35:1589-93.
138. Walter DH, Schächinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet.* 1997;350:1217-9.
139. Kastrati A, Schömig A, Seyfarth M, Koch W, Elezi S, Böttiger C, Mehilli J, Schömig K, von Beckerath N. PlA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation.* 1999; 99:1005-10.

140. Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism. *Am Heart J.* 2002; 143:76-82.
141. Ardissino D, Mannucci PM, Merlini PA, Duca F, Fetiveau R, Tagliabue L, *et al.* Prothrombotic genetic risk factors in young survivors of myocardial infarction. *Blood.* 1999; 94:46-51.
142. Oksala NK, Heikkinen M, Mikkelsen J, Pohjasvaara T, Kaste M, Erkinjuntti T, *et al.* Smoking and the platelet fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa PIA1/A2 polymorphism interact in the risk of lacunar stroke and midterm survival. *Stroke.* 2007; 38:50-5.
143. Lopes NH, Pereira AC, Hueb W, Soares PR, Lanz JR, Gersh BJ. Effect of glycoprotein IIIa PIA2 polymorphism on outcome of patients with stable coronary artery disease and effect of smoking. *Am J Cardiol.* 2004; 93:1469-72
144. Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K. Platelet glycoprotein IIIa PIA polymorphism and Japanese diabetic patients with coronary heart disease. *Lancet.* 1996; 348: 1310.
145. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet.* 1997; 349:385-8.
146. Wagner KR, Giles WH, Johnson CJ, Ou CY, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ,. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PIA2 and ischemic stroke risk: the Stroke Prevention in Young Women Study. *Stroke.* 1998; 29:581-5.

147. Zhu MM, Weedon J, Clark LT. Meta-analysis of the association of platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism with myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2000; 86:1000-5.
148. Di Castelnuovo A, de Gaetano G, Donati MB, Iacoviello L. Platelet glycoprotein receptor IIIa polymorphism PLA1/PLA2 and coronary risk: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 626-33.
149. Aleksic N, Juneja H, Folsom AR, Ahn C, Boerwinkle E, Chambless LE, *et al.* Platelet P1(A2) allele and incidence of coronary heart disease: results from the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 2000; 102:1901-5.
150. Sucker C, Scheffold N, Cyran J, Ghodsizad A, Scharf RE, Zotz RB. No evidence for involvement of prothrombotic platelet receptor polymorphisms in acute coronary stent thrombosis. *Int J Cardiol.* 2008; 123:355-7.
151. Wiwanitkit V. PIA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa and its correlation to cerebrovascular diseases: an appraisal. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009; 15:458-60.
152. Fox CS, Larson MG, Corey D, Feng D, Lindpaintner K, Polak JF, *et al.* Absence of association between polymorphisms in the hemostatic factor pathway genes and carotid intimal medial thickness: the Framingham Heart Study. *Stroke.* 2004; 35:e65-7.
153. Pontiggia L, Lassila R, Pederiva S, Schmid HR, Burger M, Beer JH. Increased platelet-collagen interaction associated with double homozygosity for receptor polymorphisms of platelet GPIa and GPIIIa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:2093-8.

154. Carter AM, Mansfield MW, Grant PJ. Polymorphisms of platelet glycoproteins in relation to macrovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1998; 15:315-9.
155. Rieger S, Endler G, Hsieh K, Hsieh K, Lalouschek W. -to: Tschoepe D, Menart B, Ferber P et al. (2003) genetic variation of the platelet surface integrin GP IIb-IIIa (PIA1/A2-SNP) shows a high association with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2004; 47:761-2.
156. März W, Boehm BO, Winkelmann BR, Hoffmann MM; Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. The PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa is not associated with the risk of type 2 diabetes. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study *Diabetologia.* 2004; 47:1969-73.
157. Tsai DH, Jiang YD, Wu KD, Tai TY, Chuang LM. Platelet collagen receptor alpha2beta1 integrin and glycoprotein IIIa Pl(A1/A2) polymorphisms are not associated with nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Kidney Dis.* 2001; 38:1185-90.
158. Pucci L, Lucchesi D, Fotino C, Grupillo M, Miccoli R, Penno G. [Integrin Beta 3 PIA1/PIA2 polimorphism does not contribute to complications in both type 1 and type 2 diabetes]. *G Ital Nefrol.* 2003; 20:461-9.
159. Scaglione L, Gambino R, Lillaz E, Bo S, Cassader M, Pagano G, *et al.* Platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 polymorphism and its relationship with diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Clin Nephrol.* 2000; 53:253-6.

160. Reiner AP, Agardh E, Teramura G, Gaur P, Gaur LK, Agardh CD. Diabetes duration may modify the association between genetic variation in the glycoprotein Ia subunit of the platelet collagen receptor and risk of severe diabetic retinopathy: a working hypothesis. *Thromb Haemost.* 2003; 89:142-8.
161. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part IV: matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation. *Circulation.* 2006; 113:382-5
162. Piñon P, Kaski JC. Inflammation, atherosclerosis and cardiovascular disease risk: PAPP-A, Lp-PLA2 and cystatin C. New insights or redundant information? *Revista Española de Cardiología.* 2006; 59: 247-58.
163. Lawrence JB, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L, Gleich GJ, Hays LG, *et al.* The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:3149-53.
164. Boldt HB, Conover CA. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): a local regulator of IGF bioavailability through cleavage of IGFBPs. *Growth Horm IGF Res.* 2007; 17:10-8.
165. Bayés-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis. *Circulation Research.* 2000; 86:125-30.
166. Bayés-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes. *New Engl J Med.* 2001; 345:1022-9.

167. Cosin-Sales J, Kaski JC, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, *et al.* Relationship among pregnancy-associated plasma protein-A levels, clinical characteristics, and coronary artery disease extent in patients with chronic stable angina pectoris. *Eur Heart J.* 2005; 26:2093-8.
168. Conti E, Andreotti F, Zuppi C. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A as predictor of outcome in patients with suspected acute coronary syndromes. *Circulation.* 2005; 109:e211-2.
169. Crea F, Andreotti F. Pregnancy associated plasma protein-A and coronary atherosclerosis: marker, friend, or foe? *Eur Heart J.* 2005; 26:2075-6.
170. Khosravi J, Diamandi A, Krishna RG, Bodani U, Mistry J, Khaja N. Pregnancy associated plasma protein-A: ultrasensitive immunoassay and determination in coronary heart disease. *Clin Biochem.* 2002; 35:531-8.
171. Lund J, Qin QP, Ilva T, Pettersson K, Voipio-Pulkki LM, Porela P, *et al.* Circulating pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) predicts outcome in patients with acute coronary syndromes but no troponin I elevation. *Circulation.* 2003; 108:1924-6.
172. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M, Ferrer J, Vargas M. Circulating pregnancy-associated plasma protein A is not an early marker of acute myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2005; 38:180-2.
173. Elesber AA, Lerman A, Denktas AE, Resch ZT, Jared Bunch T, Schwartz RS, *et al.* Pregnancy associated plasma protein-A and risk stratification of patients presenting with chest pain in the emergency department. *Int J Cardiol.* 2007; 117:365-9.
174. Laterza OF, Cameron SJ, Chappell D, Sokoll LJ, Green GB. Evaluation of pregnancy-associated plasma protein A as a prognostic indicator in acute coronary syndrome patients. *Clin Chim Acta.* 2004; 348:163-9.

175. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes. Comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 45:229-37.
176. Consuegra-Sanchez L, Petrovic I, Cosin-Sales J, Holt DW, Christiansen M, Kaski JC. Prognostic value of circulating pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and proform of eosinophil major basic protein (pro-MBP) levels in patients with chronic stable angina pectoris. *Clin Chim Acta.* 2008; 391:18-23.
177. Elesber AA, Conover CA, Denktas AE, Lennon RJ, Holmes DR Jr, Overgaard MT, *et al.* Prognostic value of circulating pregnancy-associated plasma protein levels in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J.* 2006; 27:1678-84.
178. Iversen KK, Dalsgaard M, Teisner AS, Schoos M, Teisner B, Nielsen H, *et al.* Usefulness of pregnancy-associated plasma protein a in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2009; 104:1465-71.
179. Cosin-Sales J, Christiansen M, Kaminski P, Oxvig C, Overgaard MT, Cole D, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein A and its endogenous inhibitor, the proform of eosinophil major basic protein (proMBP), are related to complex stenosis morphology in patients with stable angina pectoris. *Circulation.* 2004; 109:1724-8.
180. Beaudeau JL, Burc L, Imbert-Bismut F, Giral P, Bernard M, Bruckert E, *et al.* Serum plasma pregnancy-associated protein A: a potential marker of echogenic carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic hyperlipidemic subjects at high cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb*

- Vasc Biol. 2003; 23: e7-10.
181. Sangiorgi G, Mauriello A, Bonanno E, Oxvig C, Conover CA, Christiansen M, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-a is markedly expressed by monocyte-macrophage cells in vulnerable and ruptured carotid atherosclerotic plaques: a link between inflammation and cerebrovascular events. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47:2201-11.
182. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Increased pregnancy-associated plasma protein-A as a marker for peripheral atherosclerosis: results from the Linz Peripheral Arterial Disease Study. *Clin Chem.* 2006; 52:1096-103.
183. Aso Y, Okumura K, Wakabayashi S, Takebayashi K, Taki S, Inukai T. Elevated pregnancy-associated plasma protein-a in sera from type 2 diabetic patients with hypercholesterolemia: associations with carotid atherosclerosis and toe-brachial index. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 5713-7.
184. Conti E, Carrozza C, Capoluongo E, Volpe M, Crea F, Zuppi C, *et al.* Insuline like growth factor-1 as a vascular protective factor. *Circulation.* 2004; 110:2260-5.
185. Conti E, Volpe M, Carrozza C, Marzo F, Zuppi C, Crea F, *et al.* Pregnancy-associated plasma protein-A and acute coronary syndromes: cause or consequence? *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:1583-4.
186. Janssen JA, Lamberts SW. The role of IGF-I in the development of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: is prevention possible? *Eur J Endocrinol.* 2002; 146:467-77.
187. Juul A, Scheike T, Davidsen M, Gyllenborg J, Jørgensen T. Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic

- heart disease: a population-based case-control study. *Circulation*. 2002; 106:939-44.
188. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Criqui MH, Kritiz-Silverstein D. The prospective association of serum insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-1 levels with all cause and cardiovascular disease mortality in older adults: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:114-20.
189. Colao A, Di Somma C, Spiezia S, Savastano S, Rota F, Savanelli MC, *et al*. Growth hormone treatment on atherosclerosis: results of a 5-year open, prospective, controlled study in male patients with severe growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:3416-24.
190. Gola M, Bonadonna S, Doga M, Giustina A. Clinical review: Growth hormone and cardiovascular risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:1864-70.
191. Martin RM, Gunnell D, Whitley E, Nicolaides A, Griffin M, Georgiou N, *et al*. Associations of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, IGF binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 with ultrasound measures of atherosclerosis and plaque stability in an older adult population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93:1331-8.
192. Kolaczynski JW, Caro JF. Insulin-like growth factor-1 therapy in diabetes: physiologic basis, clinical benefits, and risks. *Ann Intern Med*. 1994; 120:47-55.
193. Stulc T, Malbohan I, Malík J, Fialová L, Soukupová J, Ceska R. Increased levels of pregnancy-associated plasma protein-A in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment. *Am Heart J*. 2003; 146:E21.

194. Zhabin SG, Gorin VS, Judin NS. Review: immunomodulatory activity of pregnancy-associated plasma protein-A. *J Clin Lab Immunol.* 2003; 52:41-50.
195. Consuegra-Sanchez L, Fredericks S, Kaski JC. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2009; 203:346-52.
196. Resch ZT, Simari RD, Conover CA. Targeted disruption of the pregnancy-associated plasma protein-A gene is associated with diminished smooth muscle cell response to insulin-like growth factor-I and resistance to neointimal hyperplasia after vascular injury. *Endocrinology.* 2006;147:5634-40.
197. Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Qin X, Lepäntalo M, *et al.* Immunoassays developed for pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in pregnancy may not recognize PAPP-A in acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 2006; 52:398-404.
198. Greenland P, Abrams J, Aurigemma GP, Bond MG, Clark LT, Criqui MH, *et al.* Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: noninvasive tests of atherosclerotic burden: Writing Group III. *Circulation.* 2000; 10:16-22.
199. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, *et al.* Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). An update on behalf of the Advisory Board of the 3rd and 4th Watching the Risk Symposium, 13th and 15th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, and Brussels, Belgium. *Cerebrovasc Dis.* 2007; 23:75-80.

200. Poredos P, Golob M, Jensterle M. Interrelationship between peripheral arterial occlusive disease, carotid atherosclerosis and flow mediated dilation of the brachial artery. *Int Angiol.* 2003; 22:83-7.
201. Fernández-Miranda C, Grupo Multidisciplinario para el Estudio del Riesgo Cardiovascular. Nuevas perspectivas en la medición del riesgo cardiovascular: exploraciones para detectar la aterosclerosis subclínica y marcadores de inflamación. *Med Clín (Barc).* 2007; 128:344-51.
202. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, Hofman A, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation.* 1997; 96:1432-7.
203. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *New Engl J Med.* 1999; 340:14-22.
204. Touboul PJ, Labreuche J, Vicaud E, Amarencu P; GENIC Investigators. Carotid intima-media thickness, plaques, and Framingham risk score as independent determinants of stroke risk. *Stroke.* 2005; 36:1741-5.
205. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007; 115:459-67.
206. Brohall G, Odén A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med.* 2006; 23:609-16.
207. Bernard S, Sérusclat A, Targe F, Charrière S, Roth O, Beaune J, *et al.* Incremental predictive value of carotid ultrasonography in the assessment

- of coronary risk in a cohort of asymptomatic type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2005; 28:1158-62.
208. Wyman RA, Mays ME, McBride PE, Stein JH. Ultrasound-detected carotid plaque as a predictor of cardiovascular events. *Vasc Med.* 2006; 11:123-30.
209. Ebrahim S, Papacosta O, Whincup P, Wannamethee G, Walker M, Nicolaides AN, *et al.* Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study. *Stroke.* 1999; 30:841-50.
210. Van der Meer IM, Bots ML, Hofman A, del Sol AI, van der Kuip DA, Witteman JC. Predictive value of noninvasive measures of atherosclerosis for incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2004; 109:1089-94.
211. Nordestgaard BG, Grønholdt ML, Sillesen H. Echolucent rupture-prone plaques. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14:505-12.
212. Honda O, Sugiyama S, Kugiyama K, Fukushima H, Nakamura S, Koide S, *et al.* Echolucent carotid plaques predict future coronary events in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:1177-84.
213. Grønholdt ML, Nordestgaard BG, Schroeder TV, Vorstrup S, Sillesen H. Ultrasonic echolucent carotid plaques predict future strokes. *Circulation.* 2001; 104:68-73.
214. Zheng ZJ, Sharrett AR, Chambless LE, Rosamond WD, Nieto FJ, Sheps DS, *et al.* Associations of ankle-brachial index with clinical coronary heart disease, stroke and preclinical carotid and popliteal atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* 1997; 131:115-25.

-
215. Newman AB, Shemanski L, Manolio TA, Cushman M, Mittelmark M, Polak JF, *et al.* Ankle-arm index as a predictor of cardiovascular disease and mortality in the Cardiovascular Health Study. The Cardiovascular Health Study Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:538-45.
216. Tsai AW, Folsom AR, Rosamond WD, Jones DW. Ankle-brachial index and 7-year ischemic stroke incidence: the ARIC study. *Stroke.* 2001; 32:1721-4.
217. Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, Heald CL, Lee RJ, Chambless LE, *et al.* Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *JAMA.* 2008; 300:197-208.
218. Norman PE, Davis WA, Bruce DG, Davis TM. Peripheral arterial disease and risk of cardiac death in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care.* 2006; 29:575-80.
219. Wild SH, Byrne CD, Smith FB, Lee AJ, Fowkes FG. Low ankle-brachial pressure index predicts increased risk of cardiovascular disease independent of the metabolic syndrome and conventional cardiovascular risk factors in the Edinburgh Artery Study. *Diabetes Care.* 2006; 29:637-42.
220. Heald CL, Fowkes FG, Murray GD, Price JF; Ankle Brachial Index Collaboration. Risk of mortality and cardiovascular disease associated with the ankle-brachial index: Systematic review. *Atherosclerosis.* 2006; 189:61-9.
221. Doobay AV, Anand SS. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to predict future cardiovascular outcomes: a systematic review. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1463-9.

222. Lee AJ, Price JF, Russell MJ, Smith FB, van Wijk MC, Fowkes FG. Improved prediction of fatal myocardial infarction using the ankle brachial index in addition to conventional risk factors: the Edinburgh Artery Study. *Circulation*. 2004; 110:3075-80.
223. Bagheri R, Schutta M, Cumararatunge RG, Wolfe ML, Terembula K, Hoffman B, *et al.* Value of electrocardiographic and ankle-brachial index abnormalities for prediction of coronary atherosclerosis in asymptomatic subjects with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2007; 99:951-5.
224. Wyman RA, Keevil JG, Busse KL, Aeschlimann SE, Korcarz CE, Stein JH. Is the ankle-brachial index a useful screening test for subclinical atherosclerosis in asymptomatic, middle-aged adults? *WMJ*. 2006; 105:50-4.
225. Feigelson HS, Criqui MH, Fronck A, Langer RD, Molgaard CA. Screening for peripheral arterial disease: the sensitivity, specificity, and predictive value of noninvasive tests in a defined population. *Am J Epidemiol*. 1994; 140:526-34
226. Young MJ, Adams JE, Anderson GF, Boulton AJ, Cavanagh PR. Medial arterial calcification in the feet of diabetic patients and matched non-diabetic control subjects. *Diabetologia*. 1993; 36:615-21.
227. Bianchi J, Zamiri M, Loney M, McIntosh H, Dawe RS, Douglas WS. Pulse oximetry index: a simple arterial assessment for patients with venous disease. *J Wound Care*. 2008; 17:253-4, 256-8, 260.
228. Joyce WP, Walsh K, Gough DB, Gorey TF, Fitzpatrick JM. Pulse oximetry: a new non-invasive assessment of peripheral arterial occlusive disease. *Br J Surg*. 1990; 77:1115-7.

229. Jawahar D, Rachamalla HR, Rafalowski A, Ilkhani R, Bharathan T, Anandarao N. Pulse oximetry in the evaluation of peripheral vascular disease. *Angiology*. 1997;48:721-4.
230. Parameswaran GI, Brandt K, Dolan J. Pulse oximetry as a potential screening tool for lower extremity arterial disease in asymptomatic patients with diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 2005; 165:442-6.
231. Thorn CE, Matcher SJ, Meglinski IV, Shore AC. Is mean blood saturation a useful marker of tissue oxygenation? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: 1289-95.
232. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28:412-9.
233. CLAUSS A. [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen.]. *Acta Haematol*. 1957;17:237-46.
234. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-703.