

Factores genéticos del sistema hemostático en pacientes jóvenes con infarto agudo del miocardio

Irma Isordia-Salas,* Antonia Lorena Mendoza-Valdez,** Eduardo Almeida-Gutiérrez,***
Gabriela Borrayo-Sánchez***

Resumen

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es la primera causa de muerte en todo el mundo y representa un problema de salud pública en México. El infarto agudo del miocardio (IAM) representa la principal complicación trombótica de la EAC. Aproximadamente 9 % de los nuevos casos está constituido por sujetos menores de 45 años. El IAM se produce por el desarrollo de un trombo en el sitio de la placa aterosclerosa, generando oclusión arterial súbita con isquemia y muerte celular. El IAM resulta de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Existen diversos factores de riesgo modificables como la hipertensión arterial, la diabetes mellitus, el tabaquismo, la obesidad y la hipercolesterolemia asociados con el IAM. Sin embargo, numerosos pacientes con IAM no presentan factores de riesgo modificables. En la última década se han identificado variantes genéticas en las proteínas relacionadas con los sistemas de coagulación y fibrinólisis, receptores plaquetarios, disfunción endotelial, flujo sanguíneo anormal, metabolismo de la homocisteína, estrés oxidativo, los cuales se asocian a desarrollo del IAM. La identificación de los polimorfismos asociados a la enfermedad arterial coronaria permitirá desarrollar mejores estrategias de tratamiento e identificación de individuos con alto riesgo para EAC y medidas preventivas en etapas tempranas.

Palabras clave: Infarto agudo del miocardio, enfermedad aterotrombótica, polimorfismo, marcadores genéticos.

Summary

Coronary artery disease (CAD) is the first cause of death worldwide and represents a public health issue in our country. Acute myocardial infarction (AMI) represents the main thrombotic complication of CAD. Approximately 9% of the new events of MI occur in patients <45 years of age. AMI is produced by development of a thrombus at the site of an atherosclerotic plaque that initiates abrupt arterial occlusion, with ischemia and cell death. AMI results from the interaction of gene-environment factors. There are several modifiable factors such as hypertension, diabetes, smoking, obesity, and hypercholesterolemia associated with AMI. However, in a large number of patients with AMI, modifiable risk factors are not present. In the last decade, several genetic variants (polymorphisms) have been identified associated with AMI in genes related to coagulation proteins, fibrinolytic system, platelet receptors, homocysteine metabolism, endothelial dysfunction, abnormal blood flow and oxidative stress. Identifying the genes associated with CAD will allow us to develop more efficacious treatment strategies and will also help to identify at-risk subjects, thereby enabling the introduction of early preventive measures. Thus, many research efforts continue to address the identification of acquired and inherited risk factors of this complex disease.

Key words: Myocardial infarction, atherothrombotic disease, polymorphism, genetic markers.

* Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital General Regional 1 "Carlos MacGregor Sánchez Navarro".

** Laboratorio Clínico, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

*** Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Instituto Mexicano del Seguro Social, México D. F.

Solicitud de sobretiros:

Irma Isordia-Salas. Apartado Postal B32, Coahuila 5, 06703 México, D. F.
Tel: (55) 5639 5822, extensión 20883.
E-mail: irmaisordia@yahoo.com.mx

Recibido para publicación: 07-05-2009

Aceptado para publicación: 21-08-2009

Introducción

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es la principal causa de muerte en el mundo. En Estados Unidos afecta a más de 13 millones de personas y un adulto muere cada minuto en ese país.¹ En 2007, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática informó como primera causa de muerte a la EAC, con 16.9 % del total de las defunciones en ese año.² La EAC es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales.³ La manifestación clínica más importante de la EAC es el infarto agudo del miocardio (IAM) y se produce con frecuencia por la ruptura de una placa aterosclerosa denominada "vulnerable", constituida

por un gran núcleo lipídico, íntima delgada y remodelación positiva precipitando la aparición del IAM.⁴ Existen tres condiciones que favorecen un estado de hipercoagulabilidad sanguínea asociado al desarrollo de IAM: alteraciones reológicas (turbulencia, bifurcaciones y estenosis), alteraciones en los componentes sanguíneos (plaquetas, proteínas de la coagulación y enzimas fibrinolíticas) y alteraciones vasculares (ruptura de la placa aterosclerosa y disfunción endotelial). Entre los factores ambientales, también denominados *tradicionales*, destacan hipertensión arterial, diabetes mellitus, obesidad, tabaquismo, dislipidemia y sedentarismo.

En la última década se han producido importantes avances en la genética molecular que han permitido identificar numerosos polimorfismos (variaciones genéticas frecuentes en la población) en las proteínas de la coagulación, sistema fibrinolítico, receptores plaquetarios, enzima relajante del endotelio y el metabolismo de la homocisteína, los cuales han demostrado ser un factor de riesgo para IAM en algunas poblaciones.⁵ La contribución de los polimorfismos en el desarrollo de IAM se estima aproximadamente en 20 a 60 %.⁶

Diversos estudios apoyan las bases genéticas de la enfermedad arterial coronaria,⁷ considerando el antecedente familiar de IAM como un factor de riesgo independiente.⁸ Dicho riesgo se incrementa cuando el IAM se presenta en familiares jóvenes.⁹ Aunque se conoce el fenotipo del IAM en sujetos jóvenes, aún existe controversia en determinar con exactitud los polimorfismos asociados, por lo que es importante establecer las variantes genéticas que representan riesgo para su desarrollo. El conocimiento generado tendrá una implicación en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. Debido a lo anterior, se analizarán los polimorfismos que se consideran un factor de riesgo para el IAM en diversas poblaciones del mundo.

Polimorfismos en el sistema hemostático

Fibrinógeno. El fibrinógeno es una glucoproteína producida en el hígado con un peso molecular de 340 kDa y una concentración plasmática de 200 a 400 mg/dl. Consiste en dos monómeros unidos por un puente disulfuro y cada monómero consiste en tres cadenas polipeptídicas codificadas por tres genes distintos: α , β y γ . Se une a la plaqueta mediante las glucoproteínas plaquetarias IIb/IIIa, por lo que tiene gran participación en los procesos trombóticos. Además, tiene un efecto directo sobre la pared vascular y la viscosidad sanguínea. Se ha demostrado una asociación entre el incremento de los niveles circulantes de fibrinó-

geno y el desarrollo de IAM.^{10,11} Los mecanismos que explican la asociación entre el incremento de fibrinógeno y el IAM incluyen un aumento en la formación de fibrina, incremento en la viscosidad sanguínea, hiperagregabilidad plaquetaria, así como incremento en la proliferación de células vasculares endoteliales y musculares lisas.¹² Además, el fibrinógeno es un reactante de fase aguda y posiblemente un indicador de inflamación crónica asociado con aterosclerosis. Existen diversos polimorfismos identificados en los genes que codifican las tres cadenas polipeptídicas α , β y γ , los cuales se asocian con incremento de la concentración de fibrinógeno circulante (> 500 mg/dl). Los más relevantes desde el punto de vista funcional son los situados en la cadena β : Arg448Lis,-148C/T,-455G/A y 854G/A, siendo los dos últimos los de mayor interés fisiopatológico por su asociación con el desarrollo de enfermedad vascular. El genotipo -455AA está presente en 10 a 20 % de la población en general y se correlaciona con un incremento de 10 % de la concentración elevada de fibrinógeno. El polimorfismo -455A se asocia con la progresión de la placa ateromatosa y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria. El ECTIM (*Étude Cas-Témoins sur l'Infarctus du Myocarde*)¹³ demostró asociación entre el polimorfismo -455A y el incremento en el riesgo para IAM, mientras que otras investigaciones no han podido corroborar lo anterior¹⁴ (OR = 0.98, IC 95 % = 0.40-2.40), por lo que la participación del polimorfismo -455G/A con el desarrollo de la enfermedad arterial trombótica aún es controversial.

Factor VII de la coagulación (FVII). Es una glucoproteína de una sola cadena polipeptídica de 406 aminoácidos, con un peso aproximado de 50 mil Daltons, se sintetiza en el hígado y su concentración plasmática es de 500 ng/ml. El FVII es dependiente de vitamina K, transformándose a su forma activada (FVIIa) mediante su unión con el factor tisular (FT). El complejo FT-FVII convierte en su forma activa al factor X (FXa), dando origen al coágulo de fibrina. *Northwick Park Heart Study* describió por primera vez la asociación entre un incremento en la concentración del FVII y el desarrollo de IAM.¹⁰ El polimorfismo Arg (R) 353Gln (Q) en el FVII es un importante determinante genético en la concentración plasmática de dicha proteína y se asocia a decremento de 20 a 25 % en la concentración plasmática del FVII.¹⁵ Diversos estudios^{16,17} demostraron que la concentración plasmática del FVII es menor en sujetos homocigotos para el alelo 353Gln comparados con los homocigotos para el alelo 353Arg. En forma contraria, otros estudios no han podido corroborar la asociación del polimorfismo R/Q353 con IAM o el incremento en la concentración plasmática del FVII en los sujetos con genotipo Arg/Arg.¹⁸

Factor V de la coagulación (FV). El FV es una glucoproteína producida en el hígado, de una sola cadena polipeptídica, con un peso aproximado de 330 kDa. El FV

de la coagulación es un cofactor para la conversión de protrombina a trombina. El FVa es inactivado por la proteína C activada. La resistencia a la proteína C activada (RPCA) es el factor de riesgo más frecuente para el desarrollo de trombosis venosa, siendo el polimorfismo FV Leiden (FVL) la causa de la RPCA hasta en 95 %¹⁹ de los casos. Rosendaal y colaboradores²⁰ informaron un incremento en el riesgo de IAM en mujeres jóvenes portadoras del FVL. En un estudio de cohorte en sujetos sanos, el polimorfismo del factor V denominado G1691A se asoció a trombosis venosa, pero no a IAM o EVC,²¹ en forma contraria a lo encontrado en otras poblaciones, donde el factor FVL representa un importante riesgo para IAM.²² Sin embargo, existen informes relativos a que la interacción del polimorfismo FVL con factores ambientales como el tabaquismo incrementa el riesgo de IAM.²³

Protrombina. También denominada factor II de la coagulación, es precursora de la trombina que convierte el fibrinógeno en monómeros de fibrina. Existe un polimorfismo en el gen de la protrombina que consiste en sustitución de una base de adenina por una guanina en la posición G20210A. Diversos estudios han demostrado que este polimorfismo es factor de riesgo para trombosis venosa. Los portadores del alelo 20210A tienen cuatro veces mayor riesgo de IAM, riesgo que se incrementa en sujetos con antecedentes de tabaquismo. Croft y colaboradores, en 539 pacientes con diagnóstico de IAM, no demostraron una asociación entre el polimorfismo y la enfermedad coronaria.²⁴ Sin embargo, en los sujetos portadores de ambos polimorfismos (FVL y protrombina 20210A) existe incremento del riesgo para IAM hasta cuatro veces mayor comparado con los sujetos portadores de solo uno.²⁵ Dada esta controversia, se requieren más estudios que incluyan mayor número de pacientes para confirmar su asociación.

Polimorfismos en plaquetas. Las plaquetas desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de los síndromes isquémicos coronarios agudos. Poseen receptores en la superficie de su membrana denominados glucoproteínas IIb-IIIa (GPIIb-IIIa), los cuales son determinantes en la agregación plaquetaria. Estos receptores pertenecen a la familia de las integrinas (α IIb β 3) y son altamente polimórficos, lo que frecuentemente produce alteración antigénica de la glucoproteína. Los polimorfismos más frecuentes presentes en estas glucoproteínas son en los receptores para el factor de vonWillebrand (FvW) (GPIb-IX y GPIIb-IIIa), en la proteína receptora para el colágeno (GPIa-IIa o integrina (α 2 β 3) y en el receptor para el fibrinógeno (GPIIb-IIIa).

El polimorfismo PIA1/A2. La glucoproteína más abundante sobre la membrana plaquetaria es el complejo GPIIb-IIIa, presente aproximadamente en 80 mil copias por célula. Las plaquetas inactivadas se unen mediante el complejo GPIIb-IIIa al FvW y al fibrinógeno. Este polimorfismo consiste en

una sustitución de un nucleótido de timina por uno de citosina en la posición 1565 en el exón 2 del gen de la GPIII.²⁶ Esto da como resultado un cambio del aminoácido leucina por uno de prolina. Aproximadamente 25 % de la población del norte de Europa es portadora de por lo menos un alelo PIA2 (PLA1/A2). En 1996 se informó por primera vez una asociación entre IAM y este polimorfismo en pacientes menores de 60 años.²⁷ De igual manera, Carter y colaboradores²⁸ lo relacionaron con el síndrome coronario agudo. En estudios *post mortem*, Mikkelsen y colaboradores²⁹ demostraron incremento en la frecuencia del alelo PIA2 en pacientes con IAM causado por aterotrombosis, comparada con la observada en sujetos con IAM sin trombosis.

Se han realizado numerosos estudios tratando de establecer una asociación entre la presencia del alelo PIA2 y enfermedad arterial coronaria, sin embargo, los resultados aún son contradictorios. Dos estudios importantes, el *Physician's Health Study* y el ECTIM, no corroboraron una asociación entre el polimorfismo PIA2 y EAC. En conclusión, el alelo PIA1/A2 de la GPIIIa confiere un fenotipo trombótico en las plaquetas y un riesgo moderado para el desarrollo de IAM.

Sistema fibrinolítico

Inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (PAI-1). El PAI-1 es el principal regulador del sistema fibrinolítico, cuya función es inhibir el activador del plasminógeno tisular (t-PA). El incremento en los niveles plasmáticos de PAI-1 produce decremento en la actividad del t-PA y, con ello, disminución en la degradación de la fibrina, favoreciendo un estado protrombótico.³⁰ El nivel plasmático de PAI-1 está regulado por factores genéticos y ambientales. El polimorfismo más ampliamente estudiado es el 4G/5G en posición -675 pb de la región promotora del gen del PAI-1. La concentración de PAI-1 también es modificada por la concentración de triglicéridos y de insulina. En nuestra experiencia demostramos que los sujetos portadores del genotipo 4G/4G tienen un incremento de 25 % en el nivel de PAI-1 circulante, en comparación con los del genotipo 5G/5G.³¹ El alelo 4G, de igual manera que el tabaquismo, hipertensión arterial, historia familiar, representa un riesgo independiente para IAM en jóvenes.

Polimorfismos asociados a disfunción endotelial

Hiperhomocisteinemia. Estudios previos han demostrado el incremento de la concentración plasmática de homocisteína

como un factor independiente para el desarrollo de trombo- sis arterial mediante el mecanismo de disfunción endotelial y activación plaquetaria.³² La hiperhomocisteinemia grave se relaciona con errores congénitos en el metabolismo, como la deficiencia de la enzima cistationina- β sintetasa (CBS), mientras que un incremento moderado se asocia el polimorfismo 677 C/T en el gen de la enzima 5,10 metil- tetrahidrofolatorreductasa (MTHFR), debido a que produce una enzima termolábil con disminución en su actividad. No obstante que numerosos estudios identifican una asociación entre el alelo 677T y la enfermedad aterotrombótica, otros no han podido corroborar dicha asociación, por lo que existe controversia al respecto.^{33,34} La diversidad de los datos se debe probablemente a la interacción de la homocisteína con el folato sérico y la concentración de este último podría enmascarar la interpretación de los estudios.

Sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). El óxido nítrico (ON) es producido por el endotelio mediante la conversión de arginina a citrulina y ON, a través de la acción de la enzima eNOS. El ON posee una gran variedad de efectos fisiológicos que convergen para mantener una función endotelial normal, así como una superficie intravascular antitrombótica.

Además, es un factor relajante del músculo liso, regulador del tono vascular, limita la proliferación de las células musculares lisas y la adhesión de leucocitos al endotelio e inhibe la adhesión, activación y agregación plaquetaria. La disfunción endotelial se presenta en etapas tempranas del proceso aterotrombótico y se asocia con disminución en la producción de ON. El gen de eNOS se localiza en el cromosoma 7q35-36 y está constituido por 26 exones.³⁵ El polimorfismo en el gen de eNOS consiste en un cambio de un solo nucleótido de guanina por timina en la posición 894 en el exón 7, que genera sustitución de una glutamina (Glu) por una asparagina (Asp) en la posición 298, originando alteración en la estructura primaria de la proteína. Este aminoácido produce una variabilidad en la estabilidad de la enzima, siendo la forma 298Asp degradada más rápidamente que con la secuencia 298Glu.³⁶ Investigaciones previas identificaron el polimorfismo Asp298Glu como factor de riesgo para el desarrollo de IAM,^{37,38} sin embargo, esto no ha sido confirmado en otros análisis.^{39,40}

Conclusiones

El IAM es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales. Inicialmente solo se consideraban la hipertensión, tabaquismo, obesidad, diabetes, dislipidemia y sedentarismo como factores contribuyentes para el IAM. Sin embargo, en la última década se han sumado esfuerzos para identificar las bases genéticas del IAM, proponiendo

diversos polimorfismos como posibles factores de riesgo para el desarrollo de aterotrombosis.

No obstante los numerosos estudios realizados en el mundo, no ha sido posible determinar con exactitud la participación de cada uno de los polimorfismos en el desarrollo de la enfermedad isquémica coronaria, por lo que se requiere más investigación para establecer la posible interacción gen-gen y gen-medioambiente en cada una de las diversas poblaciones y su contribución en el IAM.

El conocimiento acerca de estas interacciones permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y el apropiado manejo farmacológico de los pacientes con enfermedad coronaria aterotrombótica.

Referencias

1. American Heart Association. Heart disease and stroke statistics 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009;119:e21-e181.
2. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Datos demográficos de mortalidad. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&s=est&c=14742>.
3. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481-3488.
4. Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovascular Pathol* 2004;13:125-138.
5. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. *Genomic Med* 2008;2:7-22.
6. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:216-229.
7. Rissanen AM, Nikkila EA. Coronary artery disease and its risk factors in families of young men with angina pectoris and in controls. *Br Heart J* 1997;39:875-883.
8. Jorde LB, Williams RR. Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variables. *Am J Cardiol* 1988;62:708-713.
9. Sorensen TI, Nielsen GG, Andersen PK, Teasdale TW. Genetic and environmental influences on premature death in adult adoptees. *N Engl J Med* 1988;318:727-732.
10. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, et al. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1986;2:533-537.
11. Heinrich J, Balleisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk: results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb* 1994;14:54-59.
12. Folsom AR. Haemostatic risk factors for atherothrombotic disease: an epidemiologic view. *Thromb Haemost* 2001;86:366-373.
13. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction: The ECTIM Study. *Etude Cas-temoins sur l'Infarctus du Myocarde*. *Circulation* 1996;93:440-449.
14. Siegerink B, Rosendaal FR, Algra A. Genetic variation in fibrinogen: its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2009;7:385-390.

15. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb* 1991;11:540-546.
16. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, et al. Polymorphism in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;338:79-85.
17. Corral J, González-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Vicente V. Genetic polymorphisms of factor VII are not associated with arterial thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9:267-272.
18. Ekström M, Silveira A, Bennermo M, Eriksson P, Tornvall P. Coagulation factor VII and inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007;18:473-477.
19. Dahlback B. Resistance to activated protein C caused by the factor V R506Q mutation is common risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1997;78:483-488.
20. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT Jr, et al. Factor V Leiden (resistance to activated protein C), increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997;89:2817-2821.
21. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995;332:912-917.
22. Settin A, Dowaidar M, El-Baz R, Abd-Al-Samad A, El-Sayed I, Nasr M. Frequency of factor V Leiden mutation in Egyptian cases with myocardial infarction. *Hematology* 2008;13:170-174.
23. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 1998;97:1037-1041.
24. Croft SA, Daly ME, Steeds RP, Channer KS, Samani NJ, Hampton KK. The prothrombin 20210A allele and its association with myocardial infarction. *Thromb Haemost* 1999;81:861-864.
25. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood* 1997;90:1747-1750.
26. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine 33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989;83:1778-1781.
27. 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;334:1090-1194.
28. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa PIA and GP Ib variable number tandem repeat polymorphism and markers of platelet activation in acute stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1124-1131.
29. Mikkelsen J, Perola M, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, Lulu K, et al. Glycoprotein IIIa PI (A) polymorphism associates with progression of coronary artery disease and with myocardial infarction in an autopsy series of middle-aged men who died suddenly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2573-2578.
30. Wiman B. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) in plasma: its role in thrombotic disease. *Thromb Haemost* 1995;74:71-76.
31. Isordia-Salas I, Leañós-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado, Borrayo-Sánchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:365-362.
32. Mangoni AA, Jackson SH. Homocysteine and cardiovascular disease: current evidence and future prospects. *Am J Med* 2002;112:556-565.
33. Alam MA, Husain SA, Narang R, Chauhan SS, Kabra M, Vasisht S. Association of polymorphism in the thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene and hyperhomocysteinemia with coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 2008;310:111-117.
34. Yilmaz H, Isbir S, Agachan B, Ergen A, Farsak B, Isbir T. C677T Mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene and serum homocysteine levels in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2006;24:87-90.
35. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;38:87-104.
36. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998;103:65-69.
37. Tamemoto H, Ishikawa SE, Kawakami M. Association of the Glu-298Asp polymorphism of the eNOS gene with ischemic heart disease in Japanese diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80:275-279.
38. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagcan A, Akin M, et al. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Thromb Res* 2005;116:287-292.
39. Vasilakou M, Votteas V, Kasparian C, Pantazopoulos N, Dedoussis G, Deltas C, et al. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of premature coronary artery disease in the Greek population. *Acta Cardiol* 2008;63:609-614.
40. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8:235-241.