

Asociación del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 con el perfil de lípidos

en pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y controles clínicamente sanos

Palabras clave: Artritis reumatoide, osteoartritis, triglicéridos, PAI-1, polimorfismo 4G/5G.

Key words: Rheumatoid arthritis, osteoarthritis, triglycerides, PAI-1, polymorphism 4G/5G.

Recibido: 03/10/2005
Aceptado: 24/10/2005

SL Ruiz-Quezada,^{*,+} M Vázquez del Mercado,^{*,+} M Cárdenas-Meza,^{**} BT Martín-Márquez,^{*} G Martínez-Bonilla,^{*,+} Isela Parra-Rojas,⁺ E Oregón-Romero,^{*} RE Navarro-Hernández,^{*} G Bernard-Medina,^{***} JF Muñoz-Valle^{*,+}

^{*} Instituto de Investigación en Reumatología y del Sistema Músculo Esquelético, Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS), Universidad de Guadalajara (UdeG).

⁺ Doctorado en Biología Molecular en Medicina, CUCS, UdeG.

^{**} Laboratorio de Patología Clínica, Hospital Civil de Guadalajara "Juan I. Menchaca".

^{***} Servicio de Reumatología, Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde".

Correspondencia:

Dr. José Francisco Muñoz Valle.

Instituto de Investigación en Reumatología y del Sistema Músculo Esquelético, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Calle Sierra Mojada núm. 950, P.O. Box 2-207, 44281 Guadalajara, Jal., México Tel/Fax: (52) (33) 10585309. ext. 3635. E-mail: biologiamolecular@hotmail.com

21

Resumen

El polimorfismo 4G/5G del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) afecta la concentración plasmática de la proteína. Además, estudios *in vitro* demostraron que triglicéridos, colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c), insulina y glucosa incrementan la expresión del gen PAI-1. **Objetivo:** Analizar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 y su asociación con el perfil de lípidos en pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y controles clínicamente sanos. **Material y métodos:** Estudio de casos y controles. El polimorfismo 4G/5G del PAI-1 se determinó por PCR-RFLP's (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción) usando la enzima de restricción Bsl I. El análisis estadístico se efectuó con los paquetes SPSS 10.0 y Epi Info 2000. **Resultados:** La población estudiada se encon-

Abstract

The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) affects the plasmatic concentration of the protein. Besides, *in vitro* studies demonstrated that triglycerides, very low density lipoproteins-cholesterol (VLDL-c), insulin and glucose increase the gene expression. **Objective:** To analyze the genetic and allele frequency of the 4G/5G polymorphism of the PAI-1 and its association with the lipid profile in patients with rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) and clinical healthy controls (HC). **Material and methods:** Cross-sectional study. The 4G/5G polymorphism of PAI-1, was analyzed for PCR-RFLP's (polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphisms) using the restriction enzyme Bsl I. The statistical analysis fulfilled with the SPSS 10.0 and Epi Info 2000. **Results:** The population studied was in Hardy-Weinberg's

tró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia de los genotipos 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G en artritis reumatoide fue: 44.1%, 52.9% y 2.9%; en osteoartritis: 32.2%, 54.8% y 12.9% y en controles clínicamente sanos: 35.1%, 51.4% y 13.5%, respectivamente. Los controles con genotipo 5G/5G presentaron niveles mayores de triglicéridos, colesterol total y VLDL-c ($p < 0.05$). **Conclusiones:** El genotipo 5G/5G se asocia con un incremento de triglicéridos, colesterol total y VLDL-c en controles clínicamente sanos.

Introducción

La artritis reumatoide es una enfermedad reumática, crónica, inflamatoria y sistémica, de naturaleza autoinmune, caracterizada por inflamación crónica, dolor y rigidez de las articulaciones diartroidales. La inflamación provoca una destrucción articular progresiva, que se manifiesta como erosión ósea y destrucción de cartilago. Este padecimiento afecta sustancialmente a la sociedad, en términos de costo, incapacidad y pérdida de productividad.¹⁻⁴

El Colegio Americano de Reumatología (ACR) define a la osteoartritis como un grupo heterogéneo de trastornos que causan síntomas y signos articulares que se asocian a un defecto en la integridad del cartilago, además de las alteraciones relacionadas con el hueso subyacente y en el margen articular. Básicamente, la osteoartritis se manifiesta por cambios morfológicos, bioquímicos, moleculares y biomecánicos, tanto de las células como de la matriz extracelular, lo cual conduce a reblandecimiento y pérdida del cartilago articular, además de esclerosis y eburneación del hueso subcondral, osteofitos y quistes subcondrales. Cuando la osteoartritis es clínicamente evidente se caracteriza por dolor articular, dolor a la presión, limitación de movimientos, crepitación, ocasionalmente derrame y grados variables de inflamación local. La osteoartritis se ha asociado a sobrepeso, lesiones y actividades mecánicas repetitivas, que han sido propuestas como factores críticos para el inicio y progresión de la osteoartritis.⁵⁻⁸

balance. The frequency of the genotypes 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G in RA was: 44.1%, 52.9% and 2.9%; in OA: 32.2%, 54.8% and 12.9% and in HC: 35.1%, 51.4% and 13.5%, respectively. The HC with genotype 5G/5G presented increase levels of triglycerides, total cholesterol and VLDL-c ($p < 0.05$). **Conclusions:** The genotype 5G/5G is associated with increase of triglycerides, total cholesterol and VLDL-c in HC.

El inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es una glicoproteína compuesta de 379 aminoácidos y con peso molecular de 48 kDa, y es considerada como el principal inhibidor de la fibrinólisis. Cuando las plaquetas son estimuladas por trombina, el PAI-1 es liberado sobre la superficie de las plaquetas, protegiendo el coágulo de una lisis prematura. Este mecanismo causa un rápido incremento local de la concentración de PAI-1 en circulación, el cual se une rápidamente a tPA y a uPA, evitando que el plasminógeno se convierta en plasmina, inhibiendo así la fibrinólisis. La forma activa de PAI-1 es inestable (vida media de 30 minutos), aunque la vitronectina se une al PAI-1 en plasma y estabiliza su forma activa. En la región promotora del gen PAI-1 existe un polimorfismo ubicado a -675 pb del sitio de inicio de la transcripción, denominado 4G/5G, el cual induce variaciones en la expresión génica, alterando los niveles de PAI-1 en circulación. Los sujetos homocigotos para el alelo 4G (genotipo 4G/4G) tienen aproximadamente 25% más alta concentración de PAI-1 que los homocigotos para el alelo 5G (genotipo 5G/5G). Por otro lado, se ha reportado que triglicéridos, VLDL-c, insulina y glucosa afectan la expresión de PAI-1.⁹⁻¹¹ Además, existe un elemento de respuesta a VLDL (VLDL-RE) ubicado de -672 a -657 pb en la región promotora del gen PAI, justo al lado del polimorfismo 4G/5G, por lo que pudiera existir una asociación entre el polimorfismo y los niveles de lípidos.^{11,12}

También se ha considerado al polimorfismo 4G/5G del PAI-1, como un factor de riesgo para en-

fermedades cardiovasculares en la población general. Algunos autores han encontrado una asociación entre el polimorfismo 4G/4G con el incremento en riesgo de aterosclerosis y con infarto agudo al miocardio.¹¹⁻¹⁵

Material y métodos

Diseño del estudio. El estudio fue de casos y controles.

Consideraciones éticas. El estudio fue realizado de acuerdo con las normas y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos establecidos en la declaración de Helsinki adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, en junio de 1964 y revisados en la 52ª Asamblea General de Edimburgo, Escocia, en octubre del 2000.

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del OPD Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" y todos los sujetos incluidos en este estudio participaron en forma voluntaria, firmando su carta de consentimiento informado.

Población de estudio. Fueron incluidos 34 pacientes con artritis reumatoide, 31 con osteoartritis y 37 controles clínicamente sanos (CCS). Las muestras fueron obtenidas por punción venosa, después de un ayuno de 12 horas, entre 8 y 10 a.m. Para cuantificar los lípidos en suero, se colectó la muestra en tubos vacutainer sin anticoagulante. Para el polimorfismo, las muestras se colectaron en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante.

Pruebas de Laboratorio. A todos los sujetos se les determinó: colesterol total (CT), colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-c), colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c), triglicéridos (TG) y glucosa; todos analizados en un Synchron Clinical System LX20 de Falcon. La apolipoproteína A (apo A1), apolipoproteína B (apo B) y el fibrinó-

geno se midieron en un IMMAGETM Immunochemistry, Beckman Coulter System 4700.

Determinación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1. En todos los individuos se determinó el polimorfismo 4G/5G mediante reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP's) con la variante AIRS, descrita por Margaglione.¹⁶ El ADN genómico (gADN) fue extraído a partir de 5 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA de acuerdo a la técnica modificada de Miller.¹⁷

Para determinar el polimorfismo genético del PAI-1, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando un fragmento de 98 o 99 pb, en el termociclador (iCycler™ BIO-RAD Life Science Research Products), utilizando iniciadores específicos, bajo las siguientes condiciones de reacción: a cada muestra se adiciona 1 µg de gADN, 0.06 µM de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de cada dNTP, 1X de buffer y 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen™ life technologies). La amplificación se desarrolla con una desnaturalización inicial a 94°C por tres minutos, y 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Se realiza una extensión final a 72°C por un minuto; 30 µL del producto amplificado fueron digeridos con 3 U de la enzima de restricción Bsl I (New England Biolabs). Los productos obtenidos de la digestión, se observaron en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. Para confirmar los resultados, los genotipos 4G/4G, 4G/5G, 5G/5G del PAI-1 fueron verificados por secuenciación.

Análisis estadístico. El análisis genotípico se realizó con la prueba χ^2 , mientras que los lípidos fueron analizados con ANOVA-one Way y las diferencias entre grupos se realizaron con la prueba de Tukey, considerando un nivel de significancia menor de 0.05. El análisis se desarrollo con los paquetes estadísticos Epi-Info 2000 y SPSS versión 10.0.

Resultados

Genotipificación del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1. En todos los pacientes, el polimorfismo se determinó mediante la técnica de PCR, amplificando un fragmento de 98 o 99 pares de bases (*figura 1A*). El patrón genotípico obtenido mediante la digestión con la enzima Bsl I es el siguiente: el genotipo 5G/5G corresponde a dos fragmentos de 77 y 22 pb; los fragmentos de 98, 77 y 22 pb representan al genotipo 4G/5G y el fragmento de 98 pb corresponde al genotipo 4G/4G (*figura 1B*).

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo del PAI-1. El *cuadro I* muestra la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 4G/5G del PAI-1, en los tres diferentes grupos de pacientes, encontrándose en equilibrio de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg. La distribución de las frecuencias de los genotipos 5G/5G, 4G/5G, 4G/4G en artritis reumatoide fue: 44.1%, 52.9% y 2.9%; en osteoartritis: 32.2%, 54.8% y 12.9% y en controles clínicamente sanos: 35.1%, 51.4% y 13.5%, respectivamente. Cuando se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas entre los grupos con artritis reumatoide y osteoartritis *versus* controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pero en los controles fueron diferentes a las observadas en otras poblaciones europeas.

Perfil de lípidos en los grupos estudiados de acuerdo con el genotipo del PAI-1. Al analizar algunas características demográficas y los niveles basales de los lípidos y lipoproteínas séricas entre los grupos estudiados (*cuadro II*), se encontró que los promedios de las concentraciones séricas se encuentran dentro del rango normal y sólo se observa una diferencia significativa en las concentraciones séricas de Apo B (143.13 ± 61.52 ; $p < 0.05$) y colesterol total (200.70 ± 45.76 ; $p < 0.05$), en los pacientes con osteoartritis. La asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 con el perfil de lípidos en pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y controles se muestra en el *cuadro III*. Es importante resaltar que se en-

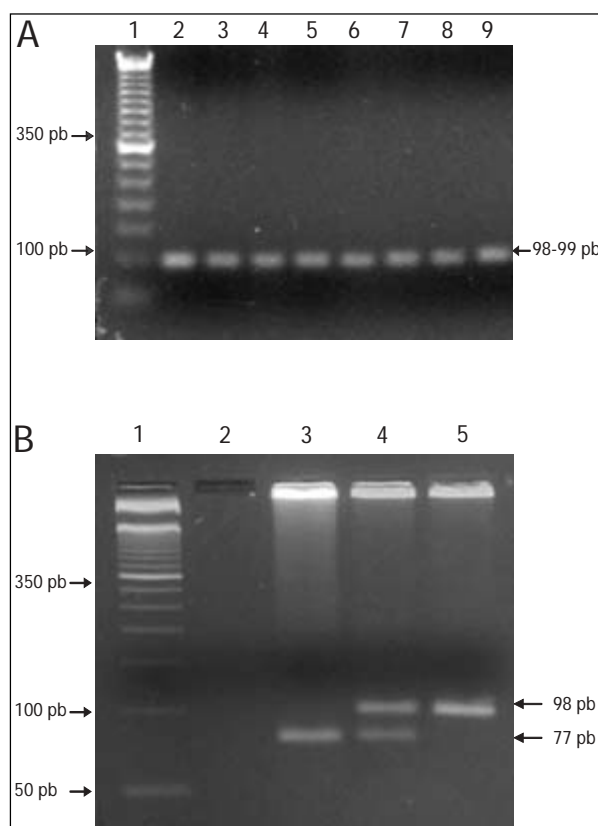


Figura 1. A) Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio que muestra el producto de PCR amplificado, con un tamaño de 98 o 99 pb. B) Gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio que muestra el patrón genotípico. Carril 1: Marcador de peso molecular 50 pb; carril 2: blanco; carril 3: genotipo 5G/5G; carril 4: genotipo 4G/5G; carril 5: genotipo 4G/4G. Los fragmentos digeridos de 77 y 22 bp representa al genotipo (5G/5G), los fragmentos de 98, 77 y 22 bp representan al heterocigoto (4G/5G), y el fragmento de 98 bp representa el homocigoto (4G/4G). El fragmento de 22 bp no se observa en el gel.

contraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de CCS, cuyos niveles séricos de colesterol total (214.1 ± 45.11 ; $p < 0.05$), triglicéridos (197.7 ± 89.98 ; $p < 0.001$) y VLDL-c (39.5 ± 18.0 ; $p < 0.001$) fueron más altos en los portadores del genotipo 5G/5G (*figura 2*).

Discusión y conclusiones

En la actualidad se conoce que la enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de

Cuadro I. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo 4G/5G del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1).

Grupo	Frecuencia genotípica						p
	4G/4G		4G/5G		5G/5G		
	n	%	n	%	n	%	
AR (n = 34)	1	2.9	18	52.9	15	44.1	NS
OA (n = 31)	4	12.9	17	54.8	10	32.2	NS
CCS (n = 37)	5	13.5	19	51.4	13	35.1	NS
	Frecuencia alélica					p	
	4G		5G				
	n	%	n	%	p		
AR (n = 68)	20	29.41	48	70.59	NS		
OA (n = 62)	25	40.32	37	59.68	NS		
CCS (n = 74)	29	39.19	45	60.81	NS		
AR: Artritis reumatoide, OA: Osteoartritis, CCS: Controles clínicamente sanos, NS: No significativa.							

AR: Artritis reumatoide, OA: Osteoartritis, CCS: Controles clínicamente sanos, NS: No significativa.

Cuadro II. Características bioquímicas y demográficas en artritis reumatoide (AR), osteoartritis (OA) y controles clínicamente sanos (CCS).

	AR (n = 34)	OA (n = 31)	CCS (n = 37)	p
Género (H:M)	2:32	1:30	9:28	-
Edad (años)	43 ± 10 ^{C**}	58 ± 12 ^{B**}	42 ± 14	< 0.001
IMC (kg/m ²)	26.4 ± 4.5 ^{C*}	30.0 ± 6.3 ^{B*}	26.0 ± 4.3	< 0.05
Apo A1	167.05 ± 52.34	178.38 ± 73.7	143.55 ± 35.58	NS
ApoB	111.10 ± 48.82 ^{C*}	143.13 ± 61.52 ^{B*}	102.29 ± 33.95	< 0.05
CT	176.91 ± 52.31 ^{A**}	200.70 ± 45.76	198.06 ± 43.62	< 0.05
TG	109.85 ± 51.12 ^{C*}	152.90 ± 88.98	131.97 ± 80.87	NS
HDL-c	40.50 ± 16.00	42.57 ± 10.86	42.03 ± 12.23	NS
LDL-c	114.44 ± 47.20 ^{A*}	129.05 ± 39.77	129.93 ± 36.43	NS
VLDL-c	21.97 ± 10.22 ^{C*}	30.58 ± 17.80	26.40 ± 16.17	NS

* < 0.05; ** < 0.001; ^A AR vs CCS; ^B OA vs CCS; ^C AR vs OA.

muerte en población mexicana, pero también hay estudios en otros países en los que se ha reportado un aumento en la mortalidad de sujetos con artritis reumatoide por enfermedad cardiovascular, en comparación con la población general,¹⁸ aunque no se conoce esta asociación en pacientes con osteoartritis. La artritis reumatoide y la enfermedad cardiovascular tienen como mecanismo fisiopatológico subyacente la inflamación sis-

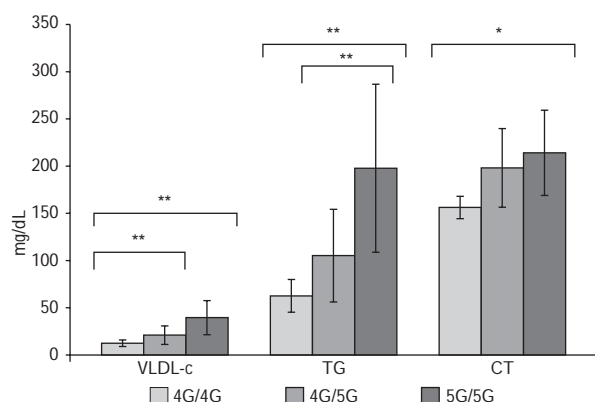
témica crónica.¹⁹ También se conoce que los pacientes con artritis reumatoide pueden presentar un perfil de lípidos adverso (niveles séricos disminuidos de HDL-c y Apo A1),²⁰ que puede incrementar el riesgo para desarrollar la enfermedad cardiovascular. Por lo que se determinaron los genotipos del polimorfismo 4G/5G del gen de PAI-1 y su relación con el perfil de lípidos, en personas aparentemente sanas, así como en pa-

Cuadro III. Asociación del polimorfismo 4G/5G del gen del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) con el perfil de lípidos en controles clínicamente sanos (CCS).

		4G/4G	4G/5G	5G/5G	Total	p
CCS	Apo A1	131.64 ± 56.06	146.54 ± 38.06	143.77 ± 22.46	143.55 ± 35.58	NS
	ApoB	75.08 ± 15.66	106.37 ± 33.58	106.80 ± 36.43	102.29 ± 33.95	NS
	CT	156.20 ± 11.82	198.11 ± 41.68	*214.1 ± 45.11	198.06 ± 43.62	p<0.05
	HDL-c	41.60 ± 10.57	45.47 ± 12.76	37.15 ± 11.06	42.03 ± 12.23	NS
	TG	62.60 ± 17.30	105.26 ± 49.05	*197.7 ± 89.98	131.97 ± 80.87	p<0.001
	LDL-c	102.08 ± 11.88	132.29 ± 36.98	137.39 ± 38.66	129.93 ± 36.43	NS
	VLDL-c	12.52 ± 3.46	21.05 ± 9.81	*39.5 ± 18.00	26.40 ± 16.17	p<0.001

Los resultados se presentan como media ± desviación estándar.

Abreviaturas: Apo = Apolipoproteína. CT = Colesterol total. HDL-c = Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. TG = Triglicéridos. LDL-c = Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad. VLDL-c = Colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad.

**Figura 2.** Niveles de lípidos asociados al genotipo 4G/5G del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en controles clínicamente sanos (CCS).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

CT: 5G/5G vs 4G/4G ($p < 0.05$); TG: 5G/5G vs 4G/4G y 5G/5G vs 4G/5G ($p < 0.001$); VLDL-c: 5G/5G vs 4G/4G y 5G/5G vs 4G/5G ($p < 0.001$).

cientes con artritis reumatoide y enfermos con osteoartritis.

Aunque los niveles séricos de los lípidos se encontraron dentro del rango de normalidad en todos los grupos estudiados, se observaron niveles significativamente más altos de Apo B y colesterol total en los pacientes con osteoartritis. Esto puede ser explicado porque son el grupo de mayor edad y por la presencia de obesidad, en com-

paración con los grupos con artritis reumatoide o los controles sanos. Es importante hacer notar que los pacientes con artritis reumatoide presentan una tendencia a disminuir los niveles séricos del perfil de lípidos a diferencia de los controles clínicamente sanos, debido probablemente a que se encuentran bajo tratamiento; 41.2% de los pacientes con artritis reumatoide estaban tratados con cloroquina, 35.6% con esteroides, 26.5% con metotrexate y 18.8% con AZF (algunos pacientes usaban terapia combinada). Se ha reportado que el tratamiento adecuado de la artritis reumatoide, mejora el perfil de lípidos adverso, disminuyendo el riesgo cardiovascular.^{20,21}

También se encontró una asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 con el perfil de lípidos en el grupo de controles, donde los portadores del genotipo 5G/5G presentaron niveles más altos de colesterol total, triglicéridos y VLDL-c, y de manera general un mayor perfil aterogénico; esto es importante porque 35.1% del grupo de controles presentan este genotipo, lo que puede conferirles un mayor riesgo cardiovascular. Los individuos heterocigotos (4G/5G) también mostraron una tendencia a presentar niveles más altos de lípidos con respecto a los portadores del genotipo 4G/4G, aunque los niveles se encontraron dentro del

rango de normalidad. Una posible explicación molecular de la interacción entre lípidos y el polimorfismo 4G/5G, es el elemento de respuesta a VLDL (VLDLE) ubicado a un lado del polimorfismo 4G/5G, ya que probablemente la proteína represora que se une al genotipo 5G/5G sea un factor transcripcional que promueve la expresión de VLDL-c.^{11,12} Esto explicaría el hecho de que el genotipo 5G/5G se asocie con niveles altos de VLDL-c, TG y CT, mientras que el genotipo 4G/4G presente niveles disminuidos.

Es importante considerar la alta frecuencia del alelo 5G (60.81%) en población mexicana, ya que hay reportes de países europeos como España (53%),²² Inglaterra (48.31%),²³ Alemania (46.21%),²⁴ y orientales como China (40.78%),²⁵ donde la frecuencia es menor. Esto sugiere que este polimorfismo puede ser un indicador de riesgo para enfermedad cardiovascular en nuestra población, ya que se asocia con un mayor perfil aterogénico; siendo diferente con lo reportado en otros estudios donde se señala el alelo 4G como factor de riesgo coronario,²⁶ por lo que es importante determinar la susceptibilidad genética de cada población para poder establecer el efecto de los polimorfismos en la predisposición genética a enfermedades poligénicas, como la enfermedad cardiovascular. Finalmente, podemos concluir que el genotipo 5G/5G se asocia con un incremento de triglicéridos, colesterol total y del colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad en controles clínicamente sanos, por lo que se puede sugerir que el polimorfismo 4G/5G del PAI-1 puede estar implicado en la predisposición genética a la enfermedad cardiovascular.

Financiamiento

El presente trabajo se realizó con el financiamiento UDG-PTC-183, PROMEP 2003, otorgado al Dr. en C. José Francisco Muñoz Valle.

Referencias

- Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (5): 498-502.
- Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358: 903-911.
- Feldmann M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews* 2002; 2: 364.
- Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nature Review* 2002; 2: 1.
- Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-1049.
- Ramos-Niembro F. Manual Clínico de Reumatología. México: JGH Editores, 2000; 1-14, 141-154.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43 (9): 1916-1926.
- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis and induction: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 2001; 3: 107-113.
- Busso N, So A. Urokinase in rheumatoid arthritis: Causal or coincidental? *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 705-706.
- van der Laan WH, Slagboom PE, Meulenbelt I, Verheijen JH, Breedveld FC, Huizinga TWJ. A functional polymorphism in the promoter of plasminogen activator inhibitor-1 is associated with joint destruction in RA. *Arthritis Rheum* 1998; 41 (9) (suppl): S60.
- Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1792-1801.
- Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb* 1998; 18 (1): 20-26.
- Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 33-37.
- Lucchesi D, Pucci L, Bandinelli S, Pilo M, Stellini D, Giannarelli R, Del Prato S, Penno G. The PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism does not associate with complications in type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50 (suppl 2): A177.
- Margaglione M, Grandone E, Di Minno G. Relation between PAI-1 gene locus polymorphism and family history of coronary artery disease. *Ann Intern Med* 1998; 128: 508-509.
- Margaglione M, Grandone E, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, d'Addetta M, Di Minno G. An alternative method for PAI-1 promoter polymorphism (4G/5G) typing. *Thromb Haemost* 1997; 77: 605-606.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
- Van Doornum S, McGoll G, Wicks IP. Accelerated atherosclerosis. An extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2002; 46: 862-873.

19. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
20. Park YB, Lee SK, Lee WK et al. Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26: 1701-1704.
21. Boers M, Nurmohamed MT, Doelman CJA, Lard LR, Verhoeven AC, Voskuyl AE, Huizinga TWJ, Van der Stadt RJ, Dijkmans BAC, Van der Linden S. Influence of glucocorticoids and disease activity on total and high density lipoprotein cholesterol in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 842-845.
22. Tassies D, Espinosa G, Muñoz-Rodríguez FJ, Freire C, Cervera R, Monteagudo J, Maragall S, Escolar G, Ingelmo M, Ordinas A, Font J, Reverter JC. The 4G/5G polymorphism of the type 1 plasminogen activator inhibitor gene and thrombosis in patients with antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2349-2358.
23. Hermans PW, Hibberd ML, Booy R, Daramola O, Hazelzet JA, de Groot R, Levin M. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet* 1999; 354: 556-560.
24. Nowak-Gottl U, Strater R, Kosch A, von Eckardstein A, Schobess R, Luigs P, Nabel P, Vielhaber H, Kurnik K, Junker R. The plasminogen activator inhibitor (PAI) -1 promoter 4G/4G genotype is not associated with ischemic stroke in a population of German children. Childhood Stroke Study Group. *Eur J Haematol* 2001; 66: 57-62.
25. Wang AY, Poon P, Lai FM, Yu L, Choi PC, Lui SF, Li PK. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism 4G/4G genotype and lupus nephritis in Chinese patients. *Kidney Int* 2001; 59: 1520-1528.
26. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 152-156.