

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**"Determinación molecular de marcadores genéticos
en síndromes coronarios agudos y su relación con
los eventos cardiovasculares adversos"**

POR:

M. en C. Luis Miguel Canseco Avila

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Octubre, 2005

TD

RC685

.C6

C3

2005

c.1

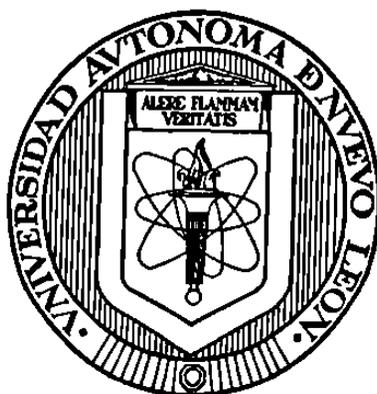
M. en C. Luis Miguel Canseco Avila



1080128035

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**"Determinación molecular de marcadores genéticos
en síndromes coronarios agudos y su relación con
los eventos cardiovasculares adversos"**

POR:

M. en C. Luis Miguel Canseco Avila

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Octubre, 2005

TD

RC685

.C6

C3

2005

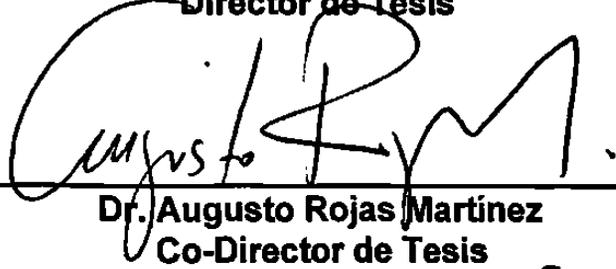


**" DETERMINACIÓN MOLECULAR DE MARCADORES GENÉTICOS EN
SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU RELACIÓN CON LOS
EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS "**

Aprobación de la Tesis:



**Dra. Rocío Ortiz López
Director de Tesis**



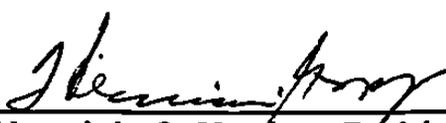
**Dr. Augusto Rojas Martínez
Co-Director de Tesis**



**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Co-Director de Tesis**



**Dra. Agnes Revol de Mendoza
Comisión de Tesis**



**Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Comisión de Tesis**



**Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Estudios de Posgrado**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

DEDICATORIA

A Dios

Por ser la fuerza que me hace seguir.

A mi Madre

Por todo tu amor, tú fuerza, enseñanzas y apoyo incondicional para que siempre pudiera realizar mis metas.

A mis Amores

Mireya: Por tu amor infinito, por tu apoyo y comprensión en esta etapa y a lo largo de nuestra vida juntos. Por darme el mejor regalo de mi vida.

Alondra: Por darme Amor y Alegrías todo los días. Por ser la fuente de inspiración y deseos de ser mejor cada día.

A mi familia

(Quique, freddito, Freddi, Milo, Fabi, Monse, Tía Mari, Tío Milo, Tío Bruno, Tía Chata, Tía Jobi y mis primos)

Por todo el amor y apoyo que siempre me han dado. Por estar conmigo en los momentos alegres y tristes, por cuidarme y enseñarme que la vida es bella cuando tienes seres con quien compartirla.

A mi segunda familia

(Suegros, compadres, Doña Margarita, Everin, Alfredito, Betito, Paquito, Alfre, Meme, Tía Nori, Don Meme, Pino y demás familia)

Por apoyarme y quererme. Por compartir conmigo y con Mireya estos sueños de superación.

A mis amigos

(Sergio, Marisol, Alfonso)

Por todos los momentos que reímos y disfrutamos mucho, por su valiosa y sincera amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortiz, por estos cinco años de enseñanzas, apoyo y confianza. Por su calidez y bondad.

A los Drs. Augusto Rojas y Carlos J. Sánchez por sus consejos, colaboración y tiempo para la realización de este proyecto.

A los Drs. Hugo A. Barrera, Agnes Revol, Herminia G. Martínez y al personal académico de la ULIEG, por sus enseñanzas y comentarios que siempre brindaron a mi trabajo realizado en este laboratorio.

A los Drs. Esteban, Anabel, Garza y al personal del servicio de urgencias del Hospital 34 del IMSS por su ayuda y colaboración para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de la ULIEG: Angel, Bere, Carmen, Karina, Iram, Itzel, Mauricio, Sergio, Lulu, Pablo, Ivan por su amistad y alegrías a lo largo de mi estancia en la ULIEG.

A todo el personal de la ULIEG (Personal administrativo, Secretarias e Intendentes) por su disponibilidad y sin fin de atenciones.

A todas los pacientes y sujetos que desinteresadamente contribuyeron con su material genético para que esta investigación se realizara.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por los apoyos al proyecto y por la beca concedida.

RESUMEN CURRICULAR Y PRODUCCIÓN CIENTÍFICA



Nombre: Luis Miguel Canseco Avila.

Fecha de Nacimiento: 27 de diciembre de 1977.

Nacionalidad: Mexicana.

Dirección: Av. central Norte 40 int, Metapa de Domínguez, Chiapas.

Teléfono: 01-962-6435094

Email: lmca2@hotmail.com

Estado Civil: Casado

Hijos: 1

FORMACIÓN ACADÉMICA

-Lic. En Químico Fármaco-Biólogo: Facultad de Ciencias Químicas, Campus IV, UNACH, Tapachula, Chiapas. Septiembre de 1995- Diciembre de 1999.

-Maestría en Ciencias en Biología Molecular e Ing. Genética: Facultad de Medicina, Dpto. Bioquímica, UANL, Monterrey, NL. Septiembre del 2000-Agosto del 2002.

DATOS RELEVANTES

- ✓ Primer Lugar de Generación en Licenciatura.
- ✓ Obtención del Título de Licenciatura por Unanimidad y con Mención Honorífica.
- ✓ Premio al Mejor Estudiante de Doctorado en Biología Molecular e Ingeniería Genética, septiembre del 2003- agosto del 2004.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL TRABAJO

- 2004: Presentación del trabajo en formato de cartel en el XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado en Monterrey, NL, MEXICO.
- Artículo original titulado: Polymorphisms – 455 G/A and – 148 C/T and Fibrinogen Plasmatic Level as Risk Markers of Acute Coronary Syndrome. Enviado a publicación.
- Artículo de revisión: **Fibrinógeno: ¿Factor o Indicador de Riesgo Cardiovascular?** Aceptado en la Revista de Cardiología de México. EN PRENSA
- Presentación del trabajo en formato de cartel en el 2005: XXIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, celebrado en Monterrey, NL, MEXICO.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	III
NOMENCLATURA	IV
RESUMEN	VII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 PATOFISIOLOGÍA DE LOS SCA	1
1.2 FACTORES DE RIESGO DE LOS SCA	3
1.3 GENÉTICA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	5
1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO	9
1.4.1 Genes de la cascada de la coagulación sanguínea	9
a) Fibrinógeno (Fg)	9
b) Factor V (FV)	12
c) Factor FVII (FVII)	15
d) Protrombina (FII)	17
e) Factor XIII (FXIII)	18
1.4.2 Receptor de superficie de plaquetas	21
a) Glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)	21
1.4.3 Sistema fibrinolítico	23
a) Activador de plasminógeno tisular (t-PA)	23
b) Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1)	24
1.4.4 Proteína reactante de fase aguda	27
a) Proteína c reactiva (CRP, en ingles)	27
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN	31

CAPÍTULO III: OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GENERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
CAPÍTULO IV: ESTRATEGIA GENERAL	33
CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS	35
5.1 ORÍGEN DE LOS REACTIVOS	35
5.2 MATERIAL CONSUMIBLE	37
5.3 EQUIPO DE LABORATORIO	37
5.4 PROGRAMAS DE ANÁLISIS COMPUTACIONAL	38
5.5 ÁREAS DE TRABAJO	39
5.6 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUJETOS	39
5.7 DEFINICIÓN DE EVENTOS ADVERSOS	
INTRAHOSPITALARIOS	40
5.8 MATERIAL BIOLÓGICO	41
5.9 MÉTODOS	41
5.9.1 Muestra de sangre y análisis de laboratorio	41
5.9.2 Técnica de extracción del dna	42
5.9.3 Reacciones de amplificación (PCRs) de los genes estudiados	43
5.9.4 Condiciones de amplificación	45
5.9.5 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs)	46
5.9.6 Análisis estadístico	47
CAPÍTULO VI: RESULTADOS	48
6.1 MUESTRAS PARA EL ESTUDIO	48

6.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LOS SUJETOS	48
6.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS	49
6.3.1 Polimorfismos del Fg	50
6.3.2 Polimorfismo del FV	53
6.3.3 Polimorfismo del FVII	54
6.3.3 Polimorfismo del FVII	54
6.3.4 Polimorfismo del FII	55
6.3.5 Polimorfismo del FXIII	56
6.3.6 Polimorfismo del GpIIIa	57
6.3.7 Polimorfismo del t-PA	58
6.3.8 Polimorfismo del PAI-1	59
6.3.9 Polimorfismos de la CRP	60
6.4 FRECUENCIAS DE LOS POLIMORFISMOS ANALIZADOS EN LAS TRES COHORTES	62
6.5 COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS EN LAS TRES COHORTES	68
6.6 DETERMINAR LA CORRELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS Y NIVELES PLASMÁTICOS DE LOS FACTORES BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS ANALIZADOS	71
6.7 RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LA COHORTE EXPERIMENTAL A LOS 3, 6 Y 12 MESES DESPUÉS DE SU INGRESO AL ESTUDIO	72
6.8 CORRELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LAS VARIABLES DEPENDIENTES (EVENTOS ADVERSOS COMO LA ISQUEMIA RECURRENTE, INFARTO, ETC.) Y LAS VARIABLES INDEPENDIENTES (HALLAZGOS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y GENÉTICOS)	74

CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	79
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES	87
CAPÍTULO IX: PERSPECTIVAS	89
CAPÍTULO X: REFERENCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Esquema de la patofisiología de la enfermedad coronaria.	3
Figura 2.	Esquema de los factores de riesgo de enfermedad coronaria.	5
Figura 3.	Patofisiología del Fg en el SCA.	10
Figura 4.	Esquema del agrupamiento genético del Fg.	11
Figura 5.	Esquema de la estructura del gen del FV.	13
Figura 6.	Esquema de la estructura del gen del FVII.	15
Figura 7.	Esquema de la estructura del gen del FII.	17
Figura 8.	Esquema de la estructura del gen de la cadena A del FXIII.	19
Figura 9.	Esquema de la estructura del gen de la cadena B del FXIII.	19
Figura 10.	Esquema de la estructura del gen del GPIIIa.	21
Figura 11.	Esquema de la estructura del gen t-PA.	23
Figura 12.	Esquema de la estructura del gen PAI-1.	24
Figura 13.	Esquema de la estructura del gen de la CRP.	28
Figura 14.	Patofisiología de la CRP.	29
Figura 15.	Estrategia General.	33
Figura 16.	Polimorfismos -455 G/A y -148 C/T del gen del Fg.	51
Figura 17.	Polimorfismo +1689 T/G del Fg.	52
Figura 18.	Polimorfismo <i>Taq I</i> del Fg.	52
Figura 19.	Polimorfismo <i>Bcl-1</i> del Fg.	53
Figura 20.	Polimorfismo G1691A del FV.	54
Figura 21.	Polimorfismo R353Q del FVII.	55

Figura 22.	Polimorfismo G20210A del FII.	56
Figura 23.	Polimorfismo V34L del FXIII.	57
Figura 24.	Polimorfismo PLA1/PLA2 del GPIIIa.	58
Figura 25.	Polimorfismos <i>A/u I/D</i> del t-PA.	59
Figura 26.	Polimorfismo 4G/5G del PAI-1.	60
Figura 27.	Polimorfismo G1059C de la CRP.	61
Figura 28.	Polimorfismo -717A/G de la CRP.	62
Figura 29.	Grafica de Seguimiento de los pacientes con SCA.	73
Figura 30.	Grafica de Supervivencia del los pacientes con SCA al comparar los niveles del Fg.	74
Figura 31.	Grafica de Supervivencia de los de los pacientes con SCA al comparar los niveles de leucocitos.	75
Figura 32.	Regresión Logística Simple de las variables dependientes a un año de seguimiento de los pacientes con SCA.	76
Figura 33.	Interacción niveles de Fibrinógeno y el polimorfismo V34L del FXIII.	84

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Lista de genes y sus polimorfismos, que fueron estudiados en este trabajo.	9
Tabla 2 Oligonucleótidos para amplificar los genes estudiados, sus secuencias y claves.	44
Tabla 3 Condiciones iniciales de PCR para los polimorfismos.	45
Tabla 4 Programa inicial de amplificación para los polimorfismos.	45
Tabla 5 Reacción inicial de digestión para los polimorfismos.	46
Tabla 6 Características de la población de estudio.	49
Tabla 7 Genotipos del Fibrinógeno y los Grupos de Estudio.	64
Tabla 8 Frecuencia Genotípica y alélica del FV, FVII, FII, FXIII y GPIIIa en los tres Grupos.	65
Tabla 9 Frecuencia Genotípica y alélica de los genes t-PA, PAI-1, y la CRP en los tres Grupos.	67
Tabla 10 Carga alélica de los alelos que confieren riesgo: Fg(-455A y -148T), FVII(353Q), FXIII(34V), t-PA(<i>Alu I</i>) y CRP(-717A).	68
Tabla 11 Comparación de las variables bioquímicas entre los controles sanos y ECE .	69
Tabla 12 Comparación de las variables bioquímicas entre los controles sanos y SCA .	70
Tabla 13 Comparación de las variables bioquímicas entre ECE y SCA.	71
Tabla 14 Relación entre los niveles plasmáticos del fibrinógeno y polimorfismos.	72
Tabla 15 Modelo de regresión multivariada logística de isquemia recurrente a un año de seguimiento (p=0.002).	77
Tabla 16 Modelo de regresión multivariada logística de muerte a un año de seguimiento (p=0.001).	77
Tabla 17 Modelo de regresión multivariada logística de EAT a un año de seguimiento (p=0.04).	78

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
a.a	Aminoácidos
ACD	Citrato de sodio
Alu I/D	Inserción/Delección Alu
Arg	Arginina
ATIII	Antitrombina
C	Citosina
cols.	Colaboradores
CRP	Proteína C Reactiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleósidos
EAC	Enfermedad Coronaria Cardiovascular
ECE	Enfermedad coronaria estable
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ERG	Elemento de respuesta a glucocorticoides
Fg	Fibrinógeno
FT	Facto tisular
FV	Factor V
FVa	Factor V activado
FVII	Factor VII
FVIIa	Factor VII activado
FXa	Factor X activado
FXIII	Factor XIII
FXIIIa	Factor XIII activado
G	Guanina
Gln	glutamina
°C	Grados centígrados

h	Horas
IC	Intervalos de Confianza
IL-6	Interleucina-6
IM	infarto al miocardio
kDa	KiloDaltons
Leu	Leucina
M	Molar
mg	Miligramos
mg/dl	Miligramos/decilitro
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
OR	Razón de Momios
%	Por ciento
PA	Producto amplificado
PAI-1	Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1
pb	Pares de bases
PCR	Reacciones en Cadena de la Polimerasa
Pro	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RNA	Ácido ribonucleico
RPCA	Proteína C Activada
RM	Razón de Momios
rpm	Revoluciones por minuto
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SDS	Dodecil sulfato de sodio

seg	segundos
T	Timina
Taq	DNA polimerasa de <u>Thermophylus aquaticus</u>
TFPI	Inhibidor vía FT
t-PA	Activador de Plasminógeno tisular
TVP	Trombosis Venosa Profunda
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
V	Voltios
Val	Valina
X	Veces la concentración
4G/5G	4 Guaninas/5 Guaninas

RESUMEN

Luis Miguel Canseco Avila
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Octubre, 2005

Título del Estudio: "DETERMINACIÓN MOLECULAR DE MARCADORES GENÉTICOS EN SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU RELACIÓN CON LOS EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS"

Número de páginas: 119

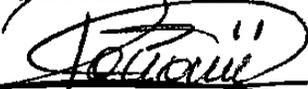
Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de estudio: Medicina Molecular

Propósito y Método de estudio: Analizar marcadores genéticos como predictores de la evolución clínica a mediano plazo de sujetos con SCA. Se reclutaron sujetos en tres cohortes en el servicio de Urgencias del Hospital de Especialidades No. 34 del IMSS. El seguimiento se realizó desde el ingreso del estudio y a los 3, 6 y 12 meses, mediante visita médica o contacto por vía telefónica. Las cohortes fueron: 1) Cohorte experimental SCA: *Criterios de inclusión:* a) edad > 30 años, b) angina inestable de reposo, infradesnivel y supradesnivel del segmento ST-T, c) sin repercusión hemodinámica y d) aceptación del consentimiento informado. *Criterios de exclusión:* a) edad > 75 años, b) SCA sin ruptura de placa c) Killip y Kimbal III o IV, d) fracción de expulsión (FE) < 35 %, e) antecedentes de factores que alteren los factores hemostáticos e inflamatorios y f) que no deseen ingresar al estudio. 2) Cohortes de pacientes con ECE: diagnóstico establecido a través de angiografía coronaria. 3) Cohorte de individuos sanos: sin factores de riesgo para aterosclerosis. Los integrantes de los dos grupos controles se eligieron con relación al grupo experimental por edad y sexo. Se analizaron 9 genes (14 polimorfismos) relacionados con hemostasis e inflamación y se determinó su asociación con las tres cohortes seleccionadas.

Contribuciones y Conclusiones: Este trabajo es el primero que determina polimorfismos en genes relacionados a enfermedad coronaria en México. Demostrando que antecedentes familiares (como la diabetes, SCA, hipertensión familiar), tabaquismo, dislipidemia, fibrinógeno, leucocitos, neutrofilos, creatinina, polimorfismos como el -148Fg, -455Fg y 34FXIII son marcadores de enfermedad coronaria. Como marcadores de SCA una vez que se tiene ECE se presentaron los leucocitos, neutrofilos, 34FXIII y Alu t-PA. Por otra parte los niveles >450 mg/dl del Fg y >8500 cel/mm³ de Leucocitos influyen negativamente en el tiempo de supervivencia. Como marcadores independientes de Isquemia recurrente post-SCA a seguimiento de un año fueron enfermedad más severa (CATT) y la carga genética del -148T del Fg y PLA2 del GPIIIa. Para muerte post-SCA se mantuvieron independientes la FE reducida y el polimorfismo Alu I/I del t-PA. De todos estos la carga genética del -148 T del Fg fue el único marcador independientes de Eventos Adversos Totales (EAT). De los marcadores genéticos que se correlacionaron con el fenotipo fueron los polimorfismos Fg (-455A, -148T 1689G y Bcl-1 B2); de los cuales solo el -455 G/A y -148 C/T se mantuvieron independientes. En conclusión todos estos marcadores clínicos, bioquímicos y genéticos en conjunto podrían ser útiles para una mejor estratificación de riesgo de enfermedad coronaria y de mala evolución de los pacientes post-SCA en nuestra población.

Director de Tesis


Dra. Rocío Ortiz López

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los síndromes coronarios agudos (SCA) son la expresión clínica de un espectro continuo y dinámico de isquemia miocárdica, con un denominador común: disfunción endotelial e inflamación, lo que induce a la inestabilidad y ruptura de una placa de ateroma vulnerable y la formación de un trombo local intracoronario. Las manifestaciones clínicas son: isquemia, infarto agudo al miocardio con y sin onda Q y muerte súbita.¹ Estas dependen principalmente de una obstrucción parcial o completa del trombo y de la extensión del área del miocardio en riesgo. A pesar de que la mortalidad cardiovascular ha disminuido en los últimos 30 años en los Estados Unidos de Norteamérica, el infarto con onda Q y sus complicaciones aún causan 1 de cada 5 defunciones.² En México es la primera causa de mortalidad y una de las más importantes causas de discapacidad (45,718 muertes fueron reportadas en el 2001 por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática de México)³.

1.1 PATOFISIOLOGÍA DE LOS SCA

La patofisiología de las enfermedades coronarias se puede dividir en cinco etapas (Figura 1): 1) El exceso de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés) en el torrente circulatorio, se estimula la entrada de éstas a la

Íntima del endotelio y se oxidan. Entonces las LDL modificadas estimulan a las células endoteliales para que presenten moléculas de adhesión, las cuales atrapan a monocitos y células T. Además las células endoteliales también secretan quimiocinas que atraen a las moléculas atrapadas a la túnica de la íntima. 2) En la túnica íntima, los monocitos maduran a macrófagos activos. Éstos y las células T producen mediadores inflamatorios quimiotácticos, incluyendo citocinas y factores de crecimiento celular. Los macrófagos también expresan receptores de LDL, que les ayudan a fagocitar a estas lipoproteínas. 3) Los macrófagos las ingieren y se llenan de LDL oxidadas, lo cual les da un aspecto espumoso (por lo que se denominan células espumosas) y las células T forman las líneas de grasa de los conductos sanguíneos (la forma más temprana de la placa aterosclerótica). 4) Las moléculas inflamatorias pueden promover el crecimiento de la placa y la formación de una capa fibrosa sobre el núcleo lipídico. Ésta se desarrolla cuando las moléculas inducen a que las células del músculo liso de la capa media, migren a la parte superior de la túnica íntima, se multipliquen y produzcan una matriz fibrosa firme que adhiere a las células entre sí. La capa fibrosa se añade al tamaño de la placa, pero las paredes la mantienen estable, segura y separada de la sangre. 5) Más tarde, las sustancias inflamatorias secretadas por las células espumosas pueden debilitar peligrosamente la capa fibrosa mediante la digestión de las moléculas de la matriz y llegan a dañar a las células del músculo liso, las cuales en determinadas circunstancias, fallan en la reparación de la placa. Mientras tanto, las células espumosas quizá expresen el factor tisular, un potente promotor de la formación de coágulos. Si la placa debilitada se rompe, el factor tisular

interactuará con los elementos promotores de la formación de coágulos, presentes en la sangre, produciendo un trombo o coágulo.

Para que estas lesiones produzcan síntomas debe de obstruirse más de la mitad del lumen de la placa que suele ocurrir sobre la 5ª o 6ª década de la vida en varones y unos 10 años más tarde en las mujeres. Si ésta es lo suficientemente grande, bloqueará el flujo sanguíneo, produciendo un ataque al corazón-la muerte del tejido cardiaco (Figura 1).⁴

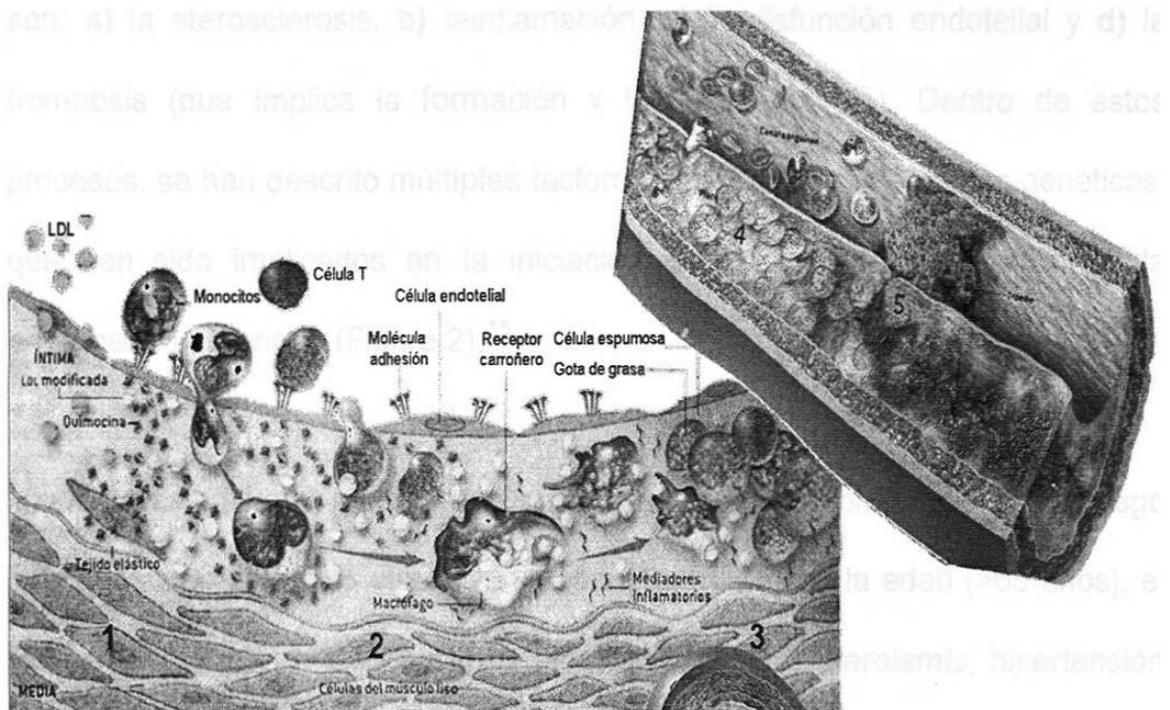


Figura 1.- Esquema de la patofisiología de la enfermedad coronaria. Se pueden observar las cinco etapas del proceso de la enfermedad coronaria (numeradas del 1 al 5: 1) Entrada de las LDL a la íntima. 2) Maduración de los monocitos y fagocitosis de las LDL-oxidadas. 3) Formación de la placa ateromatosa. 4) Crecimiento de la placa y la formación de una capa fibrosa. 5) Ruptura de la placa y formación del coágulo.⁴

1.2 FACTORES DE RIESGO DE LOS SCA.

La génesis de la trombosis intravascular depende de una compleja interrelación entre estímulos locales, factores sistémicos trombogénicos y de inflamación, los

cuales pueden contribuir a la extensión y persistencia de la trombosis coronaria, a la presencia de eventos cardiovasculares adversos⁵ y a los fracasos del tratamiento en la fase aguda (la reperfusión aguda y terapia antitrombótica fallan en un 30% de los casos)⁶⁻¹⁰. Evidencias recientes sugieren que los factores hemostáticos y de inflamación pueden ser variables independientes, de eventos adversos, cuando se hacen seguimientos de hasta cuatro años¹¹⁻¹⁴. De manera que se ha establecido que en la patogenia de la enfermedad coronaria están implicados cuatro procesos que conllevan al problema común, y estos son: a) la aterosclerosis, b) la inflamación, c) la disfunción endotelial y d) la trombosis (que implica la formación y lisis del coágulo). Dentro de estos procesos, se han descrito múltiples factores, tanto ambientales como genéticos, que han sido implicados en la iniciación, progresión y perpetuación de la enfermedad coronaria (Figura 2).¹⁵

Los factores ambientales son ampliamente reconocidos como factores de riesgo cardiovasculares, de los cuales los más importantes son la edad (>65 años), el sexo (masculino), sedentarismo, tabaquismo, hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes.

Entre los factores genéticos, se incluyen los polimorfismos de genes que codifican para proteínas que participan en alguna de las cuatro rutas metabólicas previamente mencionadas.^{15,16}

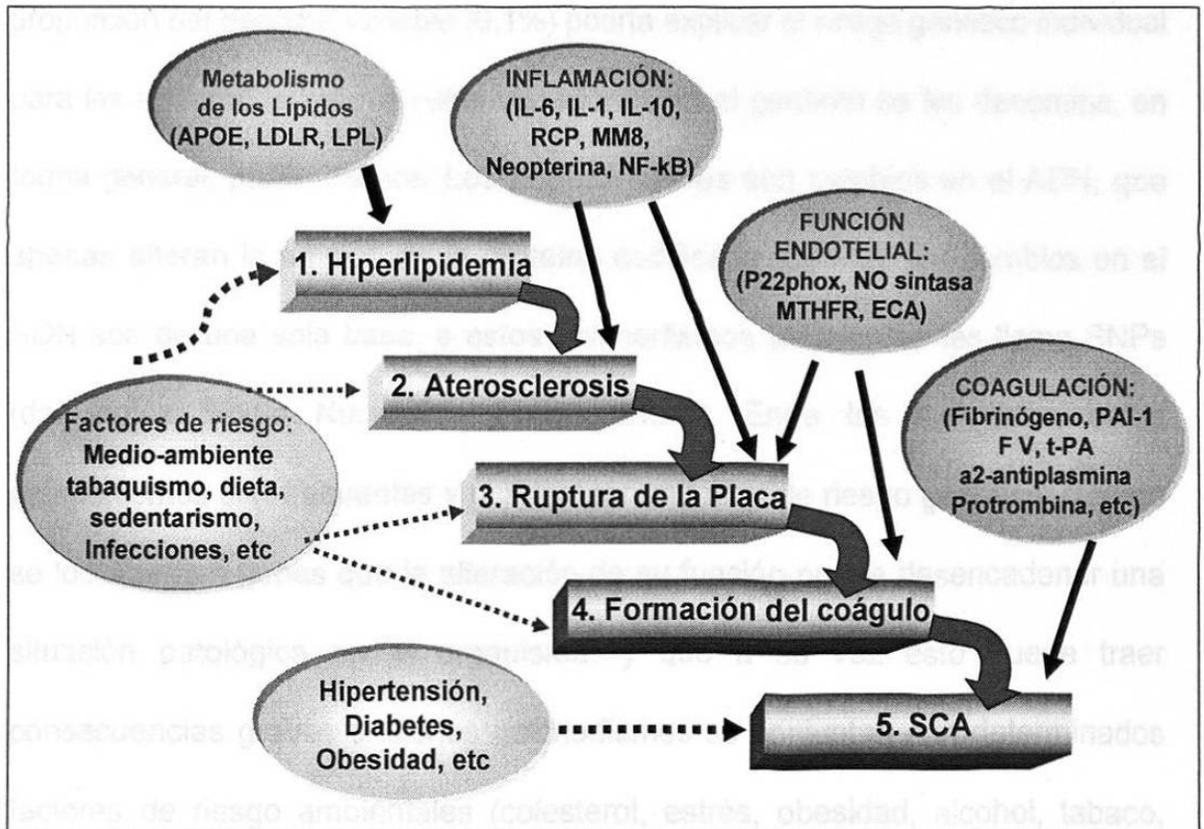


Figura 2.- Esquema de los factores de riesgo de enfermedad coronaria. Se pueden observar del lado izquierdo los factores de riesgo ambientales y como participan en el desarrollado de la enfermedad. En la parte de arriba y derecha se representan los cuatro procesos metabólicos implicados y algunos ejemplos de genes que se han asociado que participan en la patofisiología de los SCA.¹⁶

1.3 GENÉTICA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La etiología de la enfermedad coronaria ha sido objeto de intenso estudio durante las últimas décadas. Dado que los factores de riesgo clásico sólo explican a lo sumo la mitad de los casos, se han buscado nuevos factores etiológicos en el ámbito de la genética molecular.¹⁷

El Proyecto del Genoma Humano permitió el desarrollo de un catálogo de las variaciones encontradas en el genoma humano. Las secuencias humanas de ADN comparten aproximadamente un 99.9% de información idéntica. La

proporción del genoma variable (0.1%) podría explicar el riesgo genético individual para las enfermedades y a estas variaciones en el genoma se les denomina, en forma general, polimorfismos. Los **polimorfismos** son cambios en el ADN, que apenas alteran la función de la proteína codificada. Cuando los cambios en el ADN son de una sola base, a estos polimorfismos también se les llama SNPs (del inglés Single Nucleotide Polymorphism). Entre los individuos, estos polimorfismos son frecuentes y pueden ser un factor de riesgo genético, cuando se localizan en genes que la alteración de su función puede desencadenar una situación patológica en el organismo, y que a su vez esto puede traer consecuencias graves si dichos polimorfismos se conjuntan con determinados factores de riesgo ambientales (colesterol, estrés, obesidad, alcohol, tabaco, sedentarismo, inflamación, etc).

Los recientes avances en biología molecular han facilitado la detección de numerosos polimorfismos que pueden estar implicados en la fisiopatogenia de la enfermedad coronaria y sus complicaciones, como los relacionados con el metabolismo lipídico, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema simpático adrenérgico, la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la función endotelial, la inflamación y la trombosis. Lo que ha hecho pensar en la hipótesis de que la suma de polimorfismos desfavorables en un marco ambiental propicio puede facilitar la aparición de la aterosclerosis y de la enfermedad coronaria en particular, enfermedades típicamente poligénicas y multifactoriales.

De manera que en forma general podemos considerar como un **factor de riesgo cardiovascular** a aquella condición relacionada con el riesgo de presentar alguna de las enfermedades cardiovasculares más frecuentes, es decir, signos biológicos, estilos de vida o hábitos adquiridos que son más prevalentes o predictores de eventos futuros en los individuos. Aunque debemos aclarar que los factores de riesgo nunca debemos de interpretarlos como sinónimos de factores etiológicos. Dentro de estos factores de riesgo, podemos entender el término de **susceptibilidad genética** como aquel componente genético importante en la susceptibilidad individual a desarrollar la enfermedad. Bajo este concepto, la meta sería conocer en cada individuo, aquellos genes responsables de dicha susceptibilidad.

En estos últimos años se han descrito decenas de marcadores genéticos que se asocian en mayor o menor grado con la presencia de daño cardiovascular. De manera didáctica, estos marcadores genéticos se han clasificado en diferentes grupos, dependiendo de las rutas metabólicas en las que participan; por lo que estudiar todos estos factores en la enfermedad coronaria sería muy complejo.¹⁵

Afortunadamente, al tratar de abordar el problema de la selección de los genes para este estudio, encontramos una serie de datos preliminares de un estudio piloto prospectivo que se había realizado en el Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax No. 34 del IMSS en Monterrey. Este estudio en el que se incluía una cohorte de pacientes con SCA, tenía como objetivo principal:

determinar algunos marcadores bioquímicos y hematológicos asociados a SCA que estuvieran relacionados con efectos adversos, en un seguimiento hasta de 12 meses. En dicho estudio se analizaron marcadores bioquímicos para: coagulación (antitrombina III, proteína C activada, proteína S y resistencia a la proteína C), fibrinolisis (plasminógeno y α 2-antiplasmina), inflamación (leucocitos, proteína C reactiva, fibrinógeno y velocidad de sedimentación globular), metabolismo de lípidos (colesterol total, triglicéridos y lipoproteínas de alta y baja densidad) y homocisteína. Las cohortes estuvieron constituidas por 50 pacientes con SCA, 29 pacientes con EAC estable y 17 sujetos aparentemente sanos. Las variables dependientes seleccionadas (reinfarto, choque cardiogénico y defunción cardiovascular) se asociaron significativamente con las siguientes variables independientes: Fibrinógeno, Plasminógeno, Antitrombina III, Proteína C activada, Proteína S, Inhibidor de la proteína C, α 2-antiplasmina y Proteína C Reactiva, los cuales resultaron ser marcadores bioquímicos relacionados en forma directa e independiente con la presencia de eventos cardiovasculares adversos.¹⁸

Estos datos nos ofrecieron una guía para seleccionar algunos de los genes (rutas metabólicas) que podrían estar alteradas en este tipo de pacientes. Con base en esto, realizamos una búsqueda sistemática de polimorfismos en genes relacionados con cada una de estos marcadores bioquímicos, considerando también las evidencias científicas y correlaciones, que otros investigadores habían reportado. De tal manea que para llevar a cabo este estudio elegimos un

grupo de genes (enlistados en la Tabla 1) con la finalidad de analizar algunos de sus polimorfismos y determinar su asociación con el SCA.

A continuación se describen en detalle las características y localización de cada uno de ellos.

Tabla 1.- Lista de genes y sus polimorfismos, que fueron estudiados en este trabajo.

Ubicación (Cromosoma)	Gen	Polimorfismo
1	Factor V (FV)	• Arg506Gln
1	Proteína C Reactiva (CRP)	• 1059G/C • -717 A/G • Bcl, • -445G/A,
4	Fibrinógeno (FG)	• -148 C/T • TaqI • -1689 T/G
6	FXIII	• V34L
7	PAI-1	• -675 4G/5G
8	t-PA	• Alu I I/D
11	FII	• G20210A
13	Factor VII (FVII)	• Arg353Glu
13	GpIIIa	• T1565C (PLA1/PLA2)

1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES ANALIZADOS EN ESTE TRABAJO

1.4.1 Genes de la cascada de coagulación.

a) **Fibrinógeno (Fg):** Es una glicoproteína con un peso molecular de 340 kDa,¹⁹ compuesta de tres cadenas polipeptídicas (alfa, beta y gamma).²⁰ Su vida media es de aproximadamente 100 h y es sintetizada principalmente en el hígado.²¹

El Fg reactante de fase aguda ha demostrado ser una variable independiente de riesgo cardiovascular^{22,23} y participa en fenómenos de resistencia a heparina²⁴ y terapia fibrinolítica.²⁵ Tiene una actividad importante en el proceso de inflamación, aterogénesis y trombosis, y aunque el conocimiento de estos fenómenos es incompleto, algunos mecanismos incrementan el riesgo cardiovascular, como el aumento de la viscosidad sanguínea, agregación plaquetaria y formación del trombo. Además de ser el sustrato para la trombina (paso final de la cascada de coagulación), el Fg modula la disfunción endotelial y promueve la migración y proliferación de las células del músculo liso (Figura 3).¹⁹

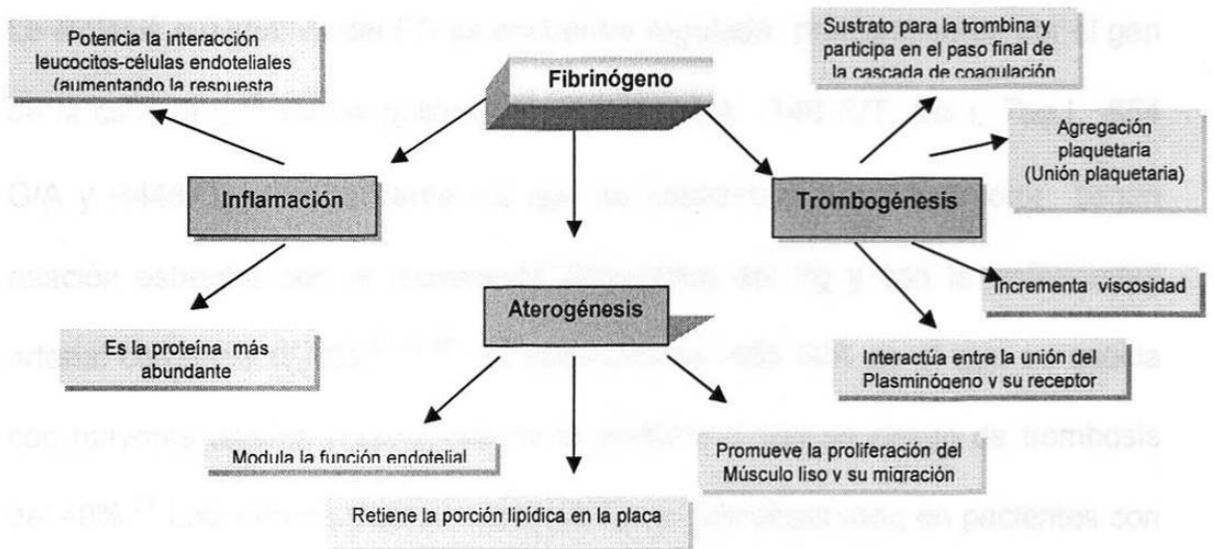


Figura 3.- Patofisiología del Fg en el SCA. Se esquematiza su participación en los tres mecanismos más importantes de la patofisiología de la enfermedad cardiovascular: inflamación, aterogénesis y trombogénesis. Modificada de Kamath & Lip.²³

Los Polimorfismos del Fg: Las variaciones de un 20 a un 50% plasmáticas del Fg están reguladas por polimorfismos en sus genes.^{26, 27} Las tres cadenas que lo forman (α , β y γ) son codificadas por tres genes del cromosoma 4 en la banda q23-q32 (Figura 4).²⁸

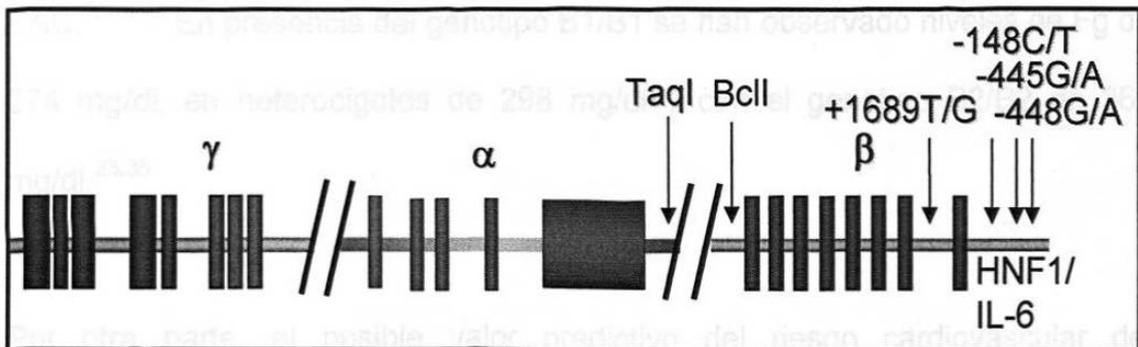


Figura 4.- Esquema del agrupamiento genético del Fg. Se observan los tres genes que dan lugar a las cadenas de la glicoproteína gamma (γ), alfa (α) y beta (β), así como los polimorfismos más frecuentes e importantes relacionados con los niveles del Fg y enfermedad cardiovascular. El esquema no está a escala.^{20, 23}

La síntesis cuantitativa del FG se encuentra regulada principalmente por el gen de la cadena β .²⁹ Varios polimorfismos (-455 G/A, -148 C/T, Bcl I, Taq I, -854 G/A y R448K), principalmente los que se encuentran en el promotor tienen relación estrecha con el incremento plasmático del Fg y con la enfermedad arterial coronaria (EAC).^{23,30-32} El polimorfismo -455 G/A es el que se asocia con mayores niveles plasmáticos de la proteína y con un riesgo de trombosis del 40%.²⁷ Los valores más elevados de Fg se han observado en pacientes con el genotipo homocigoto -455A/A (390 mg/dl) en comparación con el heterocigoto -455G/A (320 mg/dl) y el homocigoto -455G/G (310 mg/dl). En el primer caso, podría existir en individuos con el alelo -455A un estado de

hipercoagulabilidad y una fuerte respuesta de fase aguda como expresión fisiopatogénica para la progresión de aterosclerosis coronaria.³³⁻³⁵

El polimorfismo *Bcl1* (B1/B2) se asocia con un incremento de riesgo dos veces mayor para infarto del miocardio (OR 2.4; 95% CI 1.3-4.6) y gravedad de la EAC.^{22,31,32} En presencia del genotipo B1/B1 se han observado niveles de Fg de 274 mg/dl, en heterocigotos de 298 mg/dl y con el genotipo B2/B2 de 369 mg/dl.^{23,36}

Por otra parte, el posible valor predictivo del riesgo cardiovascular del polimorfismo -148C/T no es tan claro, aunque se ha asociado con severidad angiográfica de la aterosclerosis post-infarto³¹ y predicción de aterosclerosis en carótidas.³⁷ Sin embargo, algunos estudios no han encontrado asociación entre polimorfismos (*TaqI*, *BclI*, -455G/A y *Sac I*), niveles de Fg y EAC.³⁸ Cabe mencionar que considerando la interacción entre gen-medio ambiente, los polimorfismos del gen de la cadena β del Fg parecen influir en la respuesta individual al tabaquismo.³⁹

b) Factor V (FV): El FV es una glicoproteína con un PM de 330 kDa y con una vida media en el plasma de 12 h y su función principal es la formación de trombina.⁴⁰ La enzima protrombinasa activadora de protrombina esta compuesta de Ser-proteasa FXa y cofactor Va asociado a la membrana celular;

el FVa es requerido para la actividad de protrombinasa debido a su función dual como receptor y efector catalítico del FXa en la superficie de la célula.⁴¹

El gen del FV esta constituido de 25 exones y localizado en la región q21-25 del cromosoma 1.⁴² La molécula consiste de 2224 aminoácidos (a.a.), incluyendo 28 a.a. del péptido señal (Figura 5).^{43, 44}

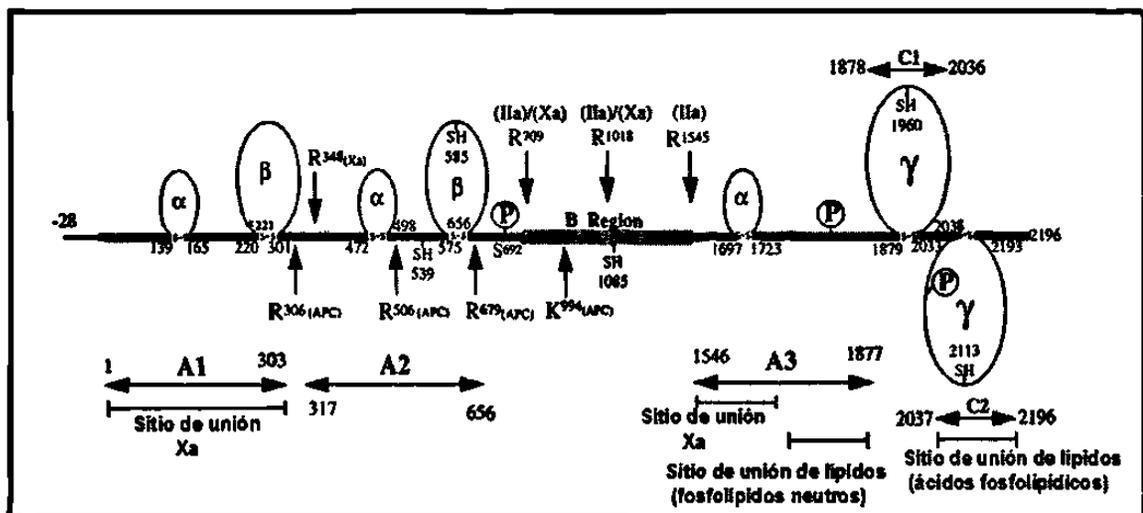


Figura 5.- Esquema de la estructura del FV. Esta compuesto de 2196 a.a., más un péptido señal de 28 a.a.^{37, 38} Los sitios de unión de los pro-cofactores para la activación se muestran con ---| . Los sitios de unión de la Proteína C Activada para la inactivación del FV se muestran como APC.⁴⁵ El factor V contiene triplicado el dominio A, duplicado el C y una región B que funciona como activador de péptido. El FV es procesado a FVa por α -trombina (IIa)⁴⁶⁻⁴⁸ a través de los sitios de anclaje Arg⁷⁰⁹, Arg¹⁰¹⁸, y Arg¹⁵⁴⁵. El factor Xa (Xa) también puede activar al FV por los sitios Arg⁷⁰⁹ y Arg¹⁰¹⁸.^{38, 49} La "P" identifica los sitios de fosforilación en la molécula (el primero sobre la parte terminal carboxilo de la cadena pesada y dos sobre la cadena ligera).³⁸ El esquema no está a escala.

El Polimorfismo G1691A del FV: Después de la identificación de la deficiencia de inhibidores de la coagulación, antitrombina,⁵⁰ proteína C⁵¹ y proteína S⁵² la alta prevalencia de trombosis se asocia a un solo gen,⁵³ identificándose la mutación en la posición 1691 (G>A) en el exón 10 del FV como la responsable.^{54,55} El polimorfismo G1691A (FV Arg506Gln, o FV Leiden) está asociado al fenotipo de Resistencia a Proteína C Activada (RPCA)⁵⁵ que

es el defecto más común en pacientes con Trombosis Venosa Profunda (TVP).^{56,57} Éste resulta de la pérdida de Arg en el sitio 506 que es un punto de anclaje para la PCA y subsecuentemente en la ineficiencia del proceso de unión en los sitios Arg306 y Arg679. Esta inactivación de la mutante del FVa provoca altos niveles de trombina lo cual da como resultado un estado de hipercoagulabilidad,⁵² reconociéndose al G1691A como un factor de riesgo prevalente para trombosis venosa en la población en general.⁵⁸⁻⁶⁰ El estado heterocigoto para el gen del FV está asociado con un incremento de cinco a diez veces de riesgo para trombosis y el homocigoto de 50 a 100 veces.^{53,61,62} Este defecto genético es encontrado predominantemente en población caucásica,^{53,59,63} siendo extremadamente raro en población asiática.⁶⁴ La frecuencia alélica en Europa se estima del 4.4%, con alta prevalencia en Grecia (7%), mientras que en Asia es solo del 0.6% y en África y sureste de Asia este alelo no ha sido encontrado.⁶³⁻⁶⁵

Por otra parte, aunque este polimorfismo se ha tratado de asociar en numerosas ocasiones con enfermedad coronaria, el resultado ha negativos.⁶⁶⁻⁶⁹ En contraste, algunos estudios reportan asociación positiva, particularmente cuando este polimorfismo y su interacción es estudiado. Por ejemplo, en un estudio del FV G1691A en 88 mujeres jóvenes con infarto al miocardio (IM) y 388 controles, se encontró un OR para IM de 2.4 (IC, 1.0-5.9).⁷⁰ El polimorfismo tiene un efecto pobre sobre los no fumadores, ya que al compararlos con los fumadores, el OR se incrementó hasta 32 veces.⁵⁰ En un estudio de casos y controles en hombres de edad media (560 pacientes y 646 controles) se

encontró un incremento del riesgo de IM. El riesgo se amplificó en fumadores (OR, 6.1; IC, 3.0-12.5) y con factores de riesgo metabólicos para IM (OR, 3.2; IC, 1.5-6.7).⁷¹ Un estudio (n = 826) de las arterias femoral y carotidia encontró asociación entre RPCA y estenosis, revelando una asociación independiente y gradual entre la baja respuesta a PCA, la avanzada aterosclerosis y enfermedad arterial.⁷²

c) **Factor VII (FVII):** El FVII circulante tiene un PM de 50 kDa con una vida media de 3.5 h. El gen está localizado en el cromosoma 13, muy cerca del gen del factor X en la región q34 (Figura 6). El FVII se une al Factor Tisular (FT), siendo este complejo el que activa al factor IX y X. La inhibición es llevada a cabo por el inhibidor vía FT (TFPI en inglés) en complejo con el FXa y por la antitrombina (AT), pero solo en presencia de heparina.⁴⁰

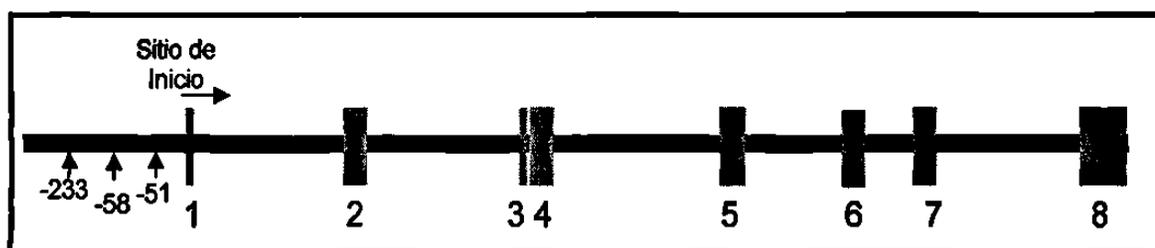


Figura 6.- Esquema de la estructura del gen del FVII. Consiste de 8 exones y 7 intrones con un tamaño de 13 Kpb y con una organización muy similar a los otros factores dependientes de vitamina K. Con un sitio mayor de inicio de la transcripción en la posición -51 del sitio de transcripción y otros tres sitios menores. Entre las posiciones -233 y -58 se encuentran un elemento de respuesta a hormonas y un sitio de unión al factor de transcripción Sp1.⁴⁰ El esquema no está a escala.

Varios estudios prospectivos han examinado la asociación de la actividad coagulante del FVII (FVIIc) y la enfermedad aterotrombótica y sin embargo, los resultados fueron discrepantes.⁷³ El estudio Northwick Park Heart encontró

una relación positiva entre FVIIc y EAC que fue fuertemente correlacionado con los niveles de colesterol.⁷⁴ Sin embargo, reportes posteriores han fallado en confirmar este hallazgo.⁵⁰ Similar al Fg, varios factores ambientales influyen en los niveles del FVII, incluyendo edad, el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de triglicéridos. Este último hecho, podría explicar en parte la asociación entre hipertrigliceridemia y enfermedad trombotica.

Polimorfismo R353Q del FVII: Varios polimorfismos en el gen del FVII han sido descritos, los cuales son los responsables del 30% de las variaciones plasmáticas de la proteína. El más estudiado y fuertemente correlacionado es el Arg353Gln el cual se encuentra en el dominio catalítico de la proteína, correspondiente al exón 8 del gen. Estudios de expresión in vitro sugieren que el Arg353 (alelo normal) resulta en niveles más altos de FVII que los del alelo normal.⁷⁵ Sin embargo, en estudios clínicos el efecto de este genotipo sobre los niveles plasmáticos y FVIIc no ha sido corroborado.⁵⁰

Pocos estudios han demostrado asociación entre los polimorfismos del gen y EAC. El más representativo es un estudio de casos y controles en adultos jóvenes italianos con historia familiar de IM, donde pacientes con el genotipo Q/Q tienen un decremento en el riesgo (OR, 0.08; 95% IC, 0.01-0.9). El genotipo R/R se asoció con alto riesgo, seguido del R/Q y por el Q/Q (P<0.001). El genotipo Q/Q se asoció a bajos niveles del antígeno y de actividad del FVII, en donde los bajos niveles de actividad se relacionaron con riesgo bajo de IM (OR, 0.13; 95% IC, 0.05-0.34).⁷⁶ Más aún, Girelli D y cols. reportaron en

pacientes con aterosclerosis coronaria severa que tenían el genotipo Q/Q, niveles bajos de actividad del FVII de hasta el 72% al compararlos con pacientes con el genotipo silvestre (R/R). De hecho, resultó significativamente más frecuente la carga genotípica del alelo Q (RQ + QQ) en los pacientes que no tenían IM, que en los que si lo tenían ($p=0.01$).⁷⁷ En contraste varios estudios han fallado en determinar alguna asociación de este genotipo con el riesgo IM.^{78,79}

d) **Protrombina (FII):** Es un zimógeno, dependiente de vitamina K el cual es sintetizado principalmente en el hígado. El PM es de aproximadamente 72 kDa y tiene una vida media en el plasma de 60 h. El gen del FII está localizado en el cromosoma 11 cerca del centrómero (Figura 7).⁴⁰

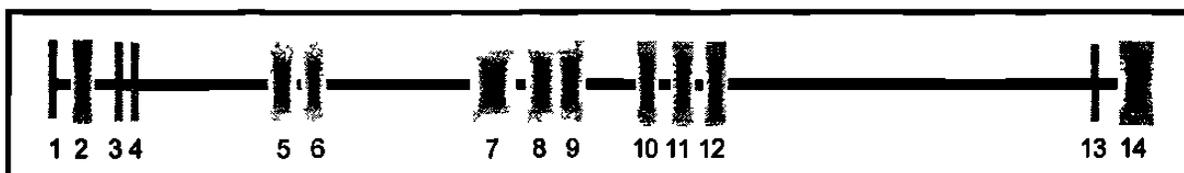


Figura 7.- Esquema de la estructura del gen del FII. El gen esta en la región p11-q12 del cromosoma 11, compuesto de 14 exones de un tamaño que fluctúa entre 25 y 315 pb y de 13 intrones con un longitud que varía de 84 a 9,447 pb, para un tamaño total aproximado de 20 Kpb.^{80,81} La región promotora del FII no contiene la caja TATA, pero tienen múltiples sitios potenciadores de la transcripción entre la 3 y 38 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.⁴⁰ El esquema no está a escala.

Polimorfismo G20210A del FII: Este polimorfismo se encuentra en la región 3' no traducida del RNAm, causando niveles elevados de protrombina mediante la acumulación del RNAm y por ende mayor síntesis de la proteína.⁸² El polimorfismo G20210A del FII en EAC ha sido examinado en numerosos

estudios, y muchos de éstos han redituado en resultados negativos.⁸³ Sin embargo otros estudios han mostrado asociación de esta variante con EAC e IM en poblaciones altamente seleccionadas.^{71,84} Más aun, la carga del alelo 20210A incrementa cuatro veces el riesgo de IM y si es asociado al tabaquismo, incrementa el riesgo más de 40 veces.⁸⁵ En un análisis combinado de FV Leiden y el alelo de la protrombina 20210A, el efecto de los factores de riesgo coronarios fueron potenciados de cuatro a seis veces por la presencia de uno de estos polimorfismos. Estas interacciones fueron confirmadas en dos estudios de casos y controles de hombres que tenían un riesgo creciente de IM asociado a FV Leiden y a la variante G20210A, el cual era mayor en presencia de otros factores de riesgos cardiovasculares.⁸⁵⁻⁸⁷ Por si fuera poco, un estudio de hombres en edad media con IM (560 pacientes y 646 controles) reportó incremento de riesgo para IM para ambos polimorfismos.⁸⁸ Y en personas fumadoras y con factores de riesgo metabólicos para IM el riesgo fue amplificado por la variante G20210A.⁶⁹

e) Factor XIII (FXIII): Esta es una glicoproteína de 320 kDa, con una vida media de 10 días. Es una protransglutaminasa que es activada por trombina en presencia de Ca⁺, la cual sirve como zimógeno para la fibrinolisina y está compuesta de dos subunidades A y B; las cuales son sintetizadas principalmente en la médula ósea y en el hígado, respectivamente. De las dos subunidades, la A es la que tiene la función catalítica y la B es sólo de carga. El gen de la cadena A del FXIII está localizado en el cromosoma 6 en

la región p24-q25 (Figura 8). El de la cadena B, está en el cromosoma 1 en la región q31-q32 (Figura 9).⁴⁰

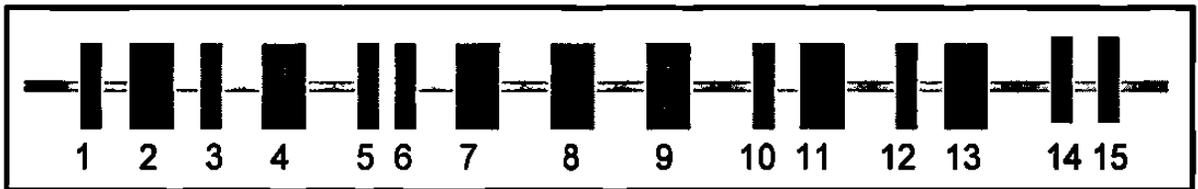


Figura 8.- Esquema de la estructura del gen de la cadena A del FXIII. Está compuesto por 15 exones y 14 intrones con un tamaño aproximado de 160 Kpb. El dominio de unión a fibrina es codificada en el exón 2 y el sitio activo está presente en el exón 7. El sitio de transcripción es desconocido, pero se conocen tres sitios potenciadores el -170, -150, y -40 del sitio de inicio. Dibujo no a escala



Figura 9.- Esquema de la estructura del gen de la cadena B del FXIII. Está compuesto por 12 exones y 11 intrones con un tamaño aproximado de 28 Kb. La regulación de la expresión es poco estudiada, pero un total de 30 sitios de inicio están localizadas río arriba del sitio de inicio. El esquema no está a escala.

Polimorfismo Val34Leu del FXIII: Después de su activación por trombina, el FXIII activado (FXIIIa) cataliza la unión covalente entre las cadenas α y γ de las cadenas adyacentes de monómeros de fibrina, estabilizando el coágulo de ésta.⁸⁹ Varios polimorfismos han sido identificados en la subunidad A, siendo el funcionalmente más relevante, el que codifica la sustitución de una valina por una leucina en la posición 34 del exón 2 (Val34Leu).⁹⁰ Localizado solo a 3 a.a. del sitio de anclaje de la trombina, por lo que juega un papel crítico en la interacción FXIII-Trombina. La isoforma menos común 34Leu es activada más rápidamente con una eficiencia catalítica de 2.5 veces más alta y menor tiempo de formación del coágulo cuando se compara con 34Val.⁹¹ Una activación más rápida influyen en la formación de la fibrina y la estructura

molecular del coágulo: la fibrina unida en presencia de la isoforma 34Leu no agrega lateralmente, generando coágulos que consisten en fibras más finas, poros más pequeños, y en última instancia, un red más fina con la permeabilidad alterada.^{89,91}

Sorpresivamente, recientes estudios clínicos reportan una asociación entre el polimorfismo Val34Leu y trombosis arterial, donde la carga del alelo 34Leu decrementa el riesgo IM e infarto cerebral. Dos estudios publicados de casos y controles encuentran asociación entre el Val34Leu e historia de IM. Donde pacientes con enfermedad coronaria e historia de IM, el alelo Leu34 fue significativamente menos común.⁹² En estos pacientes con historia de IM se observaron altos niveles PAI-1, mayor frecuencia del genotipo 4G/4G, y la interacción con otros factores coagulantes y con el síndrome de resistencia a insulina.⁹³⁻⁹⁵

Lim y cols.⁹⁶ recientemente propusieron que este efecto aparentemente paradójico podría ser debido a la interacción gen-gen o gen-medio ambiente, donde altas concentraciones del Fg en muestras de homocigotos para Leu forman coágulos con permeabilidad incrementada y una estructura más laxa con fibras más densas que los coágulos formados por las muestras de homocigotos para Val. Esto ayuda a explicar las observaciones clínicas que en presencia de 34Leu se atenúan los efectos adversos del cigarro en el riesgo de enfermedad cerebro-vascular⁹⁷ e IM.⁹⁸ Además, el efecto protector puede

reflejar actividades alternas de FXIII, tales como la promoción de angiogénesis.⁹⁹

1.4.2 Receptor de superficie de plaquetas

a) **Glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa):** Las glicoproteínas de superficie de membrana son esenciales para la adhesión de las plaquetas a los componentes de la matriz extracelular subendotelial y para la interacción plaquetas-plaquetas⁴⁰ Gp IIb es una proteína ligada por puentes disulfuro, de 150 kDa unida a GpIIIa (polipéptido de 90 kDa) (Figura 10). El GPIIb/IIIa (conocido también como integrina IIb β 3) es el primer receptor de superficie de plaquetas para Fg; también se une al FV y a otros ligandos de adhesión.¹⁰⁰

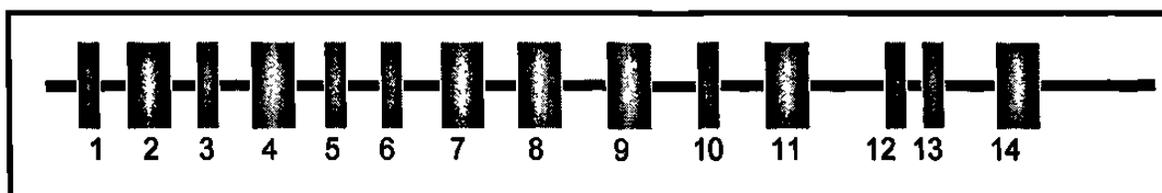


Figura 10.- Esquema de la estructura del gen del GPIIIa. Está formado por 14 exones y 13 intrones en el cromosoma 17 en la región q21-q23.^{101,102} El esquema no está a escala.

Polimorfismo del GPIIIa (GPIIIa): Muchos polimorfismos han sido identificados en GpIIb/IIIa en la población, pero el más importante clínicamente es el que se encuentra en la subunidad GPIIIa, el cual es la sustitución de T por C en la posición 1565 (T1565C) en el exón 2 del gen del GPIIIa. Lo que da como resultado la sustitución de una prolina por leucina en el a.a. 33 (Leu33Pro), repercutiendo en un cambio conformacional en el lazo de disulfuro del amino terminal importante para la unión al Fg.¹⁰³ Este polimorfismo se encuentra en el 15% de la raza blanca y del 5% al 8% en los negros, pero está

virtualmente ausente en asiáticos; la isoforma más común es 33Leu conocida como PLA1 y la 33Pro, como PLA2.¹⁰⁴

En 1996, Weiss y cols.¹⁰⁵ fueron los primeros en publicar la asociación del PLA2 con el riesgo de trombosis coronaria aguda. La prevalencia del polimorfismo fue 2.1 veces más alto en los pacientes que en los controles (39.4% vs. 19.1%, $p=0.01$), siendo el OR de 2.8 para un evento coronario en general y en pacientes donde el inicio de la enfermedad fue menor a los 60 años el OR fue de 6.2 (IC, 1.8-22.4). Éste fue seguido por un reporte de casos de muerte por IM en atletas olímpicos, los cuales eran homocigotos para PLA2.¹⁰⁶ Sin embargo existen varios reportes donde no encuentran esta asociación.¹⁰⁷⁻¹¹¹ Un ejemplo son los resultados reportados por los estudios US Physicians Health que incluyó a 374 pacientes con IM y a 704 controles¹⁰⁷ y el ECTIM con 620 IM y 700 controles,¹⁰⁸ en los cuales no se observa asociación entre el alelo PLA2 y IM.

En el estudio Copenhagen City Heart,¹¹² se realizó una investigación prospectiva en la población Danesa en general ($n=9,149$, 22 años de seguimiento) en donde el 70.0%, 27.3%, y 2.7% fueron homocigotos PLA1, heterocigotos y homocigotos PLA2, respectivamente. La incidencia de EAC en hombres homocigotos PLA2 fue mayor que los hombres que no tenían el genotipo ($p=0.006$); esta diferencia no fue observada en mujeres ($p=0.33$). Al estratificar por edad, los hombres mayores de 50 años tenían un riesgo relativo de EAC de 3.6, concluyendo que el homocigoto PLA2/PLA2 está asociado con 3 y 4 veces más riesgo de sufrir EAC e IM en hombres jóvenes.

Dos estudios han reportado la asociación de PLA2 y la extensión del ateroma coronario por angiografía. En el primero se asoció a más del 50% de estenosis en más de un vaso¹¹³ y en el segundo a EAC severa en pacientes con bajo riesgo.¹¹⁴ Sin embargo otros estudios no encontraron esta asociación.^{108,111,115}

1.4.3 Sistema Fibrinolítico

a) **Activador Tisular del Plasminógeno (t-PA):** El t-PA es una serin proteasa que activa la proenzima plasminógeno a plasmina, la cual es responsable de la actividad fibrinolítica.¹¹⁶ Es sintetizado en las células endoteliales vasculares como una sola cadena polipeptídica de 527 a.a. y su gen se encuentra en el cromosoma 8 (Figura 11).^{117,118}

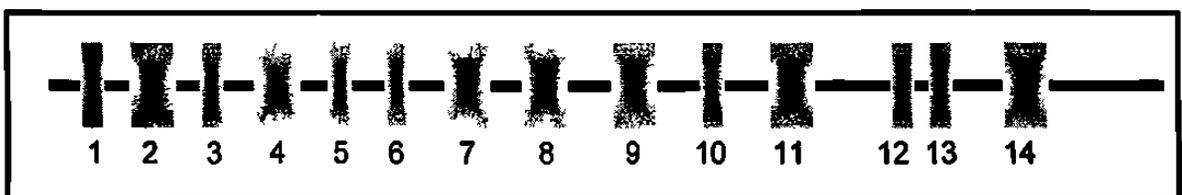


Figura 11.- Esquema de la estructura del gen t-PA. Está formado por 14 exones y 13 intrones, localizado en el cromosoma 8 en la región p12-q11.2 con un tamaño de 33 Kpb.^{119,120} El esquema no está a escala.

Inserción/Delección Alu en el gen t-PA (Alu I/D): Varios cambios nucleotídicos han sido identificados en el gen t-PA, siendo el más estudiado la Inserción/Delección de copias de la secuencia repetitiva de la familia Alu [Alu I/D (tamaño de 311 pb)] que se encuentra en el intron 8. En un estudio de cohorte de 8,000 sujetos, la presencia de la inserción fue asociada con el incremento del 50% de riesgo para IM, donde la carga homocigota tiene dos veces más

riesgo,¹²¹. Estos resultados sin embargo no fueron confirmados en otros estudios al tratarlos de asociar a trombosis arterial¹²², oclusión venosa¹²³ e infarto cerebral.¹²⁴

b) Inhibidor del Activador del Plasminógeno-1 (PAI-1): El PAI-1 es un miembro de la familia de las serpinas y su función es la inhibición del tPA, previniendo la fibrinólisis sistémica. Existe en la circulación en mayor exceso que el tPA¹²⁵ y tiene un peso de 45 kDa, compuesto por 402 a.a.¹²⁶ El gen está localizado en el cromosoma 7 en la región q21.3-q22 (Figura 12).¹²⁷

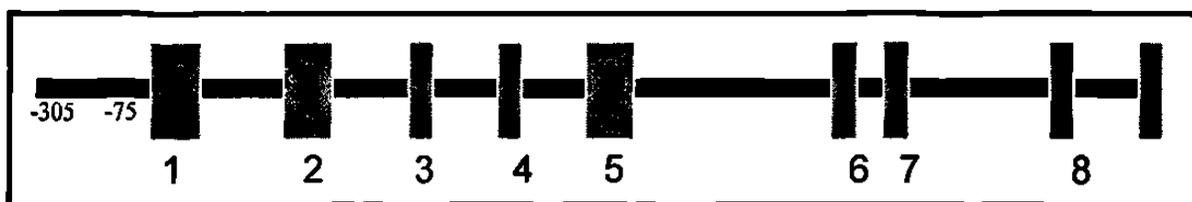


Figura 12.- Esquema de la estructura del gen PAI-1. Está compuesto por nueve exones y ocho intrones; existe en la región promotora entre los nucleótidos -305 y -75 un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG). El esquema no está a escala.

Elevadas concentraciones de PAI-1 se han asociado con riesgo vascular.^{128, 129}

El sistema fibrinolítico es un regulador de los depósitos de fibrina en la pared de los vasos. El desequilibrio de este sistema en el desarrollo de la enfermedad vascular podría explicarse en teoría por el decremento de la fibrinólisis y la alta concentración plasmática del PAI-1 podría resultar en el incremento del depósito de fibrina en la placa y subsecuentemente en la formación de la placa.¹³⁰ También se han asociado con varios desórdenes trombóticos¹³¹⁻¹³³ y como factor de riesgo independiente de reinfarcto en pacientes quienes han tenido su primer infarto antes de los 45 años.^{134,135} Existe una asociación entre

la presencia de EAC y la baja actividad fibrinolítica con un incremento plasmático de PAI-1.¹³⁶

En un estudio prospectivo multicéntrico se asociaron altos niveles de actividad PAI-1 con eventos coronarios subsecuentes en pacientes con angina, sin embargo esta asociación desaparece al ajustar por resistencia a insulina, IMC, triglicéridos y colesterol.¹³⁷ Más aun, en un estudio de casos y controles, los altos niveles de PAI-1 predicen la ocurrencia del primer IM.¹³³

Las concentraciones del PAI-1 son más bajas durante el día que en la noche¹³⁸ y se ha propuesto que la alta incidencia de IM en las primeras horas de la mañana podría deberse a las altas concentraciones de esta proteína, y por lo tanto a la baja actividad fibrinolítica en la noche.¹³⁹

Polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 (4G/5G PAI-1): Existen varios polimorfismos reportados en el gen del PAI-1, de los cuales el 4G/5G PAI-1 es el más estudiado en la enfermedad cardiovascular. Se encuentra en la posición -675 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción (cinco o cuatro guaninas).^{127, 140,141}

Sujetos que son homocigotos para el alelo 4G tienen un 25% más elevado los niveles plasmáticos de la proteína que los que son 5G.¹⁴² Estudios *in Vitro* han identificado sitios de unión para proteínas de regulación transcripcional en esta región. Donde el incremento de la transcripción del gen está asociada a la presencia de 4G, y esto resulta de la unión de un activador transcripcional. En

la presencia de 5G, hay también la unión a un represor que decrementa la unión del activador.^{141, 142}

En pacientes con hipertrigliceridemia, el genotipo 4G/4G rinde mas altos niveles de PAI-1 que los que genera el genotipo 5G/5G, indicando una interacción específica del genotipo-triglicéridos.¹⁴³ Estos hallazgos han sido soportados por la identificación de un sitio sensible a éstos en la región adyacente al sitio 4G/5G.¹⁴⁴ Más aun, los triglicéridos incrementan la producción de PAI-1 por los hepatocitos in vitro, un efecto que es mediado por los receptores de lipoproteínas de baja densidad e incrementa la presencia de insulina.¹⁴⁵ Estas observaciones indican que el síndrome de resistencia a la insulina, por acción de los triglicéridos altera la síntesis y secreción de PAI-1 aumentando el riesgo ateromatoso.¹³⁰

Existen varios estudios que relacionan el polimorfismo 4G/5G y la enfermedad cardiovascular. Por ejemplo Dawson y cols. encontraron una alta frecuencia del alelo 4G en hombres con la enfermedad.¹⁴⁰ Similares resultados fueron obtenidos en pacientes con diabetes tipo 2 y IM.¹⁴⁶ En un estudio de pacientes con angiografía coronaria, el alelo 4G resultó significativamente asociado con niveles elevados de PAI-1 y con IM previo en pacientes con ateroma establecido.¹⁴⁷

En un estudio de 1179 sujetos normales y sus parientes en primer grado, el alelo 4G fue asociado con riesgo de IM.¹⁴⁸ En otro se relacionó con el desarrollo de SCA,¹⁴⁹ sin embargo dos grandes estudios, el Etude Cas-Témoin de

l'Infarctus du Myocarde¹⁵⁰ y the Physicians' Health Study,¹⁵¹ no encontraron asociación entre el genotipo y IM. En un estudio de 2565 sujetos con angiografía, el genotipo PAI-1 fue relacionado con la presencia de ateroma en todas las muestras y a la severidad del mismo en un subgrupo de alto riesgo.¹⁵² Un estudio de casos y controles de más de 600 pacientes con evidencia de enfermedad cerebro vascular, no encontró diferencia entre la frecuencia genotípica en los pacientes vs controles.¹⁵³

Las características funcionales del polimorfismo 4G/5G y su aparente interacción con las concentraciones de triglicéridos, sugieren que el alelo 4G contribuye más al IM en presencia de hipertrigliceridemia asociada con resistencia a insulina que en su ausencia. Un meta análisis de los estudios relevantes, muestra un efecto significativo del genotipo PAI-1 sobre el IM.¹⁵⁴

1.4.4 Proteína Reactante de Fase Aguda

a) Proteína C Reactiva (CRP, en inglés): La CRP es una proteína que pertenece a la familia de las pentraxinas, consiste de cinco subunidades de 23 kDa asociadas no covalentemente alrededor de un poro central, producida principalmente en hígado.^{155,156} El gen de la CRP está localizado en el cromosoma 1 y contiene sólo un intrón (Figura 13).

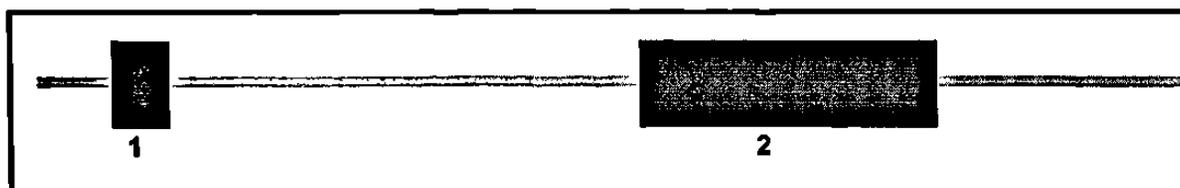


Figura 13.- Esquema de la estructura del gen de la CRP. Se localiza en el cromosoma 1 en la región q21-q23, formado por dos exones y un intrón.¹⁵⁷ La transcripción del gen es regulado principalmente por la IL-6.¹⁵⁸ El esquema no está a escala.

La respuesta más fundamental y más temprana de la inflamación a una lesión es la respuesta de fase aguda, un ajuste rápido y (generalmente) transitorio en la concentración de las proteínas agudas en el plasma. De éstos, la CRP es el prototipo. Esta proteína es un marcador de la inflamación, participante en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (disfunción endotelial y aterosclerosis^{159, 160}), activación celular y en los procesos inflamatorios (Figura 14).¹⁶¹ Esta proteína reactante de fase aguda ha demostrado ser una medida confiable de la inflamación, y un predictor de IM e infarto cerebral. Aunque los niveles de CRP pueden aumentar 1000 veces en respuesta a una infección o trauma. La vida media de la proteína en plasma es grande y su medición en pacientes sin historia anterior de enfermedad cardiovascular demuestra ser un predictor fuerte de los acontecimientos vasculares futuros.¹⁶²⁻¹⁶⁷

La relación entre los niveles de CRP y el riesgo vascular futuro ha sido constantemente estudiado en los Estados Unidos y Europa, encontrándose en la mayoría de los casos independiente de la edad, tabaquismo, colesterol, presión arterial y diabetes (factores de riesgo "tradicionales" principales evaluados en la práctica diaria). Estos niveles tienen valor pronóstico a largo

plazo y en un estudio reciente la CRP fue predictor de riesgo para IM a 20 años de la medición de la proteína.¹⁶⁸

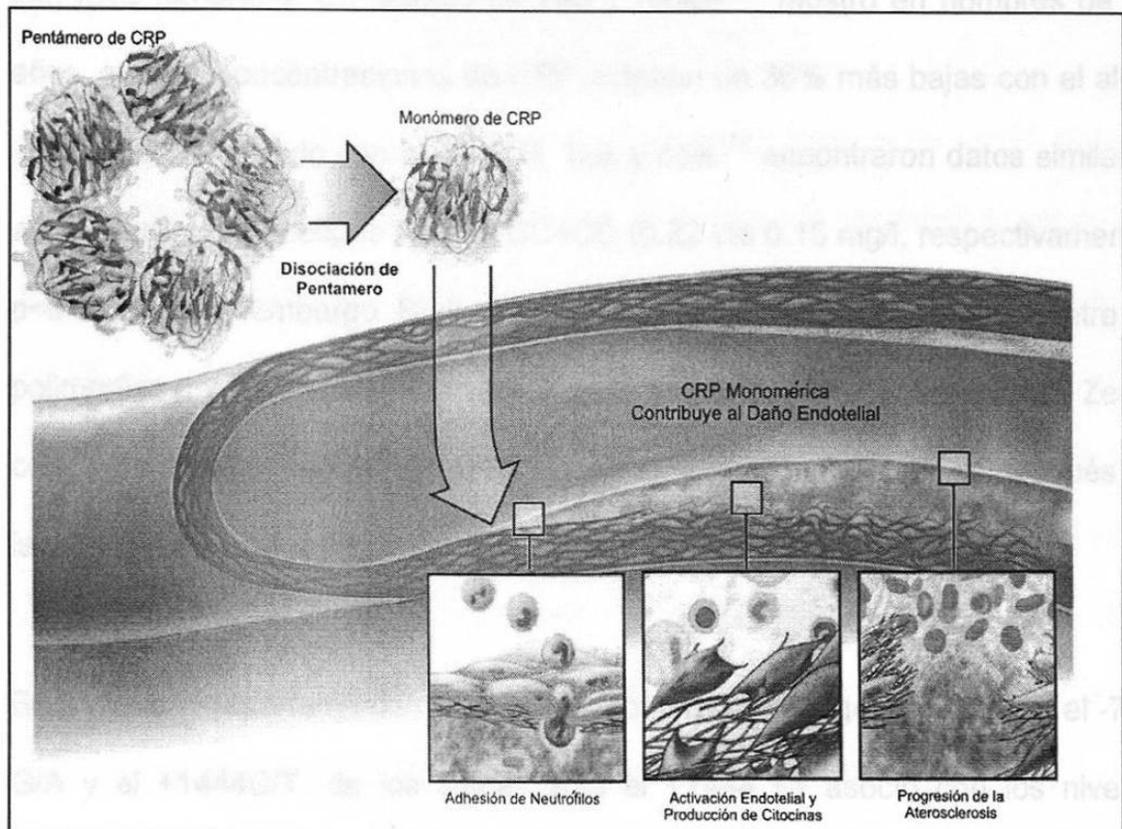


Figura 14.-Patofisiología de la CRP. Posiblemente es necesario que el pentámero de CRP se disocie en monómeros, y éstos sean los responsables de la contribución al daño endotelial mediante cuatro procesos básicamente: la adhesión de neutrófilos, la activación endotelial, la producción de citocinas y la progresión de la aterosclerosis.¹⁶⁹

Polimorfismos en el gen de la CRP: Recientemente, se ha establecido que existe un componente genético asociado a niveles elevados de la CRP. Los niveles basales de la proteína muestran una clara asociación a la herencia, del 39 al 40% en estudios familiares,^{170,171} del 26% en jóvenes¹⁷² y en familias con IM un 31%.¹⁷³

Varios polimorfismos han sido encontrados en el gen de la CRP, el primero que se reportó fue el G1059C en el exón 2, el cual es silencioso, ya que el codón

CTG (Leu) que cambia a CTC da como resultado el mismo a.a.¹⁷⁴ Este polimorfismo se identificó por primera vez en sujetos canadienses diabéticos con EAC temprana. Un estudio de Zee y Ridker¹⁷⁵ mostró en hombres de 60 años, que las concentraciones de CRP estaban un 36% más bajas con el alelo 1059 C al compararlo con el 1059 G. Suk y cols¹⁷⁶ encontraron datos similares al comparar los genotipos GG vrs GC+CC (0.22 vrs 0.15 mg/l, respectivamente, $p < 0.0001$). Sin embargo Brull y cols¹⁷⁷ no encontraron asociación entre el polimorfismo y los niveles plasmáticos de la proteína.¹⁷⁸ Por si fuera poco, Zee y cols¹⁷⁹ no hallaron asociación entre el polimorfismo y la reestenosis después de la angioplastia en los pacientes.

Brull y cols¹⁷⁷ reportaron dos nuevos polimorfismos en el gen de la CRP, el -717 G/A y el +1444C/T, de los cuales solo el +1444 se asoció con los niveles elevados de CRP en pacientes con EAC post-marcapaso cuando tenían el genotipo +1444T/T al compararlo con los niveles de los pacientes con la carga alélica de +1444C (198 ± 17 versus 164 ± 5 , $p = 0.03$). Recientemente se descubrió otro polimorfismo en la posición -286 (C>T>A) con respecto al sitio de inicio de la transcripción, el cual fué fuertemente relacionado con los niveles plasmáticos de la CRP, predominantemente en los pacientes con EAC. Pero no se encontró diferencia entre los pacientes vs controles.¹⁸⁰

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

Dados los cambios demográficos y los avances en materia de salud, al igual que en los países industrializados, la investigación biomédica sobre las enfermedades cardiovasculares es también prioritaria en México, debido a las crecientes tasas asociadas de mortalidad, morbilidad e incapacidad. Adicionalmente, las frecuencias de los marcadores genéticos, como los que nos propusimos estudiar, y su asociación con las enfermedades, varían entre grupos étnicos, de tal manera que estos marcadores generalmente son útiles para determinar riesgos en poblaciones bien definidas y por esto también es relevante hacer esta investigación en nuestra población.

La demostración de asociación entre marcadores y efectos adversos tempranos post-SCA sería muy útil para identificar a los pacientes de riesgo alto para eventos cardiovasculares adversos y para establecer tratamientos más racionales e individualizados. Esta investigación también sería relevante para el esfuerzo mundial que se está haciendo para identificar marcadores genéticos generales de respuesta al tratamiento y para la identificación de nuevos blancos terapéuticos para enfermedad coronaria estable (ECE) y SCA.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar marcadores genéticos que pudieran ser útiles como posibles predictores de la evolución clínica a mediano plazo (un año) de sujetos con SCA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las frecuencias de los polimorfismos de los marcadores genéticos elegido, en las tres cohortes [SCA (cohortes experimental), ECE y normales (cohortes de control)].
2. Determinar los parámetros bioquímicos y hematológicos durante el episodio SCA y compararlos con los datos obtenidos en las cohortes de control.
3. Determinar la correlación de los polimorfismos y niveles plasmáticos de los factores bioquímicos y hematológicos analizados.
4. Realizar el seguimiento de la cohorte experimental a los 3, 6 y 12 meses después de su ingreso al estudio, para determinar el comportamiento de las variables dependientes (efectos adversos post-SCA).
5. Establecer las correlaciones estadísticas entre las variables dependientes y las variables independientes (hallazgos bioquímicos, hematológicos y los polimorfismos de los marcadores genéticos seleccionados en este estudio).

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos planteados, se siguió la estrategia que se detalla e ilustra, a continuación (Figura 15).

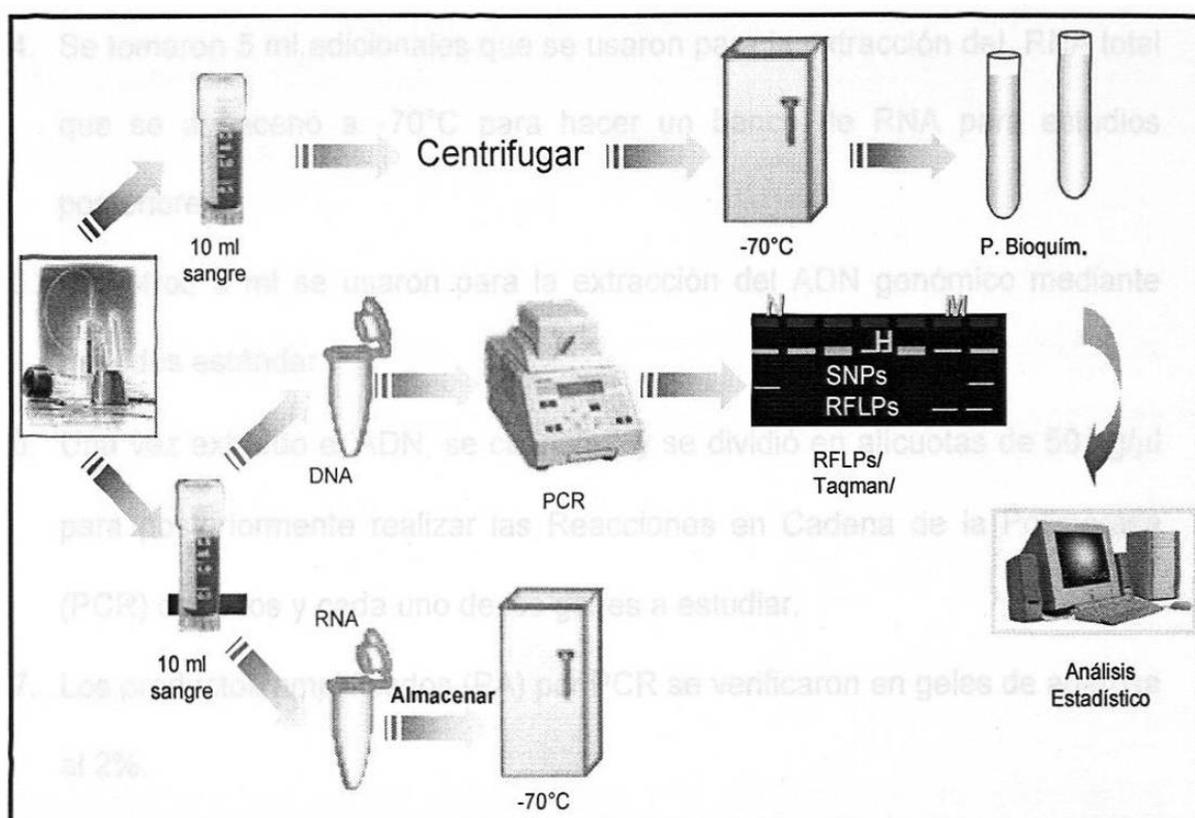


Figura 15.- Estrategia General. Se ilustran los pasos que comprenden la estrategia experimental realizada en este trabajo:

1. Se recolectaron un total de 150 muestras (SCA, ECE y sanos), a partir de sujetos derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que acudían al Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax en Monterrey, Nuevo León, México.

2. Los pacientes con SCA se les realizó un seguimiento de un año posterior al evento agudo.
3. Se tomaban 20 ml de sangre periférica, de los cuales 10 ml se utilizaron para extraer el plasma, almacenándose a -70°C hasta el momento de las determinaciones bioquímicas de los niveles plasmáticos de las proteínas en estudio.
4. Se tomaron 5 ml adicionales que se usaron para la extracción del RNA total que se almacenó a -70°C para hacer un banco de RNA para estudios posteriores
5. Los otros 5 ml se usaron para la extracción del ADN genómico mediante métodos estándar.
6. Una vez extraído el ADN, se cuantificó y se dividió en alícuotas de $50\text{ ng}/\mu\text{l}$ para posteriormente realizar las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) de todos y cada uno de los genes a estudiar.
7. Los productos amplificados (PA) por PCR se verificaron en geles de agarosa al 2%.
8. Posteriormente se realizaron los cortes con enzimas de restricción y los productos se observaron en geles de agarosa al 2 y al 4%, según los tamaños de las bandas que daban cada uno de los PA.
9. Una vez obtenidos los niveles de las proteínas, las frecuencias de los polimorfismos y el seguimiento a 1 año, se realizó el análisis estadístico.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario "Dr. José E. González" de la UANL, y del Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax del IMSS. Se realizó en forma prospectiva de Septiembre del 2003 a Agosto del 2005.

Además este estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social en la convocatoria SSA/IMSS/ISSTE-CONACYT 2002 (SALUD-2002-CO1-7162).

5.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS

A continuación se detallan los reactivos y el material que se utilizó en el desarrollo del proyecto y las casas comerciales de donde fueron adquiridos.

Los tubos de vidrio vacutainer con Citrato de Sodio y EDTA fueron adquiridos con Becton Dickinson de México, S.A. DE C.V. (Cuautitlan Izcalli, Edo. México, México).

Entre los reactivos necesarios para preparar las soluciones requeridas en la extracción de ADN genómico se encuentran SDS, Trizma® Base y NaCl de SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA), EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA).

Las Reacciones de PCR se hicieron con la enzima *Taq*ADN polimerasa y con el MgCl₂ de Promega Corporation (Madison, WI, EUA). El buffer de PCR así como los dNTPs fueron adquiridos de GIBCO-BRL Life Technologies (Grand Island, NY, EUA).

Las enzimas de restricción que se emplearon para digerir los productos amplificados fueron adquiridas de New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, EUA), Roche Applied Science (D.F., México) y Fermentas Inc. (Unit A Hanover, MD, EUA). Se utilizaron en cada caso las condiciones recomendadas por el fabricante. La agarosa que se utilizó para preparar los geles analíticos se adquirió de Invitrogen™ Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Entre los reactivos necesarios para preparar el buffer de corrida TBE se encuentran ácido bórico y Trizma® base de Sigma Chemical CO (St, Louis, MO, EUA) y EDTA de Amersham/Life Science (Cleveland, OH, EUA). También se utilizaron solventes orgánicos de la casa comercial Merck® (EM Science, Gibbstown, NJ, EUA) como cloroformo y etanol. El fenol se adquirió de Sigma Chemical CO (St, Louis, MO, EUA).

5.2 MATERIAL CONSUMIBLE

El material de plástico que se utilizó fueron tubos Eppendorf (0.5, 1.5 y 2.0 ml) y puntillas (0.01, 0.2 y 1.0 ml) para las micropipetas de Biomol SA de CV, Monterrey NL, Mex. También se utilizaron tubos falcón de 15, y 50 ml y guantes de látex de Cell Associates, Houston, TX, EUA.

5.3 EQUIPO DE LABORATORIO

Las micropipetas (10, 20, 200 y 1000 µl) utilizadas se adquirieron de Gilson Raining Instruments Co, Inc. (Emeryville, CA, EUA). Para separar los plasmas se utilizó una centrifuga J-600 de SOL-BAT (México). En el aislamiento de ADN se utilizó una centrifuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vortex modelo 37600 y un Thermomixer de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), una centrifuga de eppendorf modelo 5403 (Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Alemania) una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania) y una microcentrífuga Eppendorff modelo 5412 (Hamburg, Alemania). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador PTC-100 JM-Research (Watertown, MA, EUA) y para las digestiones se usó un Omni-E Hydbaid (Reino Unido).

Para verificar los productos amplificados se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales fotodyne (Hartland, WI, EUA) y una fuente de poder modelo 250 ambos de Gibco-BRL. Para analizar los geles de agarosa se utilizó el equipo de

fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa Molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

5.4 PROGRAMAS DE ANÁLISIS COMPUTACIONAL

El procesamiento de datos se llevó a cabo en una computadora personal HP PAVILION. También se utilizó un Scanner HP Scan-Jet 5100 C (Hewlett-Packard, Inc). El procesador de texto y gráficos utilizados fueron Microsoft® Word XP y Microsoft® Power Point XP de Microsoft Corporation.

Se utilizó un sistema de análisis de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Documentation System 1000, BIO-RAD). Los programas de biología molecular empleados fueron Oligo 4.0, Amplify 1.0 y el ADN Strider™1.1 (© 1989, France), así como el programa Analyst de BIO RAD (Hercules, CA, EUA). Los programas utilizados por vía Internet fueron: Entrez (Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST Network Service (Blaster); GenBank (ICEBEG, Trieste, Italia).

El navegador empleado para Internet fue Microsoft Explorer Versión 6.0 (Microsoft Corporation). Todo el análisis se realizó usando un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

5.5 ÁREAS DE TRABAJO

El reclutamiento de los pacientes y la colección de las muestras se llevó a cabo en el Servicio de Urgencias del Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax, del IMSS, en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México. El trabajo experimental de este proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.6 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS SUJETOS

El grupo de pacientes (SCA) fueron elegidos con los siguientes **criterios de inclusión:** a) Edad entre 35 a 75 años, b) SCA definido por depresión o elevación del segmento ST, con o sin necrosis secundaria a aterotrombosis, c) estabilidad clínica. **Criterios de Exclusión:** a) mayor a 75 años, b) SCA secundario a: estrés de esfuerzo, hipertensión descontrolada, estenosis aórtica, hipertensión arterial pulmonar crónica o aguda, tirotoxicosis, anemia, falla del corazón, vasodilatación excesiva, etc. c) Killip clase III o IV, d) SCA en los tres últimos meses, e) Fracción de expulsión < 35 %, f) Enfermedad hematológica, hepática o neoplásica, h) actividad inflamatoria aguda o crónica, i) consumo excesivo de alcohol.

Grupo de ECE: pacientes con diagnóstico establecido a través de angiografía coronaria e infarto previo de más de seis meses. **Controles:** sujetos aparentemente sanos sin historia de enfermedad cardiovascular. Los integrantes de los grupos ECE y Controles se eligieron con relación al grupo en

estudio por edad y sexo y la toma de muestras se realizó bajo condiciones similares a las del grupo en estudio.

Cada sujeto en el estudio (controles y enfermos) firmó una forma de consentimiento informado antes de incorporarse al estudio (Anexo).

5.7 DEFINICIÓN DE EVENTOS ADVERSOS INTRAHOSPITALARIOS

Isquemia recurrente: nuevo episodio de dolor torácico sugestivo de isquemia, mayor de 5 minutos de duración.

Reinfarto: 2 o más de los siguientes criterios. 1) angina \geq 20 minutos, 2) nueva elevación del segmento ST (> 0.1 mv) en dos derivaciones subyacentes o la presencia de una nueva onda Q, 3) nueva elevación de la fracción MB de la CPK total arriba del 50% del límite superior normal alto, o del 50% del valor basal. 4) reoclusión angiográfica de la arteria relacionada con el infarto previamente permeable.

Choque cardiogénico: 1) TA sistólica $<$ de 90 mmHg sin el apoyo de sustancias vasoactivas o de 100 mmHg con el uso de vasopresores, 2) manifestaciones clínicas y/o radiográficas de HVCP, 3) signos de hipoperfusión vascular periférica, 4) acidosis metabólica, 5) índice cardíaco $<$ 2.2 L/min/m², 6) presión capilar pulmonar $>$ de 18 mmHg, y 7) una diferencia arteriovenosa de oxígeno $>$ 5.5 ml/dl.

Defunción cardiovascular: mortalidad en la fase aguda o en el seguimiento atribuida al SCA inicial descartando otro origen.

5.8 MATERIAL BIOLÓGICO

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron en tubos con EDTA y Citrato de Sodio, a partir de sujetos que asistieron a la consulta del Servicio de Urgencias del Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax, del IMSS, en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, México de Enero del 2003 a Diciembre del 2004.

5.9 MÉTODOS

5.9.1 Muestra de sangre y análisis de laboratorio

Por la exquisita sensibilidad de los marcadores séricos en manipulaciones *in Vitro*, las muestras se obtuvieron bajo cuidados extremos. Una vez que el paciente firmó el consentimiento informado, dos personas con entrenamiento especial realizaron una punción venosa con un tubo de ensayo al vacío. Se recolectaron 3 ml de sangre venosa en un tubo con citrato de sodio (ACD) y otros 10 ml en un tubo con EDTA.

La punción se realizó con una aguja número 20 en una región del brazo sin grietas, pliegues o soluciones de continuidad. La muestra siempre se obtuvo antes de iniciar cualquier tratamiento fibrinolítico, antitrombótico, antiplaquetario o procedimientos invasivos, incluyendo la colocación de líneas intravenosas.

Las muestras anticoaguladas con ACD se centrifugaron inmediatamente a una temperatura de 4°C y el plasma obtenido se utilizó para determinar los niveles

de las proteínas. El material anticoagulado con EDTA se utilizó para el aislamiento de ADN. El personal del laboratorio se mantuvo ciego al diagnóstico clínico de los sujetos.

5.9.2 Técnica de Extracción del ADN

A partir de las muestras de sangre recuperadas de los SCA, ECE y Sanos se extrajo el ADN mediante la técnica TSNT.¹⁸¹

1.- Se colocaban 2.5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA en 2 tubos Falcon de 15 ml, se centrifugaban por 4 min. a 2000 rpm para separar el paquete celular. El plasma era descartado y a cada pastilla se le agregaba lo siguiente:

a) Se añadía al paquete celular 1 ml de buffer de lisis TSNT (2% tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA disódico). Y se mezclaba en vortex.

b) Se agregaban 2.5 ml de Fenol saturado. Se mezclaba nuevamente.

c) Se agregaban 0.5 ml de Sevag. Se agitaban en el vortex hasta homogenizar completamente (entre 3 y 5 min.).

d) Se añadía 1 ml de TE 1X pH=8.

2.- Toda la mezcla se centrifugaba 20 min a 10 000 rpm y la fase acuosa se transfería a un tubo falcon de 15 ml. Si después de centrifugar una vez, la fase acuosa estaba muy turbia, se realizaba una segunda extracción fenol: sevag (0.5 volúmenes de cada uno).

3.- Se precipitaba el ADN agregando 2 volúmenes de etanol 100% (aproximadamente 10 ml). Se mezclaba lentamente por inversión hasta observar la precipitación del ADN en forma de una hebra blanca.

***El ADN precipitado se recuperaba con una puntilla de plástico de 1 ml y transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml.

4.- Se centrifugaba por 5 min a 10,000 rpm, se decantaba el sobrenadante teniendo cuidado de que no se desprendiera la pastilla de ADN.

5.- Se añadía 1 ml de etanol al 70%, mezclándose para lavar la pastilla.

6.-Se centrifugaba 3 min a 14 000 rpm, decantándose y secándose.

7.- Y por ultimo la pastilla se resuspendía en TE 1X pH=8 (el volumen para la resuspensión dependieron del tamaño de la pastilla, aproximadamente de 200 - 1000 μ l). Los ADNs resuspendidos se almacenaban a -20°C hasta su utilización.

5.9.3 Reacciones de amplificación (PCRs) de los genes estudiados

La PCR es una técnica rápida que permite, mediante reacciones cíclicas de temperaturas, amplificar *in Vitro* un fragmento específico de ADN y obtener millones de copias del fragmento de interés para su posterior análisis. La especificidad de la reacción esta dada por la secuencia de iniciadores (oligonucleótidos aintticos) que se utilizan para delimitar la secuencia del fragmento a amplificar. En este caso, cada uno de los polimorfismos a analizar requirió del diseño de iniciadores específicos de cada gen, en la región que

contenía el polimorfismo. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos de los genes estudiados se observan en la Tabla 2, los cuales se describen en dirección de 5' a 3'.

Tabla 2.- Oligonucleótidos para amplificar los genes estudiados, sus secuencias y claves.

Polimorfismos	Secuencia de los Oligonucleótidos	Clave de Almacén
Fg		
-148C/T, -455G/A	AAG AAT TTG GGA ATG CAA TCT CTG CTA CCT CTC CTC ATT GTC GTT GAC ACC TTG GGA C	807 (C/T-148F:5'-) 808 (C/T-148R:5'-)
+1689T/G	TGG TTA ATC TGG TTA AGT CTG G GTC AGT AGC TAT ACA TCC TTT G	809 (T/G1689F:5'-) 810 (T/G1689R:5'-)
Taq I	ACC CGT GCC TAT CTT TG TGT CTC AGG TAC ATT TAG C	813 (TaqIF:5'-) 814 (TaqIR:5'-)
Bcl-1	ACC TGG TTT CTC TGC CAC AAG AAT AGT TCT CAT ACC ACA GTG T	811 (BclI F:5'-) 812 (BclI R:5'-)
FV: G1691A	GAT CTG TGT GAT CTG AGA AAC CTC T GAG GTA CCA GAG ACA GAG ACG TG	817 (G/A1691F:5'-) 818 (G/A1691R:5'-)
FVII: R353Q	GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAC ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC	877 (R353QF) 878 (R353QR)
PT: G20210A	TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C	825 (PTF:5') 826 (PTR:5')
FXIII: Val34Leu	GACCTTGTAAGTCAAAAATGTC ACCCAGAGTGGTGGGGAAG GGAGCTTCAGGGCGT GGAGCTTCAGGGCTT	879 (Val34LeuF) 880 (Val34LeuR) 881 (Val34LeuFG) 882 (Val34LeuFT)
GPIIIa: PLA1/PLA2	GCTCCAATGTACGGGGTAAAC GGGGACTGACTTGAGTGACCT	909 (PIA2F:5) 910 (PIA2R:5)
t-PA: Alu I/D.	ACA GCT CAC AGT TCT GTC TGA CAA CC CCT GGA AGT CTG GTA GGC ACA CAG TCT GC	819 (AluF:5'-) 820 (AluR:5'-)
PAI-1: 4G/5G	AAG CTT TTA CCA TGG TAA CCC CTG GT TGC AGC CAG CCA CGT GAT TGT CTA G GTC TGG ACA CGT GGG GG GTC TGG ACA CGT GGG GA	824 (CoGF:5') 823 (5G/4GR:5') 821 (5GF:5'-) 822 (4GF:5'-)
RCP: G1059C -717A/G	GATCTGTGTGATCTGAGAAACCTCT GAGGTACCAGAGACAGAGACGCTG ACTGGACTTTTACTGTCAGGGC ATCCCATCTATGAGTGAGAACC	885 (PCR1059F) 886 (PCR1059R) 911 (PCR717F) 912 (PCR717R)

5.9.4 Condiciones de amplificación

Para iniciar las reacciones de PCR se usaron parámetros estándares (Tabla 3), que conforme se estandariza de ban las condiciones de cada reacción, podían ir cambiándose, utilizando ciclos de temperatura que se observan en la Tabla 4 y un tiempo promedio de reacción de tres h. Los tamaños de los productos amplificados (PA) variaron de 142 a 1301pb y se verificó su amplificación en geles de agarosa al 2%.

Tabla 3.- Condiciones iniciales de PCR para los polimorfismos.

Componentes	Vol. por reacción
Buffer 10X	2.5 µl (1X)
dNTPs 10 mM	0.5 µl (0.2 mM)
TaqADN polimerasa 5U/µl	0.5 µl (0.1 U/µl)
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µl (1.5 mM)
Primer 1 5 µM	2.5 µl (0.5 µM)
Primer 2 5 µM	2.5 µl (0.5 µM)
ADN	1.0 µl (50 ng)
H ₂ O miliQ	15.0 µl
	25.0 µl

Tabla 4.- Programa inicial de amplificación para los polimorfismos.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	5 min
2. 94°C	1 min
3. 53°C	1 min
4. 72°C	1 min
5. 72°C	15 min

Los pasos 2 al 4 se repitieron por 40 ciclos.

5.9.5 Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).

Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de diferentes tamaños, tras su digestión con enzimas de restricción. Los PA fueron digeridos de acuerdo con las condiciones de reacción señaladas por la casa comercial New England Biolabs, Gibco-BRL Life, y Fermentas (Tabla 5). En el Anexo II se describen las condiciones específicas para cada enzima.

Tabla 5.- Reacción inicial de digestión para los polimorfismos.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 a 20 μ l
Buffer	1 μ l (1X)
Enzima	1 μ l (1 a 5U)
H ₂ O miliQ	3 μ l
Volumen final	15 a 25 μl

Las reacciones se incubaron en un rango de 37 a 65°C (12 h) según la enzima utilizada.

Después del tiempo de incubación, las reacciones de digestión fueron verificadas por electroforesis (110 V por 4 h) en geles de agarosa al 4%.

Para asegurar la calidad de las genotipificaciones, los resultados fueron validados tamizando nuevamente el 10% de muestras seleccionadas al azar y todas aquellas con patrón homocigoto para los alelos mutantes, de acuerdo a lo