

propuesto por Bladbjerg y cols.¹⁸³ Dos observadores independientes analizaron los genotipos. Los desacuerdos fueron resueltos por otra lectura común.

5.9.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se empleó la hoja de cálculo Microsoft Excel XP, La diferencia entre las medias de los grupos y las variables continuas fueron evaluadas usando la t-Student de dos colas, evaluándose el resultado por la prueba de Wilcoxon. Las variables discretas se analizaron mediante Chi-cuadrada usando la corrección de Yates ó la prueba exacta de Fisher, según fuera necesario. Se uso la Razón de Momios (RM) y Riesgo Relativo (RR) con intervalos de confianza (IC) del 95% para determinar la probabilidad y el riesgo de la enfermedad y eventos adversos.

Además se realizaron modelos univariados, y Regresiones Multivariada y Logística para determinar las variables más significativas. La significancia estadística fue establecida para valores de $p < 0.05$. Los datos se reportaron en porcentajes, medias, desviaciones estándar, IC y RM. Todo el análisis se realizó usando un paquete estadístico comercial (GBSTAT versión 10.0 of Dynamic Microsystems, Inc., Copyright 2004).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Muestras para el estudio.

En el estudio se incluyeron 50 pacientes con SCA, 50 pacientes con ECE y 50 sujetos controles admitidos en el Servicio de Urgencias del Hospital de Especialidades de Tórax del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, México, durante el periodo enero 2003 - diciembre 2004.

6.2 Características demográficas y clínicas de los sujetos.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con SCA, ECE y de los sujetos sanos se observan en la Tabla 6. En donde se observa que el tabaquismo es la única variable clínica significativa entre los grupos. Y en los pacientes con SCA se observa una proporción parecida entre los que elevaron el ST y los que no.

Tabla 6.- Características de la población de estudio.

Característica	Controles n=50 (%)	ECE^b n=50 (%)	SCA^c n=50 (%)	p
Edad (años, ±SD)	59.5±7.4	61.9±8.7	61.7±8.2	NS
Mujeres	18 (36)	17 (34)	17 (34)	
Hombres	32 (64)	33 (66)	33 (66)	NS
Antecedentes				
Familiares				
Diabetes	16 (32)	19 (38)	27 (54)	0.004
SCA	8 (16)	26 (52)	11 (22)	<0.0001
Hipertensión	14 (28)	22 (44)	23 (46)	0.01
Factores de riesgo del sujeto				
Diabetes	0 (0)	28 (56)	25 (50)	NE
Tabaquismo	14 (28%)	23 (46%)	27 (54%)	0.0007
Hipertensión	0 (0)	31 (62)	28 (56)	NE
Dislipidemia	2 (4)	10 (20)	13 (26)	<0.0001
Vida Sedentaria	27 (54)	27 (54)	32 (64)	NS
IMC	27±4.9	29±7.5	29±7.5	NS
Electrocardiograma				
SCA:				
Con Elevación ST	---	---	29 (58)	NE
Sin Elevación ST	---	---	21 (42)	NE

NS=No significativo; NE=No evaluadas

6.3 Estandarización de la detección de los polimorfismos.

Se analizaron 14 polimorfismos en 9 genes, a cada uno de los cuales se les realizó PCR y RFLPs de los PA, para la amplificación y detección de los mismos. Las cantidades y concentraciones de los reactivos para la PCR fueron los que se describen en la Tabla 3 con las temperaturas de amplificación de la Tabla 4. A cotinuación se describen los resultados de cada uno de los

polimorfismos analizados, su comportamiento electroforético después de la amplificación y/o digestión y los tamaños de los productos esperados para cada alelo

6.3.1. Polimorfismos del Fg. Para el fibrinógeno se analizaron cinco polimorfismos, cuatro de los cuales están en el gen de la cadena β (-455 G/A, -148 C/T, +1689 T/G y *Bcl-1*) y uno en la cadena α (*Taq I*). En las condiciones de amplificación, la temperatura de alineamiento cambió a 59°C para los cuatro polimorfismos y en la amplificación del *Bcl-1* se usaron 35 ciclos. En las Figuras 16 y 17 pueden observarse los PAs y los fragmentos que se obtienen al realizar las digestiones de los genes -455 G/A, -148 C/T y +1689 T/G.

Para el polimorfismo *Taq I*, el PA reportado en la literatura es de 900 pb y los fragmentos después del corte eran de 800 pb y 100 pb, sin embargo al realizar la amplificación y los cortes enzimáticos, los productos que resultaron eran de 950 pb y los fragmentos de 800 pb y 150 pb (Figura 18). Este resultado fue analizado obteniendo la secuencia del Gene Bank y confirmándose virtualmente el tamaño del PA y los cortes enzimáticos con los programas Amplify 1.0 y el ADN Strider™1.1, respectivamente.

Por último, el polimorfismo *Bcl-1* fue el más difícil de amplificar debido a las inespecificidades que presentaban y a la amplificación tan baja que se

observaba en los geles de agarosa al 2% (baja intensidad de la banda). Los fragmentos del PA se observan en la Figura 19.

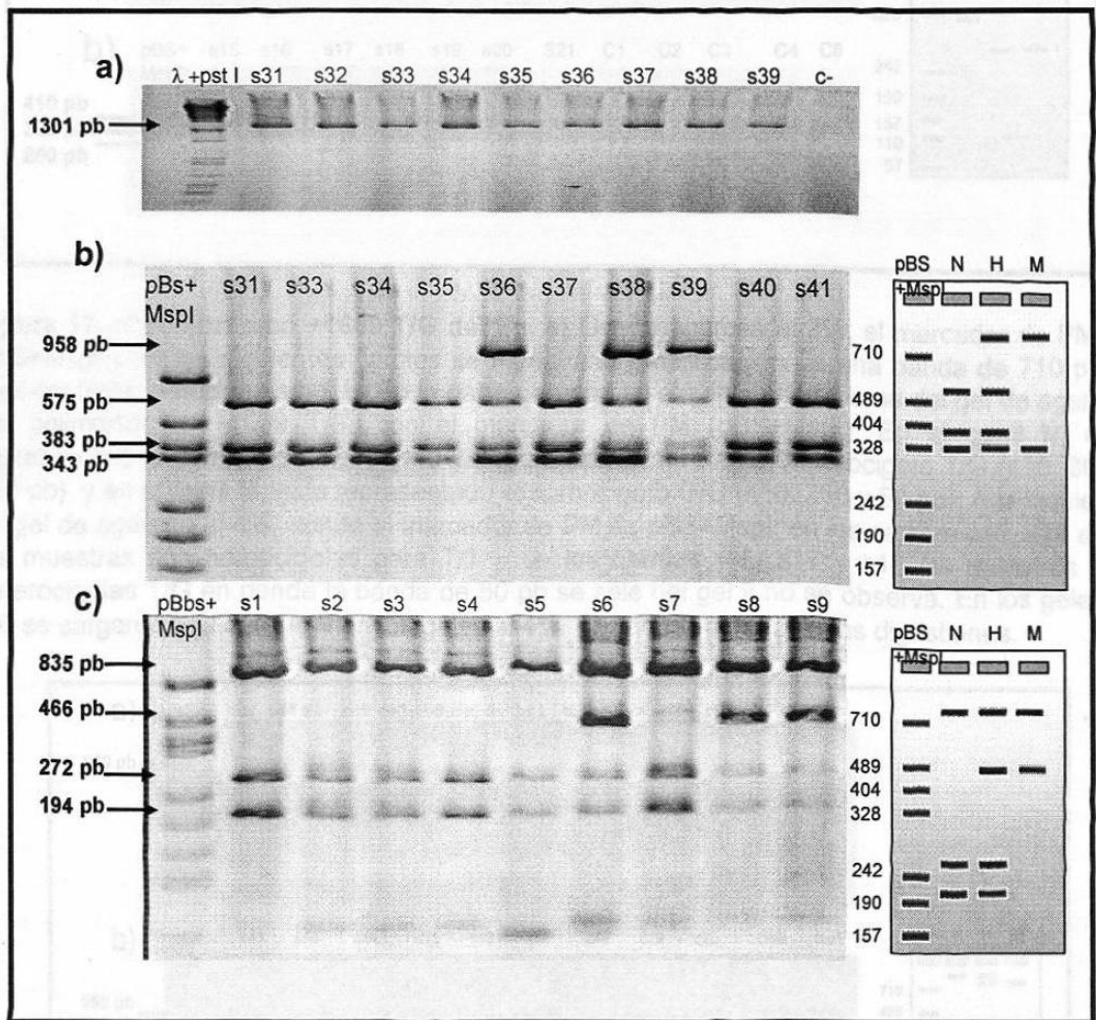


Figura 16.- Polimorfismos -455 G/A y -148 C/T del gen del Fg. a) Gel de agarosa al 2% el marcador de PM es λ +Pst I, y se observa la amplificación de un PA de 1301 pb de varias muestras el cual contiene los dos polimorfismos. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos -455 G/A, con el marcador de PM (pBS+Mspl). En el carril N, esta representado el homocigoto G/G (575, 383 y 343 pb); el carril H, es el heterocigoto G/A (958, 575, 383 y 343 pb), y en el carril M, esta representado el homocigoto A/A (958 y 343 pb). En la parte Izquierda esta un gel de agarosa al 4%, el marcador de PM es pBS+Mspl, y se observa que las muestras s31, s33, s34, s35, s37, s40 y s41 son homocigotas G/G y las muestras s36, s38 y s39 son heterocigotas G/A para el polimorfismo -455. c) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos -148 C/T, con el marcador de PM (pBS+Mspl) y en el carril N, esta representado el homocigoto C/C (835, 272 y 194 pb); el carril H, es el heterocigoto C/T (835, 466, 272 y 194 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto T/T (835 y 466 pb). En la parte Izquierda esta un gel al 4%, el marcador es pBS+Mspl, se observa que las muestras s1, s2, s3, s4 y s5 son homocigotas C/C y las muestras s6, s7, s8 y s9 son heterocigotas C/T para el polimorfismo -148. En el gel a) se cargaron 5 μ l de los PA y en los geles b) y c) se cargaron 15 μ l de las digestiones.

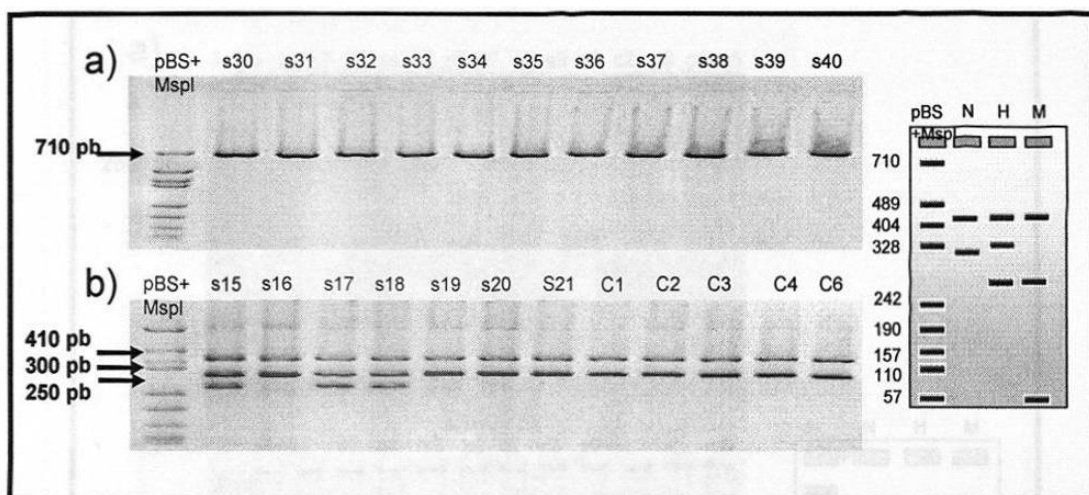


Figura 17.- Polimorfismo +1689 T/G del Fg. a) Gel de agarosa al 2%, el marcador de PM es pBS+MspI y en los siguientes carriles se muestra la amplificación de una banda de 710 pb la cual contiene el polimorfismo. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos +1689 T/G, con el marcador de PM (pBS+MspI). En el carril N, esta representado el homocigoto T/T (410 y 300 pb); el carril H, es el heterocigoto T/G (410, 300 y 250 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto G/G (410, 250 y 50 pb). A la izquierda un gel de agarosa al 4%, donde el marcador de PM es pBS+MspI, en los carriles s16, s19 al c6 las muestras son homocigotas para T/T y en los carriles s15, s17 y s18 las muestras son heterocigotas T/G en donde la banda de 50 pb se sale del gel y no se observa. En los geles al 2% se cargaron 5 µl del PA y en los geles al 4% se cargaron 15 µl de las digestiones.

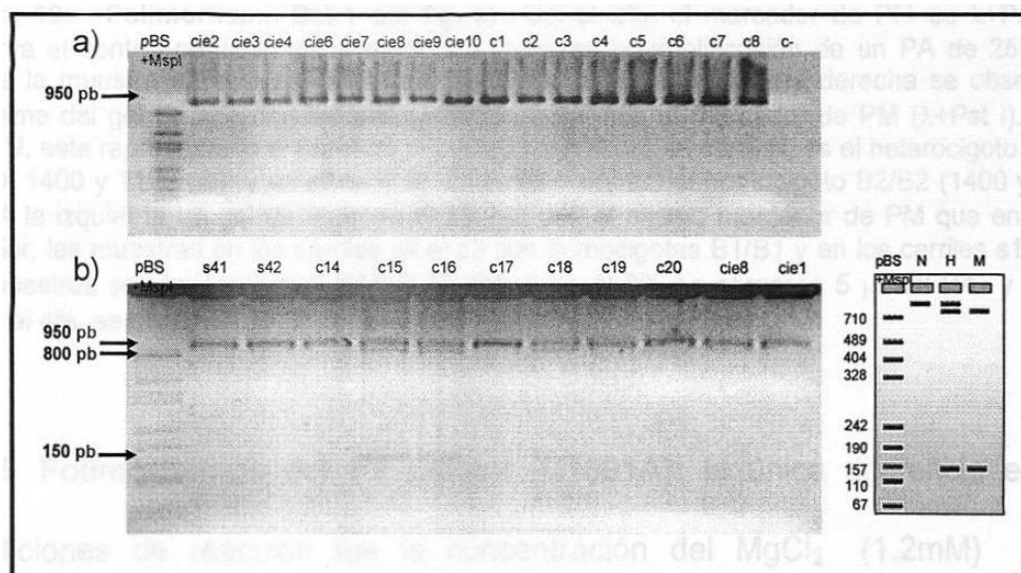


Figura 18.- Polimorfismo Taq I del Fg. a) Gel al 2%, el marcador de PM es pBS+MspI y en los siguientes carriles se muestra la amplificación de una banda de 950 pb la cual contiene el polimorfismo. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos Taq I, con el marcador de PM (pBS+MspI). Carril N, esta representado el homocigoto T1/T1 (950 pb); el carril H, es el heterocigoto T1/T2 (950, 800 y 150 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto T2/T2 (800 y 150 pb). A la izquierda un gel de agarosa al 4%, donde el marcador de PM es PBS+MspI, en los carriles s41, s42, c14, c17, c19 al cie1 las muestras son homocigotas para T1/T1 y en los carriles c15, c16 y c18 las muestras son heterocigotas T1/T2. En los geles al 2% se cargaron 5 µl del PA y en los geles al 4% se cargaron 15 µl de las digestiones.

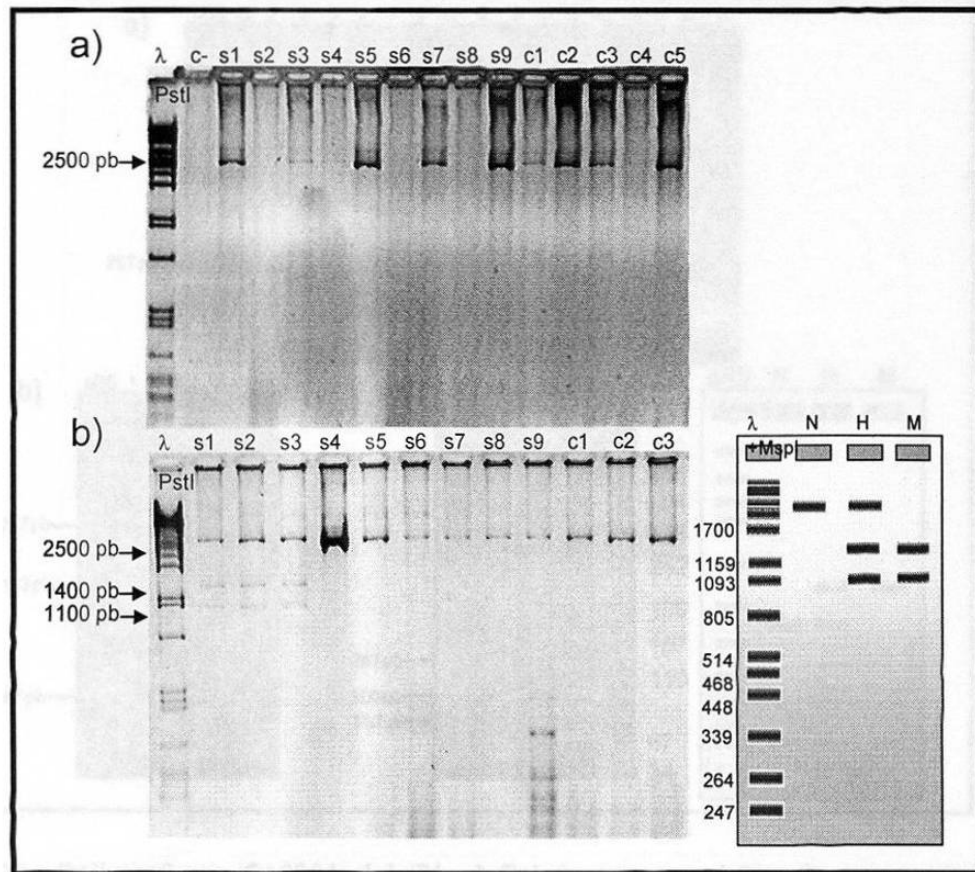


Figura 19.- Polimorfismo Bcl-1 del Fg. a) Gel al 2%, el marcador de PM es λ +Pst I se observa el control negativo en el carril c- y después la amplificación de un PA de 2500 pb, donde la muestra s2, s6 y s8 no se ve amplificación. **b)** En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos Bcl I, con el marcador de PM (λ +Pst I). En el carril N, esta representado el homocigoto B1/B1 (2500 pb); el carril H, es el heterocigoto B1/B2 (2500, 1400 y 1100 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto B2/B2 (1400 y 1100 pb). A la izquierda un gel de agarosa al 2%, se usó el mismo marcador de PM que en el gel anterior, las muestras en los carriles s4 al c3 son homocigotas B1/B1 y en los carriles s1 al s3, las muestras son heterocigotas B1/B2. En los geles al 2% se cargaron 5 μ l del PA y en los geles al 4% se cargaron 20 μ l de las digestiones.

6.3.2. Polimorfismos del FV Leiden (G1691A): la única diferencia en las condiciones de reacción fue la concentración del $MgCl_2$ (1.2mM) y las temperaturas del programa de PCR donde los tiempos fueron de 30 seg en lugar de 1 min, con una temperatura de alineamiento de 60°C por 30 ciclos. A pesar de la estandarización, algunas muestras presentaron una banda extra, la cual no era digerida con la enzima de restricción *Mnl I* por lo que no interfería en el diagnóstico de las muestras (Figura 20).

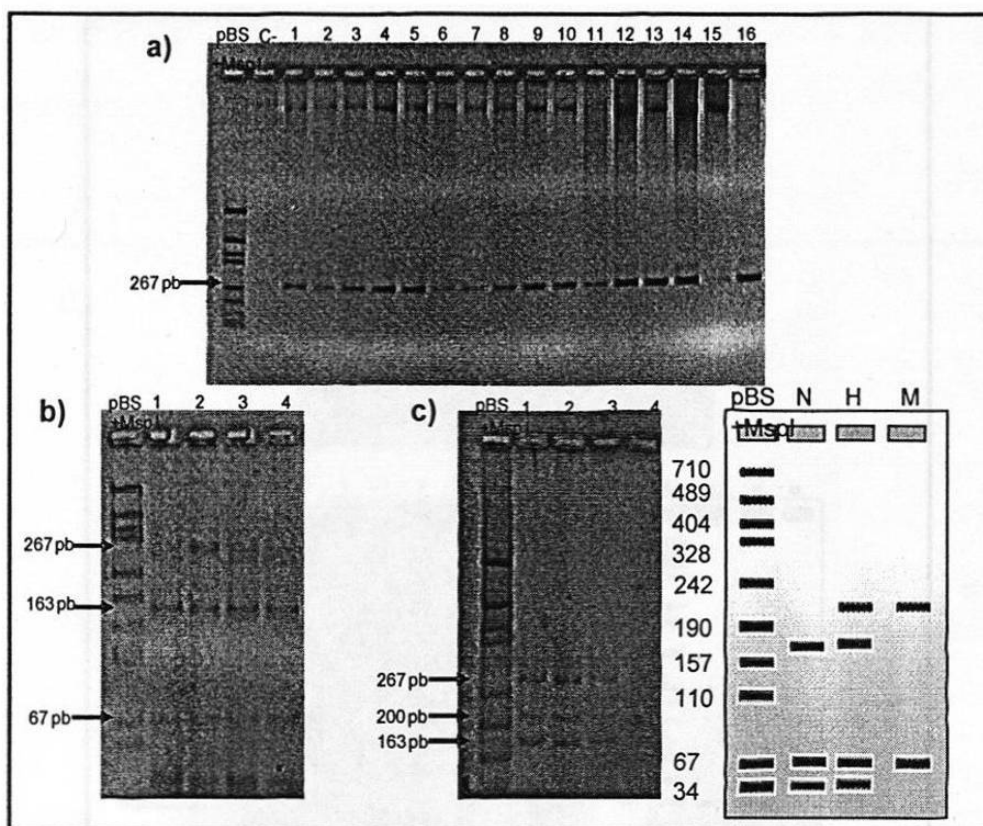


Figura 20.- Polimorfismo G1691A del FV. a) Gel de agarosa al 2%. El primer carril es el control negativo c- y en los carriles siguientes se observa un PA de 267 pb que corresponde a un fragmento del gen del FV. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismo G1691A, con el marcador de PM (pBS+Msp I). En el carril N, esta representado el homocigoto G/G (163, 67, 37 pb); el carril H, es el heterocigoto G/A (200, 163, 67, 37 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto A/A (200 y 67 pb). A la izquierda un gel de agarosa al 4%, donde se observan en todos los carriles muestras homocigotas G/G y en el gel de agarosa al 4% c) todas las muestras son heterocigotas G/A. La banda de 37 pb no se logra observar en los geles.

6.3.3 Polimorfismos del FVII (R353Q). En este caso se obtuvo un fragmento de 312 pb con una temperatura de alineamiento de 60°C por 35 ciclos. Este PA se cortó con la enzima de restricción *Msp* I dando fragmentos de 207, 67 y 38 pb para el alelo más común (R) y 272 y 40 pb para el alelo Q (Figura 21). Sin embargo no siempre se obtuvo la digestión completa en todas las muestras se digería la banda de 312 pb como se observan las muestras 7 y 9, pero esto no interfería con la tipificación.

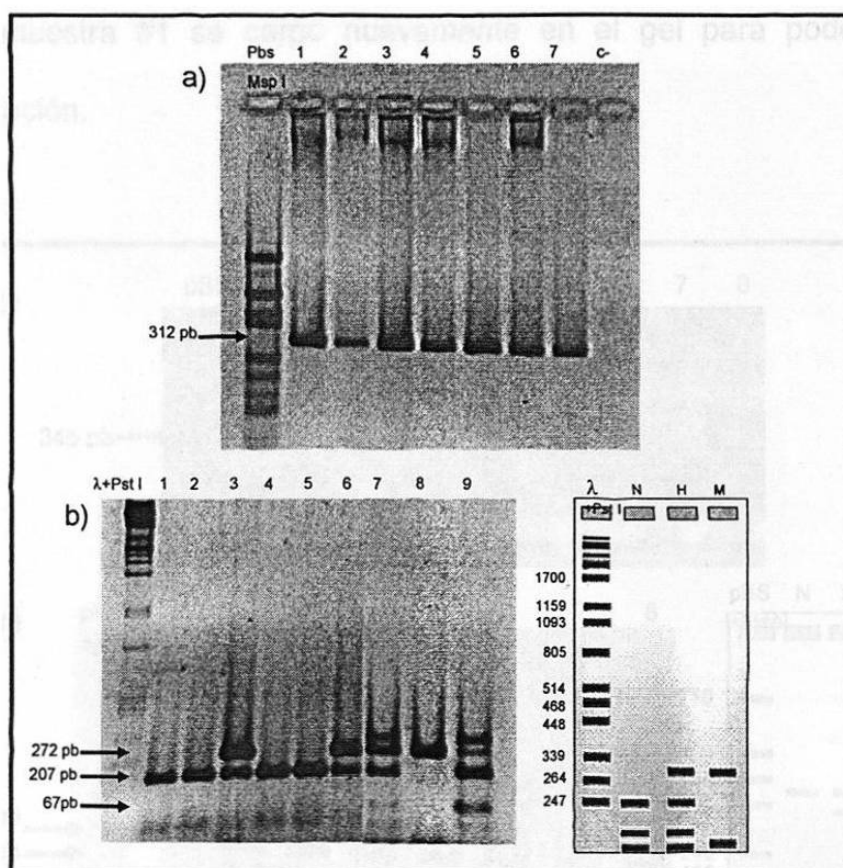


Figura 21.- Polimorfismo R353Q del FVII. a) Gel de agarosa al 2%, el carril c- es el control negativo y el resto de los carriles son muestras que amplifican un PA de 312 pb en donde el marcador de PM es PBS+Msp I y **b)** En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos R353Q, con el marcador de PM ((λ+Pst I). En el carril N, esta representado el homocigoto R/R(207, 67, 38 pb); el carril H, es el heterocigoto R/Q (272, 205, 67, 40, 38 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto Q/Q (272 y 40 pb). A la izquierda se observa un gel de agarosa al 4%, el marcador de PM es λ+Pst I y en los carriles 1, 2, 4 y 5 las muestras son homocigotas Arg/Arg, en los carriles 3, 6, 7 y 9 son heterocigotas Arg/Gln y en el carril 8 se observa que la muestra es homocigota para Gln/Gln (para fines de visualizar el homocigoto mutado se unieron dos geles). Las bandas 67 y 40 pb no siempre se observan en los geles, pero las muestras 7 y 9 son un ejemplo de ellas.

6.3.4. Polimorfismo del FII (G20210A): Este polimorfismo se amplificó a una temperatura de alineamiento de 61°C dando como resultado un PA de 345 pb, el cual no es digerido por la enzima de restricción *Hind* III cuando se encuentra el alelo G y corta el PA en dos bandas (322 y 23 pb) en presencia del alelo A. En los geles de agarosa al 4% el fragmento de 23 pb no es observado (Figura

22) y la muestra #1 se cargó nuevamente en el gel para poder hacer la genotipificación.

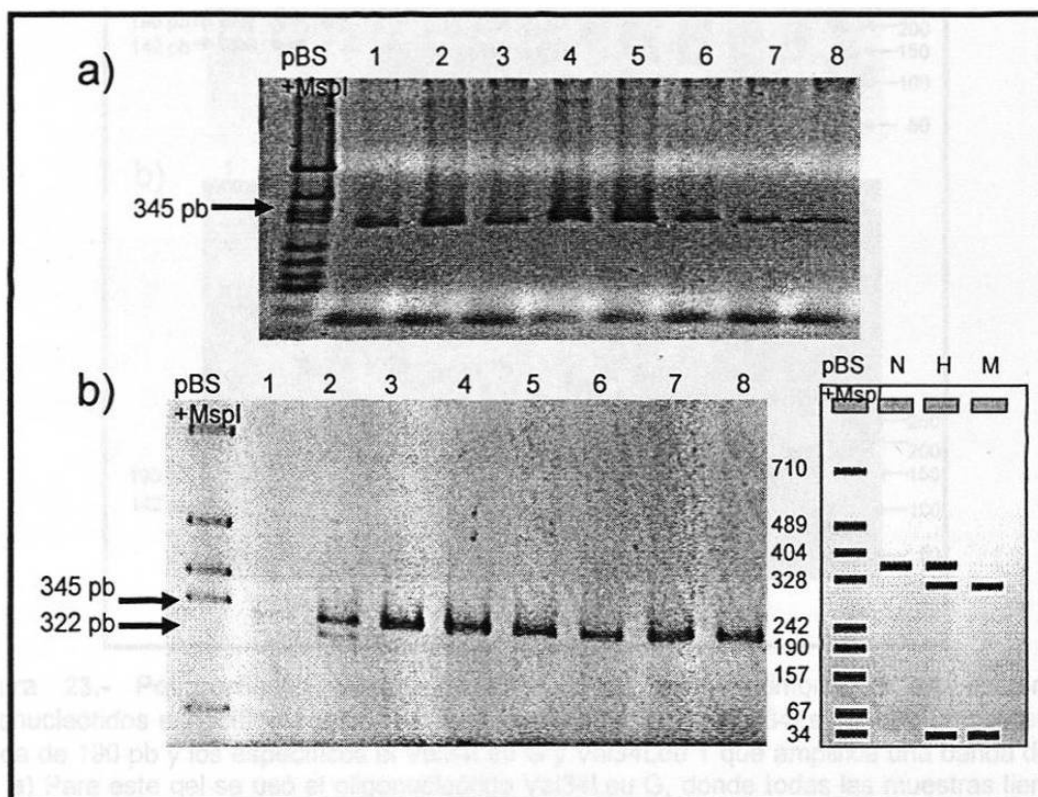


Figura 22.- Polimorfismo G20210A del FII. a) Gel al 2%, en los carriles se observa un PA de 345 pb que corresponde a un fragmento del gen del FII. **b)** En la parte derecha se observa el esquema de un gel de agarosa del polimorfismos G20210A, con el marcador de PM ((pBS+Msp I). En el carril N, esta representado el homocigoto G/G(345 pb); el carril H, es el heterocigoto G/A (345, 322, 23 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto A/A (322 y 23 pb). A la izquierda se observa un gel de agarosa al 4%, donde las muestras 1, 3 al 8 son homocigotas G/G y la muestra 2 es heterocigota G/A.

6.3.5. Polimorfismo en el FXIII (V34L): A diferencia de los anteriores, la genotipificación para éste polimorfismos se realizó usando oligonucleótidos específicos. Donde el alelo G (Val) amplificó a una temperatura de alineamiento de 60°C y para el alelo T (Leu) de 58°C por 35 ciclos (Figura 23).

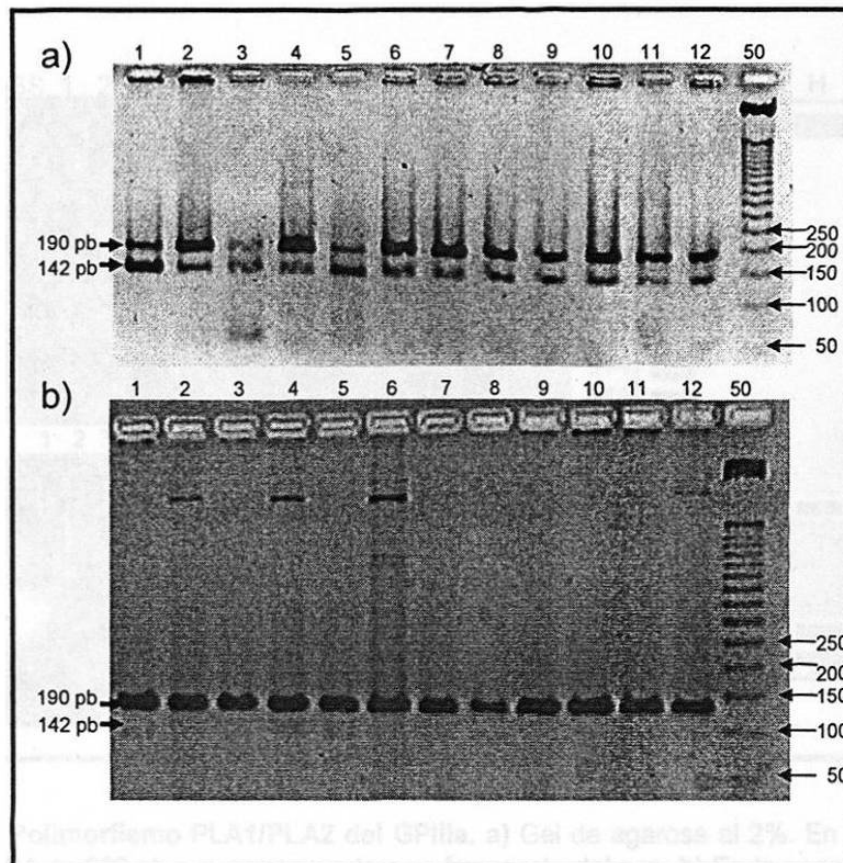


Figura 23.- Polimorfismo V34L del FXIII. Para este polimorfismo se usaron los oligonucleótidos específicos comunes que fueron Val34Leu F y Val34Leu R que amplifican una banda de 190 pb y los específicos el Val34Leu G y Val34Leu T que amplifican una banda de 142 pb. a) Para este gel se usó el oligonucleótido Val34Leu G, donde todas las muestras tienen el alelo G, el marcador de PM es de 50 pb y b) Se usó el oligonucleótido Val34Leu T, el marcador es el mismo del gel anterior y en los carriles 1, 2, 4, 5, 6 y 8 son positivas para el alelo T, el resto son negativas. Por lo tanto las muestras 3, 7, 9 al 12 son homocigotas para G y la 1, 2, 4, 5, 6 y 8 son heterocigotas G/T.

6.3.6 Polimorfismos del PLA1/PLA2 del GPIIIa: la única diferencia en las condiciones de reacción fue la concentración del MgCl₂ (1mM) y las temperaturas del programa de PCR donde los tiempos fueron de 30 seg en lugar de 1 min con una temperatura de alineamiento de 58°C por 35 ciclos. Donde el PA fue de 282 pb, el cual no se digiere con la enzima *Msp* I, cuando está presente el alelo más común (PLA1) y se digiere en dos fragmentos (157 y 125 pb) para el alelo PLA2 (Figura 24).

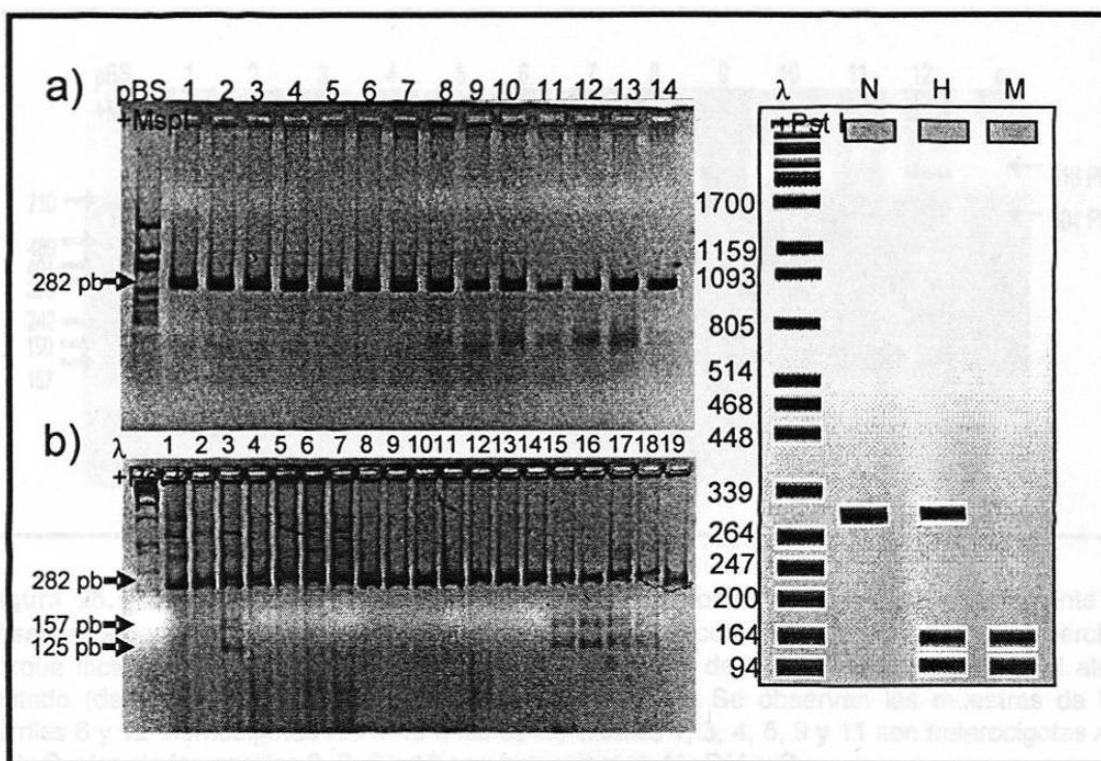


Figura 24.- Polimorfismo PLA1/PLA2 del GPIIIa. a) Gel de agarosa al 2%. En los carriles se observa un PA de 282 pb que corresponde a un fragmento del gen. b) En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es λ +Pst I. En el carril N está representado el homocigoto PLA1/ PLA1 (282 pb); el carril H, es el heterocigoto PLA1/ PLA2 (282, 157, 125 pb) y en el carril M, está representado el homocigoto PLA2 / PLA2 (157 y 125 pb). En la parte de la izquierda se encuentra un gel al 4%, en el cual las muestras en los carriles 3, 15 al 18 son heterocigotas PLA1/PLA2 y el resto son homocigotas PLA1/ PLA1.

6.3.7 Polimorfismos en el gen del t-PA: se amplificó el polimorfismo Alu I/D a una temperatura de alineamiento de 63°C y 35 ciclos. La genotipificación de este polimorfismo no necesitó enzimas de restricción, solo se corrieron los PA en geles de agarosa al 2% (Figura 25).

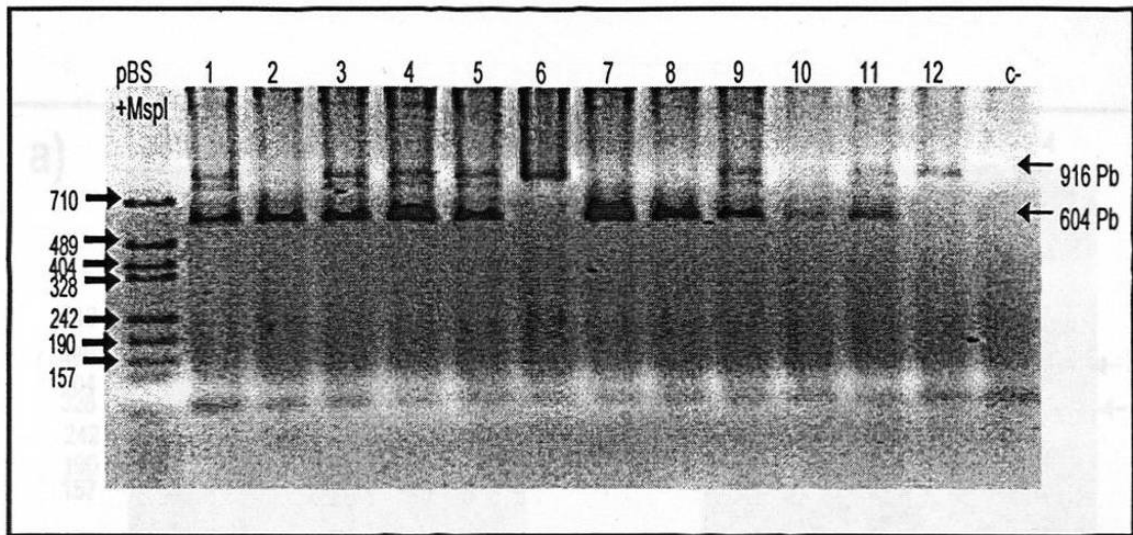


Figura 25. Polimorfismos Alu I/D del t-PA. Este polimorfismo se analiza directamente al observar la banda del PA de 916pb que representa al alelo común (se le denomina de Inserción porque incluye la secuencia Alu de 312 pb) y una banda de 604 pb que representa al alelo mutado (denominado D porque pierde la secuencia Alu). Se observan las muestras de los carriles 6 y 12 homocigotas *Alu I/Alu I*, las de los carriles 1, 3, 4, 5, 9 y 11 son heterocigotas *Alu I/Alu D* y las de los carriles 2, 7, 8 y 10 son homocigotas *Alu D/Alu D*.

6.3.8. El polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1: En este polimorfismo se usaron oligonucleótidos específicos para la genotipificación de cada alelo. En la primera reacción se colocó el oligonucleótido para el alelo 4G con una temperatura de alineamiento de 59°C y para la segunda el alelo 5G a 61°C por 35 ciclos (Figura 26).

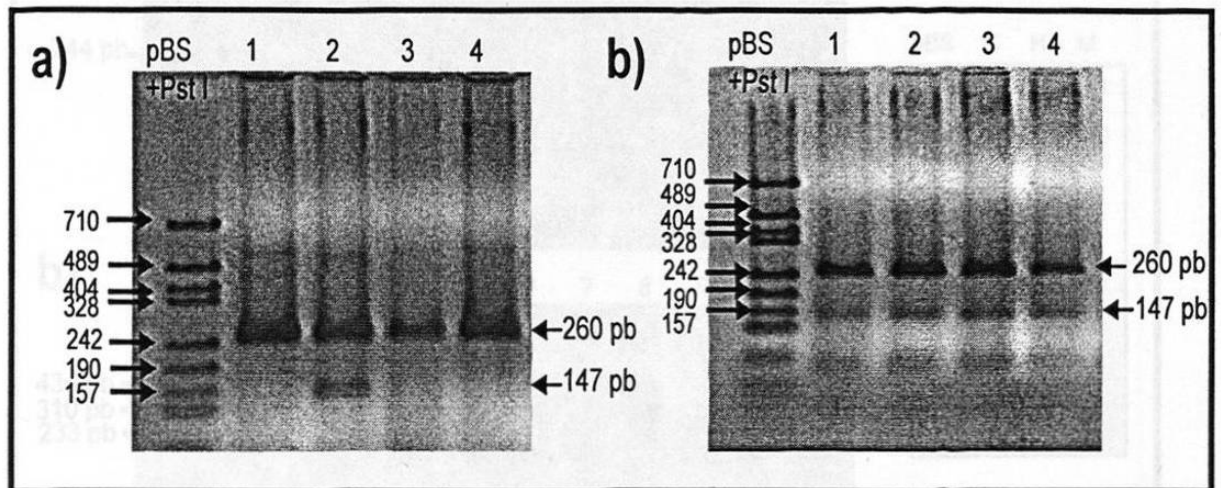


Figura 26. Polimorfismo 4G/5G del PAI-1. Para este polimorfismo se usaron oligonucleótidos comunes para los dos alelos que fueron 5G/4GR:5' y CoGF:5' que amplifican una banda de 260 pb y los específicos: el 4GF:5' y 5GF:5' que amplifica una banda de 147 pb. a) Gel de agarosa al 4%, en el cual se usó el oligo 4GF:5'-, por lo que la muestra 2 es la única positiva para el alelo 4G. b) Gel de agarosa al 4%, se usó el oligo 5GF:5'-, dando todas las muestras positivas para el alelo 5G. Por lo tanto la muestra 2 es heterocigota 4G/5G y el resto de las muestras son homocigotas 5G/5G.

6.3.9 Polimorfismos en la CRP: Se analizaron los polimorfismos G1059C y -717 A/G con temperaturas de alineamiento de 58°C (30 ciclos) y 55°C (40 ciclos) respectivamente. Para el polimorfismo G1059C el PA se digirió con la enzima *Mae III* y el -717 A/G con la enzima *Sac II*. Los fragmentos de la digestión se observan en las Figura 27 y 28, respectivamente.

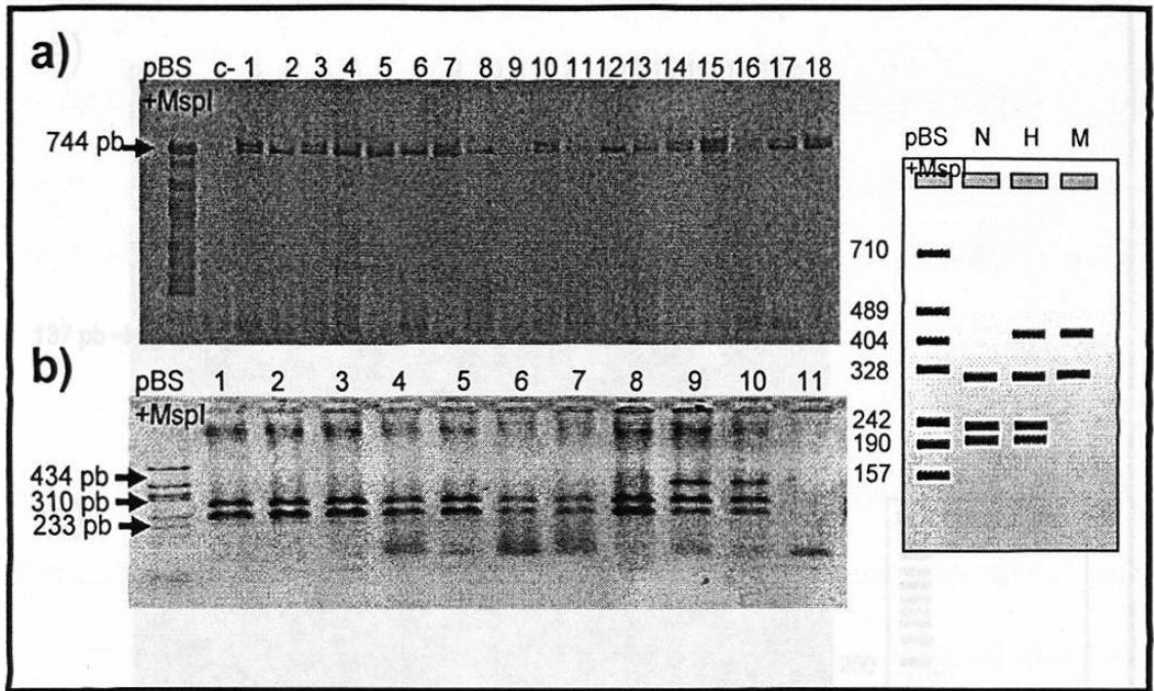


Figura 27.- Polimorfismo G1059C de la CRP. a) Gel al 2%, el carril c- es el control negativo y en el resto de los carriles se observa un PA de 744 pb que corresponde a un fragmento del gen. **b)** En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es pBS+Msp I. En el carril N esta representado el homocigoto G/G (310, 233 y 201 pb); el carril H, es el heterocigoto G/C (434, 310, 233 y 201 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto C/C (434 y 310 pb). En la parte izquierda se encuentra un gel de agarosa al 4%, en donde se observa que las muestras en los carriles 1 al 8 son homocigotas G/G, en el 9 y 10 las muestras son heterocigotas G/C y la muestra en el carril 11 no se observo nada, por lo que se tuvo que repetir.

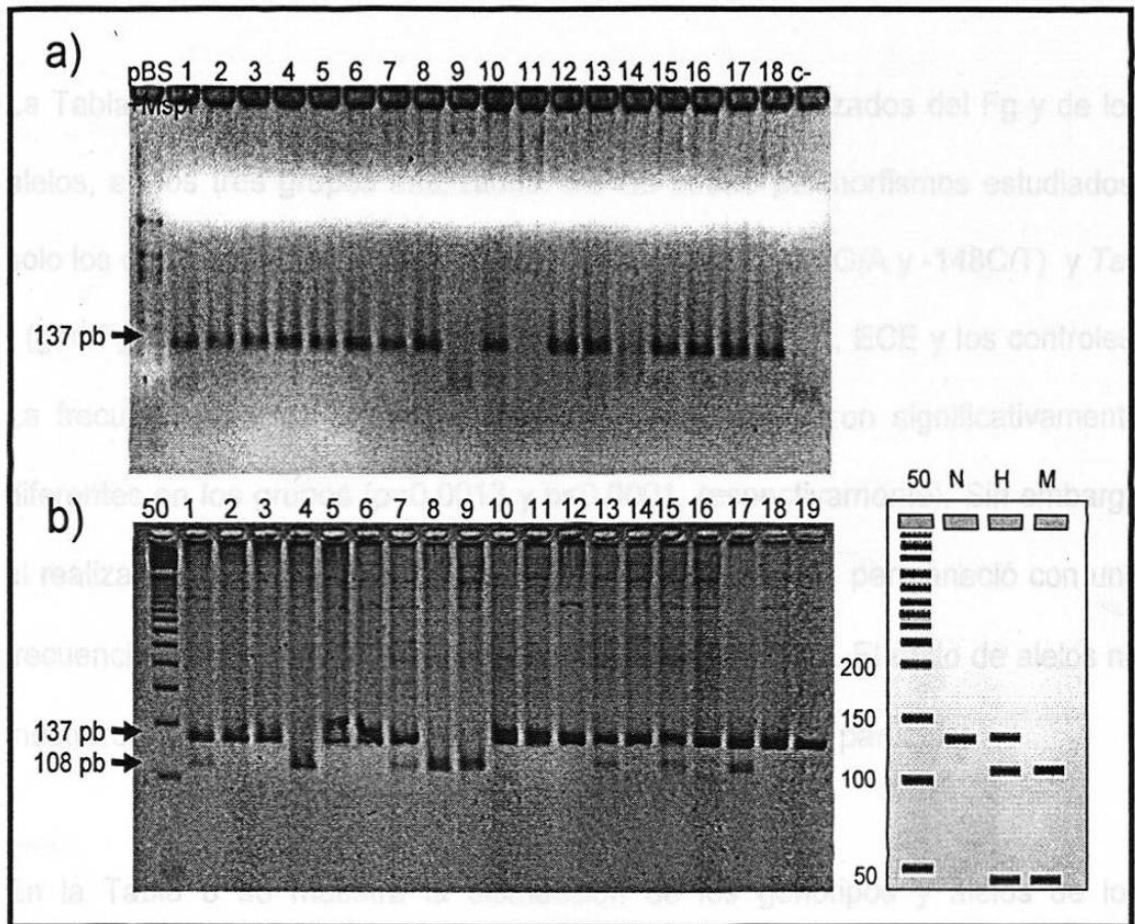


Figura 28.- Polimorfismo -717A/G de la CRP. a) Gel de agarosa al 2%, el carril c- es el control negativo y en el resto de los carriles se observa un PA de 137 pb que corresponde a un fragmento del gen. **b)** En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es una escala de 50 pb. En el carril N esta representado el homocigoto A/A (137 pb); el carril H, es el heterocigoto A/G (137, 108 y 29 pb) y en el carril M, esta representado el homocigoto G/G (108 y 29 pb). En la parte izquierda se encuentra un gel de agarosa al 4%, en el cual se observa que las muestras de los carriles 2, 3, 5, 6, 10 al 12, 14, 16, 18 y 19 son homocigotas A/A, en el 1, 7, 13, 15 y 17 las muestras son heterocigotas A/G y en el 4, 8 y 9 las muestras son homocigotas G/G.

6.4 Frecuencias de los polimorfismos analizados en las tres cohortes.

Una vez estandarizadas las reacciones de PCR y la genotificación de las 150 muestras se procedió a hacer un análisis preliminar de la distribución de genotipos para cada polimorfismo de todos los genes analizados, el cual no mostró desviaciones con respecto a la ley de equilibrio de Hardy-Weinberg en los tres grupos ($p > 0.05$).

La Tabla 7 muestra la distribución de los genotipos analizados del Fg y de los alelos, en los tres grupos analizados. De los cuatro polimorfismos estudiados, solo los que se localizan en el promotor del gen FgB (-455G/A y -148C/T) y Taq I (gen FgA) fueron estadísticamente diferentes entre SCA, ECE y los controles. La frecuencia de los genotipos -455G/A y -148C/T fueron significativamente diferentes en los grupos ($p=0.0013$ y $p<0.0001$, respectivamente). Sin embargo al realizar el análisis en los alelos, solo la variante -148T permaneció con una frecuencia mayor, estadísticamente significativa ($p=0.004$). El resto de alelos no mostraron valores significativos para una condición clínica particular.

En la Tabla 8 se muestra la distribución de los genotipos y alelos de los polimorfismos en los genes del FV, FVII, FII, FXIII y GPIIIa. Al realizar el análisis estadístico para ver la diferencia entre las frecuencias entre los grupos, solo los polimorfismos R353Q y V34L presentaron diferencia estadística ($p=0.03$ y $p<0.0001$, respectivamente). Sin embargo al hacer la misma comparación con los alelos, solo el V34L permaneció estadísticamente significativo ($p<0.0001$).

Tabla 7.- Genotipos del Fibrinógeno y los Grupos de Estudio.

Genotipos	Controles n=50 (%)	ECE n=50 (%)	SCA n=50 (%)	p
-455Fg				
G/G	40 (80)	30 (60)	30(60)	0.0013
G/A	9 (18)	20 (40)	20(40)	
A/A	1 (2)	0 (0)	0(0)	
-148Fg				
C/C	29 (58)	19 (38)	16 (32)	<0.0001
C/T	20 (40)	26 (52)	24 (48)	
T/T	1 (2)	5 (10)	10 (20)	
+1689 Fg				
T/T	32 (64)	31 (62)	30 (60)	NS
G/T	17 (34)	19 (38)	20 (40)	
G/G	1 (2)	0 (0)	0 (0)	
Taq I				
T1/T1	29 (58)	38 (76)	30 (60)	0.03
T1/T2	19(38)	12 (24)	18 (36)	
T2/T2	2(4)	0 ()	2 (4)	
Bcl-1 Fg				
B1/B1	39 (78)	38 (76)	38 (76)	NS
B1/B2	11 (22)	12 (24)	12 (24)	
B2/B2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Alelos				
-455 G	89	80	80	NS
A	11	20	20	
-148 C	78	64	56	0.004
T	22	36	44	
+1689 T	81	81	80	NS
G	19	19	20	
Taq I T1	77	88	78	NS
T2	23	12	22	
Bcl-1 B1	89	88	88	NS
B2	11	12	12	

ECE = Enfermedad Coronaria Estable; SCA = Síndromes Coronarios Agudos; Fg = fibrinógeno, NS=no significativo

Tabla 8.- Frecuencia genotípica y alélica del FV, FVII, FII, FXIII y GPIIIa en los tres grupos.

Genotipos	Controles n=50 (%)	ECE n=50 (%)	SCA n=50 (%)	p
1691FV				
G/G	39(78)	44 (88)	43 (86)	NS
G/A	11(22)	6 (12)	7 (14)	
A/A	0(0)	0 (0)	0 (0)	
353FVII				
R/R	27 (54)	32 (64)	21(42)	0.03
R/Q	22 (44)	17 (34)	27 (54)	
Q/Q	1 (2)	1 (2)	2 (4)	
20210FII				
G/G	49 (98)	48 (96)	49 (98)	NS
G/A	1 (2)	2 (4)	1 (2)	
A/A	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
34FXIII				
V/V	0 (0)	5 (10)	4 (8)	<0.0001
V/L	3 (6)	13 (26)	28 (56)	
L/L	47 (94)	32 (64)	18 (36)	
GPIIIa				
PLA1/PLA1	40 (80)	39(78)	40 (80)	NS
PLA 1/ PLA 2	10 (20)	11 (22)	10 (20)	
PLA 2/ PLA 2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Alelos				
1691 FV G	89	94	93	NS
A	11	6	7	
353 FVII R	76	81	69	NS
Q	24	19	31	
20210FII G	98	96	98	NS
A	2	4	2	
34FXIII V	6	23	36	<0.0001
L	94	77	64	
GPIIIa PLA1	90	89	90	NS
PLA2	10	11	10	

ECE = Enfermedad Coronaria Estable; SCA = Síndromes Coronarios Agudos; NS=no significativo

La Tabla 9 muestra la distribución de los genotipos y alelos de los polimorfismos en los genes del t-PA, PAI-1 y CRP. Al realizar el análisis estadístico para ver la diferencia entre las frecuencias entre los grupos, sólo los polimorfismo Alu I/D y -717 A/G presentaron diferencia estadística ($p=0.0089$ y 0.0002 , respectivamente). Sin embargo al hacer la misma comparación con los alelos, sólo el Alu I/D permaneció estadísticamente significativo.

Para determinar la diferencia entre los grupos se hicieron análisis de comparación entre cada uno de los grupos usando razones de momios (RM). Las determinaciones de cargas genéticas de un alelo particular entre los posibles genotipos estudiados, demostró RM incrementadas para enfermedad coronaria (Tabla 10). También en la Tabla 10 se observa la comparación entre cada uno de los grupos. La frecuencia de la carga del alelo -455A determina una $RM=2.66$ (IC 95%, rango 1.1-6.3, $p= 0.03$) para las dos condiciones patológicas. La carga del alelo -148T determina unas RM de 2.25 (IC 95%, rango 1.0-4.9, $p=0.04$) para ECE y de 2.93 (IC 95%, rango 1.3-6.4, $p=0.01$) para SCA.

Para la carga del alelo 353Q, la única comparación con evidencia estadísticamente significativa fue al comparar los ECE con los SCA (2.45 , 95% IC 1.1-5.3, $p=0.03$). La carga del alelo 34V fue el más significativo estadísticamente y el que dió diferencia en todas las comparaciones hechas entre los grupos ($p =0.04$ a <0.0001).

Tabla 9.- Frecuencia genotípica y alélica de los genes t-PA, PAI-1 y la CRP en los tres grupos.

Genotipos	Controles n=50 (%)	ECE n=50 (%)	SCA n=50 (%)	p	
Alu t-PA					
I/I	17 (34)	10 (20)	22 (44)	0.0089	
I/D	22 (44)	27 (54)	20 (40)		
D/D	11 (22)	13 (26)	8 (16)		
PAI-1					
5G/5G	17 (34)	18 (36)	20 (40)	NS	
5G/4G	24(48)	23 (46)	18 (36)		
4G/4G	9 (18)	9 (18)	12 (24)		
1059CRP					
G/G	45 (90)	47 (94)	46 (92)	NS	
G/C	5 (10)	3 (6)	4 (8)		
C/C	0 (0)	0 (0)	0(0)		
-717CRP					
A/A	33 (66)	35 (70)	35 (70)	0.0002	
A/G	15 (30)	14 (28)	7 (14)		
G/G	2 (4)	1 (2)	8 (16)		
Alelos					
Alu	D	44	53	36	0.05
	I	56	47	64	
PAI-1	5G	58	59	58	NS
	4G	42	41	42	
1059	G	90	94	92	NS
	C	10	6	8	
-717	A	81	84	77	NS
	G	19	16	23	

ECE = Enfermedad Coronaria Estable; SCA = Síndromes Coronarios Agudos; NS=no significativo.

Tabla 10.- Carga alélica de los alelos que confieren riesgo: Fg(-455A y -148T), FVII(353Q), FXIII(34V), t-PA(Alu I) y CRP(-717A).

Carga Genotípica	Controles ^a N=50	ECE ^b N=50	SCA ^c N=50	OR (95% CI), p
-455Fg:				
G/G	40	30	30	2.66 (1.1-6.3), 0.03 ^{ab}
G/A + A/A	10	20	20	2.66 (1.1-6.3), 0.03 ^{ac} 0.84 (.38-1.8), NS ^{bc}
-148Fg:				
C/C	29	19	16	2.25 (1.0-4.9), 0.04 ^{ab}
C/T + T/T	21	31	34	2.93 (1.3-6.4), 0.01 ^{ac} 1.30 (.57-2.9), NS ^{bc}
353FVII:				
R/R	27	32	21	1.51 (0.7-3.3), 0.31 ^{ab}
R/Q + Q/Q	23	18	29	1.62 (0.7-3.5), 0.23 ^{ac} 2.45 (1.1-5.3), 0.03 ^{bc}
34FXIII:				
L/L	47	32	18	8.81 (2.3-26), 0.04 ^{ab}
V/L+V/V	3	18	32	27.9 (7.0-81), <.0001 ^{ac} 3.16 (1.4-6.9), 0.006 ^{bc}
Alu t-PA				
D/D+D/I	33	40	28	0.48 (0.2-1.2), 0.1
I/I	17	10	22	1.50 (0.7-3.4), 0.3 3.12 (1.3-7.3), 0.01
-717 CRP:				
A/A+A/G	48	49	42	2.04 (.22-13.4), 0.61 ^{ab}
G/G	2	1	8	4.57 (0.9-16.8), 0.07 ^{ac} 9.33 (1.1-39.3), 0.03 ^{bc}

ab=Controles vrs ECE; ac= Controles vrs SCA; bc= ECE vrs SCA; NS= no significativo

Por último el alelo CRP(-717G), muestra una tendencia al comparar controles sanos y ECE, y resulta con una diferencia estadísticamente significativa al comparar sanos y SCA con una RM de 9.33 (p=0.03).

El resto de los polimorfismos no se discuten ni se muestran en la Tabla 10, porque no dieron diferencia estadísticamente significativa.

6.5 Comparación de los parámetros bioquímicos y hematológicos en las tres cohortes.

La comparación entre los grupos para las variables bioquímicas se realizó comparando entre dos medias usando la t-Student. Primero se realizó entre controles sanos y ECE, encontrando al fibrinógeno, leucocitos, neutrófilos, creatinina y actividad del FII, FV y FVII, como las variables bioquímicas estadísticamente significativas (Tabla 11).

Tabla 11.- Comparación de las variables bioquímicas entre los controles sanos y ECE.

FACTORES	CONTROLES (n=50)	ECE (n=50)	p
TP (seg)	12.2±0.7	13.1±4.9	.22
TTPA (seg)	28.7±3.9	29.4±11.5	.70
Fibrinógeno (mg/dl)	371.2±97.4	414.6±94.3	.03
Plaquetas (cel/mm ³)	230,042±64259	218,500±74133	.42
Leucocitos (cel/mm ³)	6212±1543	7181±2113	.01
Neutrófilos (cel/mm ³)	3863±1344	4635±1623	.01
Creatinina (mg/dl)	0.87±0.2	1.00±0.34	.02
Urea (mg/dl)	22.4±10.1	24.6±13.6	.38
Actividad FII (%)	103.1±26.4	80.9±21.5	<.0001
Actividad FV (%)	97.2 ±33.1	72±26.7	.0001
Actividad FVII (%)	122.9±32.0	93.8±33.4	<.0001

TP: Tiempo de protrombina, TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada

La segunda comparación se realizó entre los controles sanos y SCA, manteniéndose como variables bioquímicas estadísticamente significativas al fibrinógeno, leucocitos, neutrófilos, creatinina y actividad del FII; perdiendo significancia la actividad del FV y FVII (Tabla 12).

Tabla 12.- Comparación de las variables bioquímicas entre los controles sanos y SCA.

FACTORES	CONTROLES (n=50)	SCA (n=50)	p
TP (seg)	12.2±0.7	14.0±5.7	.06
TTPA (seg)	28.7±4	33.1±23	.20
Fibrinógeno (mg/dl)	371.2±97.4	442.5 ±153.2	.007
Plaquetas(cel/mm ³)	230,042±64259	233,306±64518	.81
Leucocitos (cel/mm ³)	6212±1543	8982±3244	<.0001
Neutrófilos (cel/mm ³)	3863±1344	6727±2932	<.0001
Creatinina (mg/dl)	0.87±0.2	1.1±0.63	.02
Urea (mg/dl)	22.4±10.1	22.7±13.4	.90
Actividad FII (%)	103.1±26.4	83.8±24.8	.0003
Actividad FV (%)	97.2 ±33.1	84.7±29.9	.053
Actividad FVII (%)	122.9±32.0	140.1±97.5	.54

TP: Tiempo de protrombina, TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada

La tercera comparación se realizó entre ECE y SCA, manteniéndose como variables bioquímicas estadísticamente significativas leucocitos, neutrófilos, y actividad del FV y FVII. El resto de las variables no fueron estadísticamente significativas (Tabla 13).

Tabla 13.- Comparación de las variables bioquímicas entre ECE y SCA.

FACTORES	ECE (n=50)	SCA (n=50)	p
TP (seg)	13.1±4.9	14.0±5.7	.52
TTPA (seg)	29.4±11.5	33.3±23.5	.33
Fibrinógeno (mg/dl)	414.6±94.3	442.4 ±153.2	.30
Plaquetas(cel/mm ³)	218,500±74133	233,306±64518	.30
Leucocitos (cel/mm ³)	7181±2113	8982±3244	.001
Neutrófilos (cel/mm ³)	4635±1623	6727±2932	<.0001
Creatinina (mg/dl)	1.00±0.34	1.1±0.63	.33
Urea (mg/dl)	24.6±13.6	22.7±13.4	.50
Actividad FII (%)	80.9±21.5	83.8±24.8	.54
Actividad FV (%)	72±26.7	84.7±29.9	.03
Actividad FVII (%)	93.8±33.4	140.1±97.5	.003

TP: Tiempo de protrombina, TTPA: Tiempo de tromboplastina parcial activada

6.6 Determinación de la correlación entre los polimorfismos y los niveles plasmáticos de los factores bioquímicos y hematológicos analizados.

Se determinó la relación entre los niveles plasmáticos del Fg, FII, FV, FVII y sus polimorfismos. Solo se encontró relación significativa entre el Fg y los polimorfismos estudiados del gen, con excepción del *Taq I* (Tabla 14). El resto de las correlaciones no fueron estadísticamente significativas (datos no mostrados).

Tabla 14.- Relación entre los niveles plasmáticos del fibrinógeno y polimorfismos.

Fibrinógeno n=142	<350 mg/dl n=43	350-450 mg/dl n=55	>450 mg/dl n=44	p
Bcl-1 Fg				
B1/B1	37 (86)	42 (76)	29 (66)	0.004
B1/B2	6 (14)	13 (24)	15 (34)	
B2/B2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
-455Fg				
G/G	36 (84)	35 (64)	22 (50)	<0.0001
G/A	6(14)	21 (36)	22 (50)	
A/A	1 (2)	0 (0)	0 (0)	
-148Fg				
C/C	20 (47)	26 (47)	16 (36)	0.0014
C/T	20 (46)	27 (49)	19 (43)	
T/T	3 (7)	2 (4)	9 (21)	
Taq I Fg				
T1/T1	26 (60)	37 (67)	28 (64)	0.06
T1/T2	14 (33)	18 (33)	15 (34)	
T2/T2	3 (7)	0 (0)	1 (2)	
+1689 Fg				
T/T	31 (72)	34 (62)	21 (48)	0.0015
G/T	11 (26)	21 (38)	23 (52)	
G/G	1 (2)	0 (0)	0 (0)	

Además al realizar un análisis de regresión múltiple para ver si estos polimorfismos permanecían como predictores independientes de niveles elevados de Fg al usar variables como el tabaquismo, edad, sexo, diabetes y dislipidemia, solo los polimorfismos -455 y -148 permanecieron estadísticamente significativos ($r=0.3$, $p=0.008$)

6.7 Resultados del seguimiento de la cohorte experimental a los 3, 6 y 12 meses después de su ingreso al estudio.

El seguimiento de los pacientes se realizó mediante llamadas telefónicas y/o consultas en la Clínica #34. Todos los pacientes fueron seguidos, a los 3, 6 y 9