

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

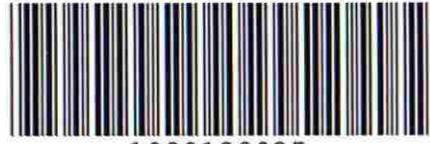
.C6

C3

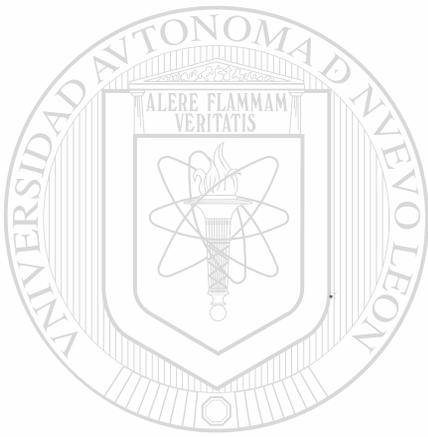
2005

c.1

M. en C. Luis Miguel Canseco Avila



1080128035



UANL

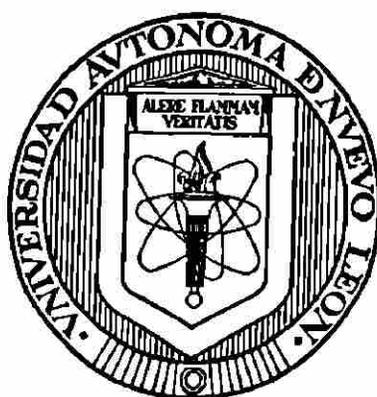
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

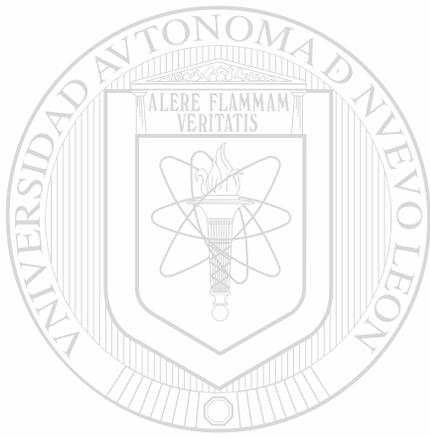
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

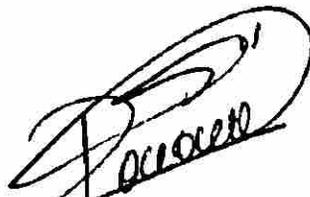
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

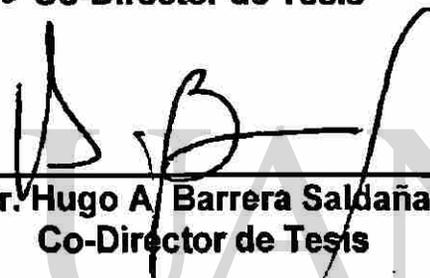
Aprobación de la Tesis:



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



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



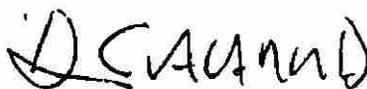
**Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Co-Director de Tesis**



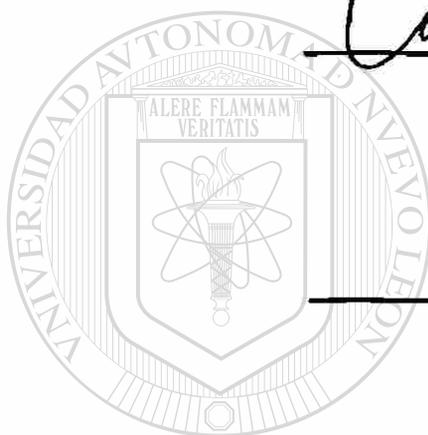
**Dra. Agnes Revol de Mendoza
Comisión de Tesis**



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



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®



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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A Dios

Por ser la fuerza que me hace seguir.

A mi Madre

Por todo tu amor, tu 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, Alfredo, 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

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

- 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.

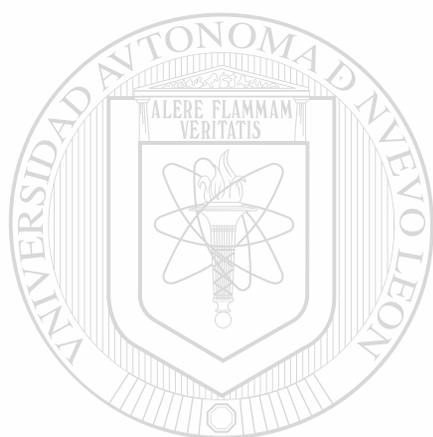
TABLA DE CONTENIDO

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 ORIGEN 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 GpIIa	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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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>A1u</i> I/D 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

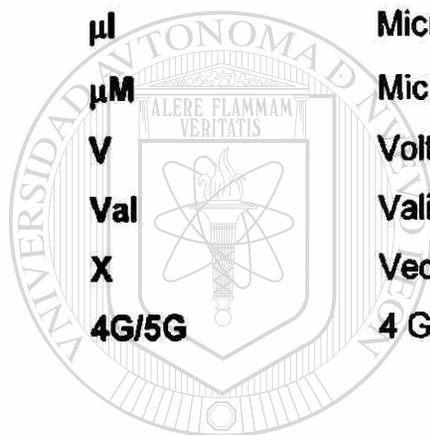
	Página
Tabla 1 Lista de genes y sus polimorfismos, que fueron estudiados en este trabajo.	9
Tabla 2 Oligonucleótidos para amplificar los genes estudiados, sus secuencias y claves.	44
Tabla 3 Condiciones iniciales de PCR para los polimorfismos.	45
Tabla 4 Programa inicial de amplificación para los polimorfismos.	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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

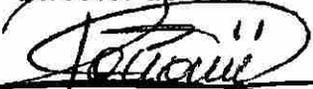
Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

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

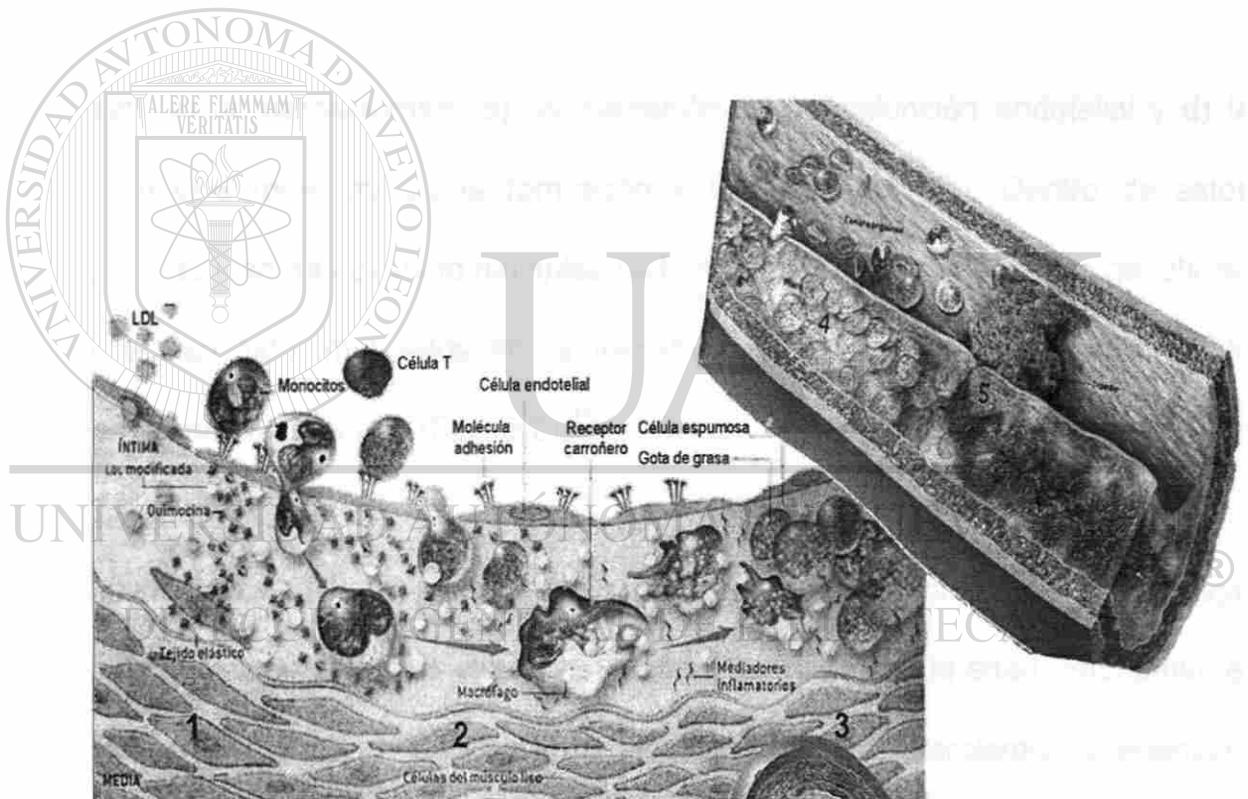


Figura 1.- Esquema de la patofisiología de la enfermedad coronaria. Se pueden observar las cinco etapas del proceso de la enfermedad coronaria (numeradas del 1 al 5: 1) Entrada de las LDL a la íntima. 2) Maduración de los monocitos y fagocitosis de las LDL-oxidadas. 3) Formación de la placa ateromatosa.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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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}

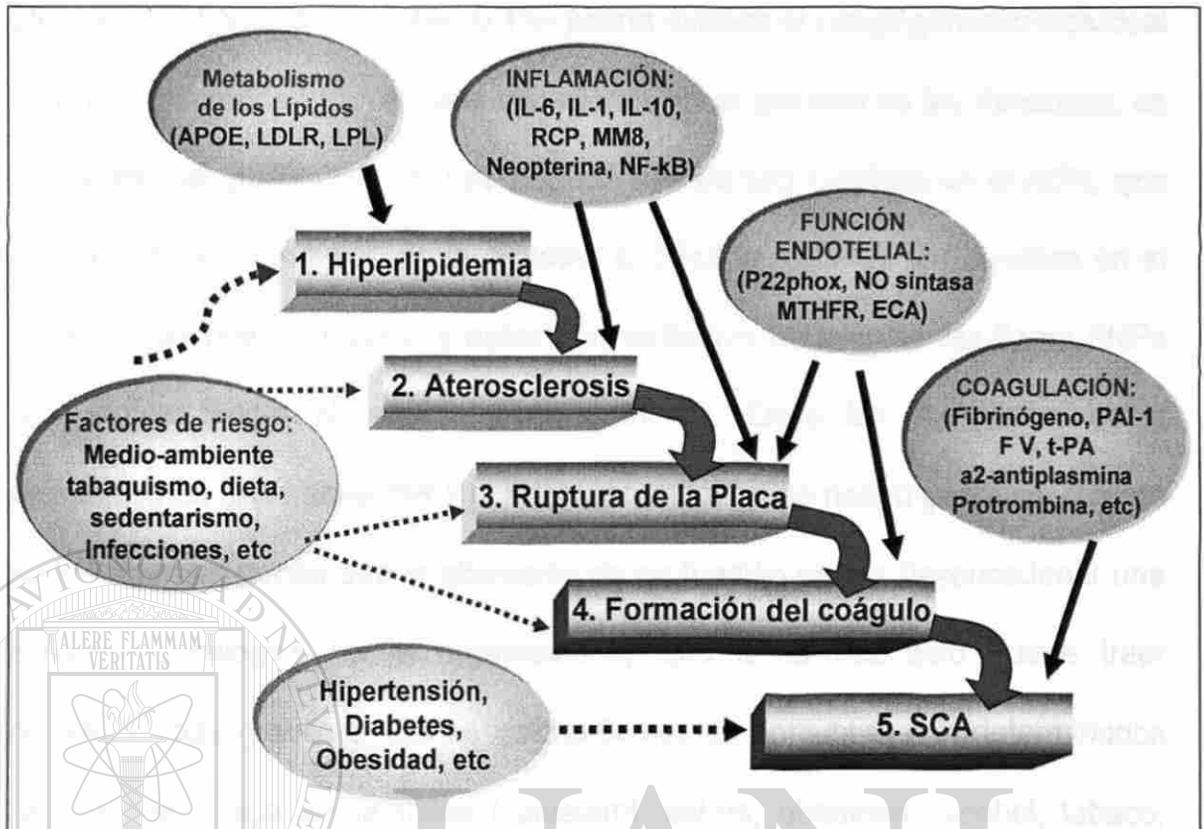


Figura 2.- Esquema de los factores de riesgo de enfermedad coronaria. Se pueden observar del lado izquierdo los factores de riesgo ambientales y como participan en el desarrollado de la enfermedad. En la parte de arriba y derecha se representan los cuatro procesos metabólicos implicados y algunos ejemplos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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]

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 fisiopatología 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 a2-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, a2-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 manera 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, • -148 C/T
4	Fibrinógeno (FG)	• 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	GpIIa	• 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

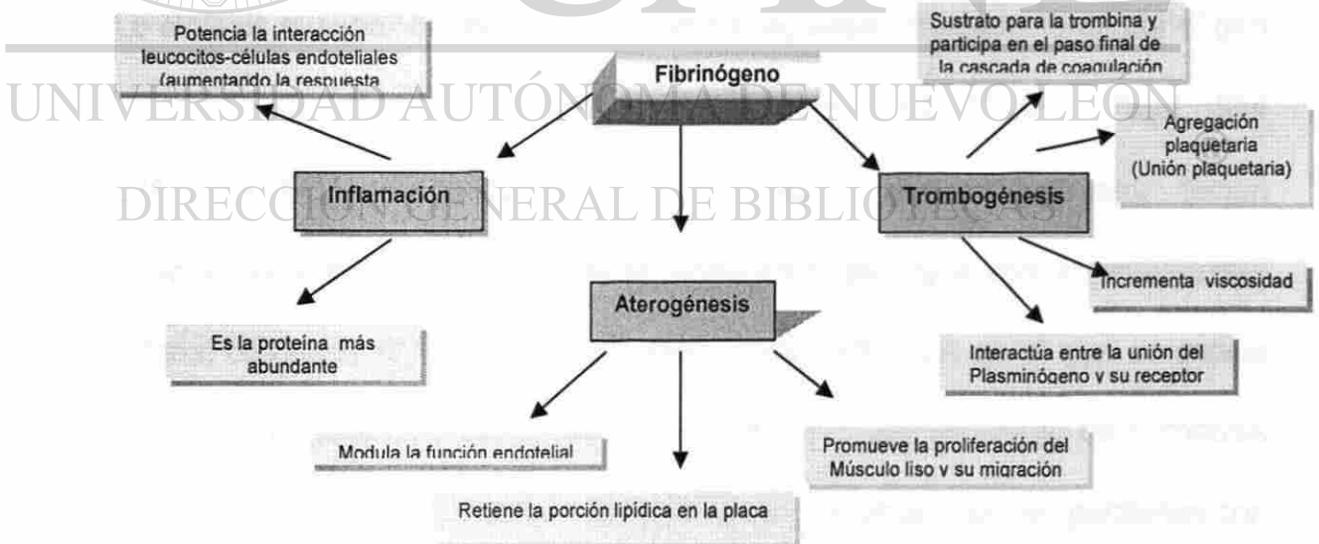


Figura 3.- Patofisiología del Fg en el SCA. Se esquematiza su participación en los tres mecanismos más importantes de la patofisiología de la enfermedad cardiovascular: inflamación, aterogénesis y trombogénesis. Modificada de Kamath & Lip.²³

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

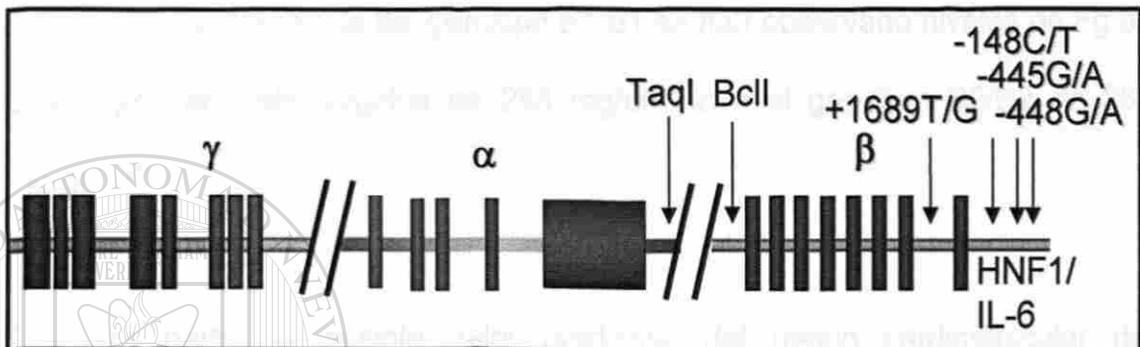


Figura 4.- Esquema del agrupamiento genético del Fg. Se observan los tres genes que dan lugar a las cadenas de la glicoproteína gamma (γ), alfa (α) y beta (β), así como los polimorfismos más frecuentes e importantes relacionados con los niveles del Fg y enfermedad cardiovascular. El esquema no está a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

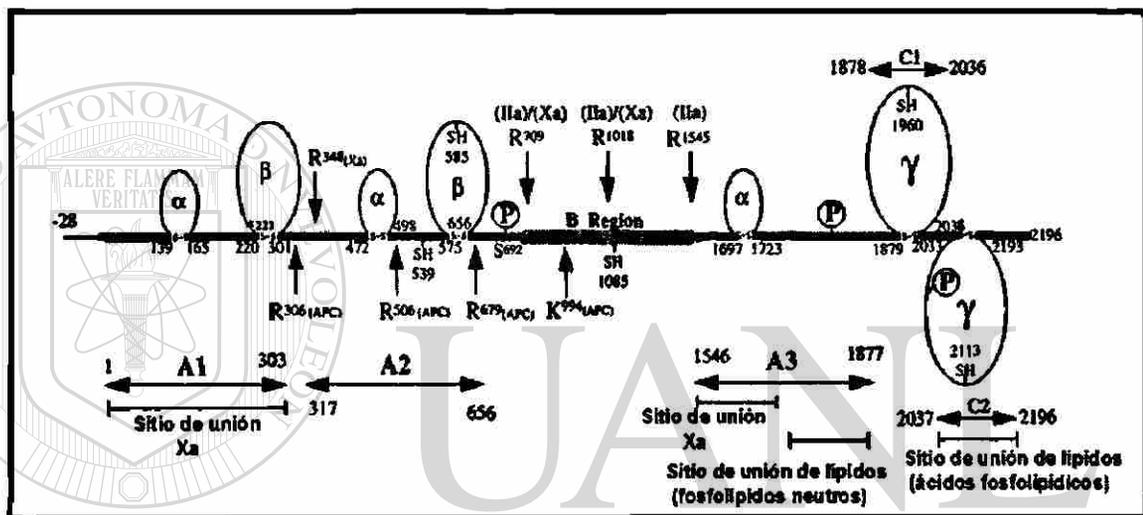


Figura 5.- Esquema de la estructura del FV. Esta compuesto de 2196 a.a., más un péptido señal de 28 a.a.^{37, 38} Los sitios de unión de los pro-cofactores para la activación se muestran con --- . Los sitios de unión de la Proteína C Activada para la inactivación del FV se muestran como APC.⁴⁵ El factor 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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

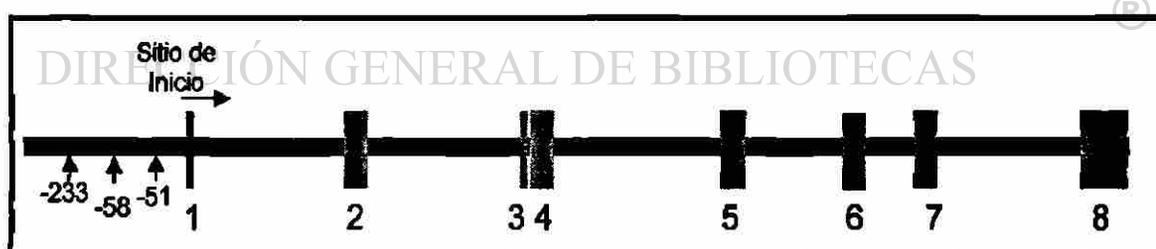


Figura 6.- Esquema de la estructura del gen del FVII. Consiste de 8 exones y 7 intrones con un tamaño de 13 Kpb y con una organización muy similar a los otros factores dependientes de vitamina K. Con un sitio mayor de inicio de la transcripción en la posición -51 del sitio de transcripción y otros tres 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 trombótica.

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

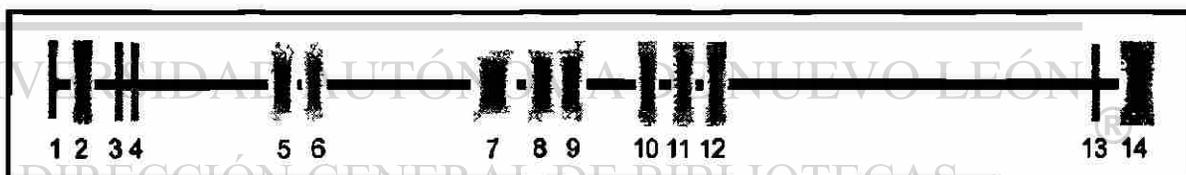


Figura 7.- Esquema de la estructura del gen del FII. El gen esta en la región p11-q12 del cromosoma 11, compuesto de 14 exones de un tamaño que fluctúa entre 25 y 315 pb y de 13 intrones con un longitud que varía de 84 a 9,447 pb, para un tamaño total aproximado de 20 Kpb.^{80,81} La región promotora 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

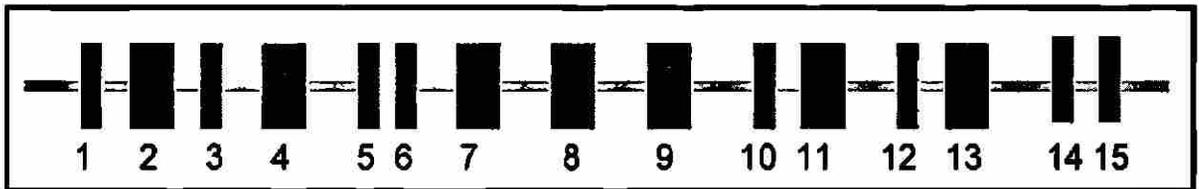


Figura 8.- Esquema de la estructura del gen de la cadena A del FXIII. Está compuesto por 15 exones y 14 intrones con un tamaño aproximado de 160 Kpb. El dominio de unión a fibrina es codificada en el exón 2 y el sitio activo está presente en el exón 7. El sitio de transcripción es desconocido, pero se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

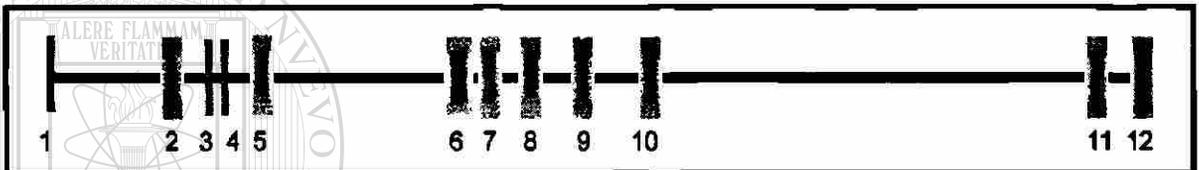


Figura 9.- Esquema de la estructura del gen de la cadena B del FXIII. Está compuesto por 12 exones y 11 intrones con un tamaño aproximado de 28 Kb. La regulación de la expresión es poco estudiada, pero un total de 30 sitios de inicio están localizadas río arriba del sitio de inicio. El esquema no está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

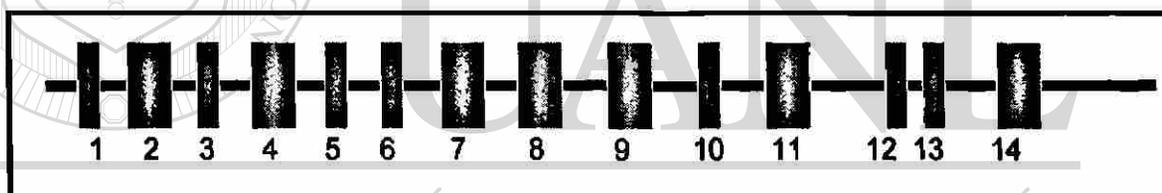


Figura 10.- Esquema de la estructura del gen del GPIIIa. Está formado por 14 exones y 13 intrones en el cromosoma 17 en la región q21-q23.^{101,102} El esquema no está a escala. ®

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.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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}

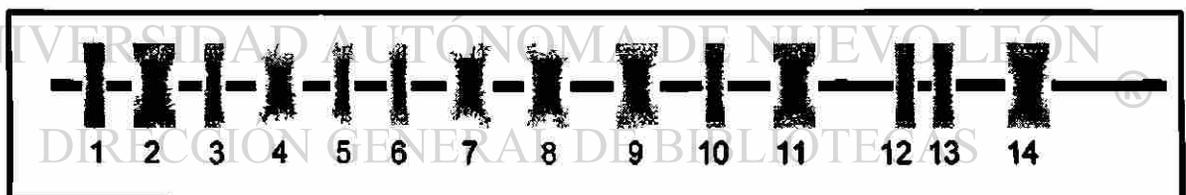


Figura 11.- Esquema de la estructura del gen t-PA. Está formado por 14 exones y 13 intrones, localizado en el cromosoma 8 en la región p12-q11.2 con un tamaño de 33 Kpb.^{119,120} El esquema no está a escala.

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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 reinfarto 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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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).

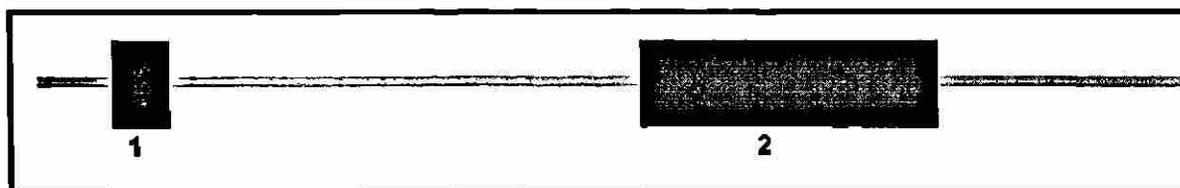


Figura 13.- Esquema de la estructura del gen de la CRP. Se localiza en el cromosoma 1 en la región q21-q23, formado por dos exones y un intrón.¹⁵⁷ La transcripción del gen es regulado principalmente por la IL-6.¹⁵⁸ El esquema no está a escala.

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

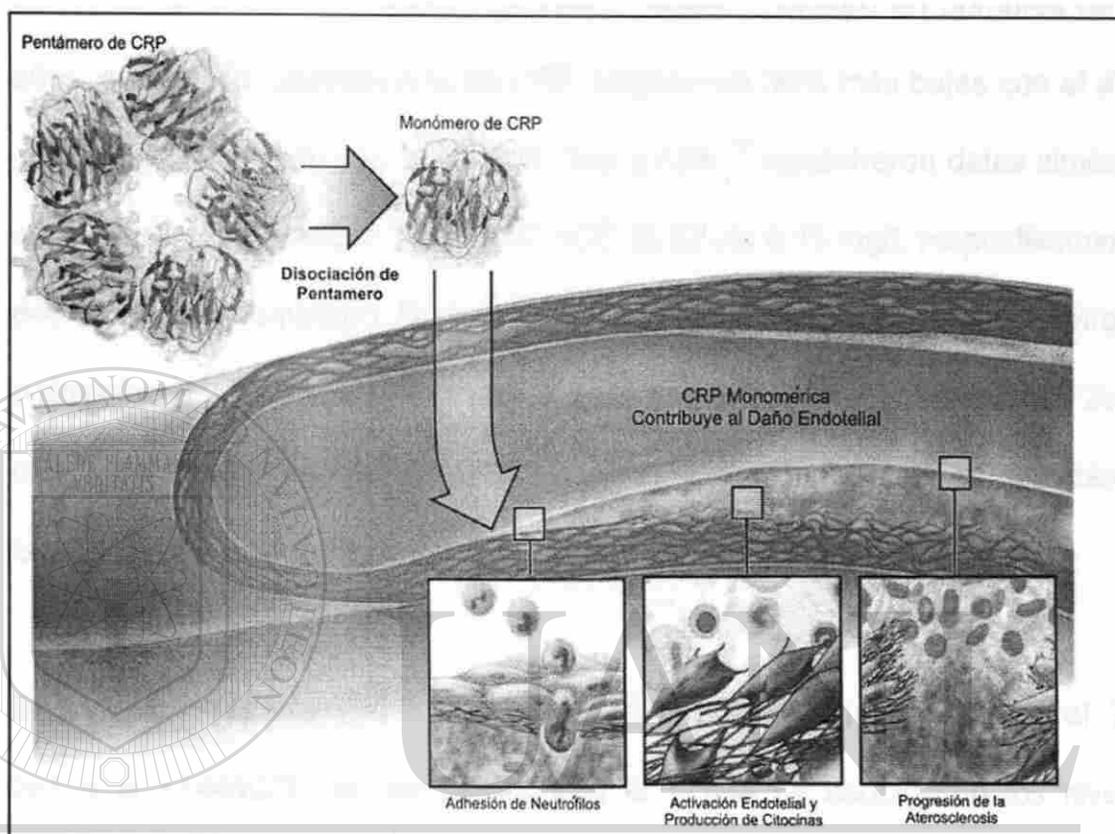


Figura 14.-Patofisiología de la CRP. Posiblemente es necesario que el pentámero de CRP se disocie en monómeros, y éstos sean los responsables de la contribución al daño endotelial mediante cuatro procesos básicamente: la adhesión de neutrófilos, la activación endotelial, la producción de citocinas y 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 ésto también es relevante hacer esta investigación en nuestra población.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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 (corte 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).

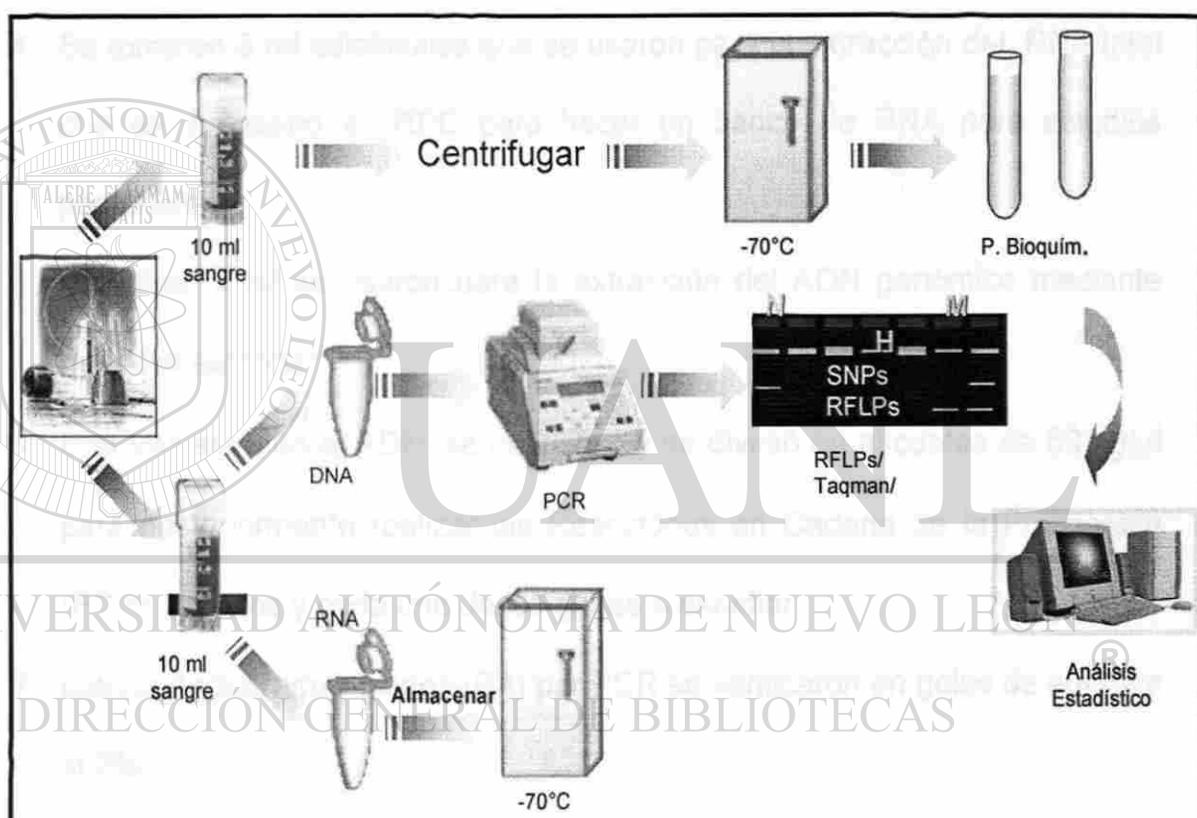


Figura 15.- Estrategia General. Se ilustran los pasos que comprenden la estrategia experimental realizada en este trabajo:

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).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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 $MgCl_2$ 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 microcentrifuga 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 (National 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 último 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 sintéticos) 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 (Bc1I F:5'-) 812 (Bc1I 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 ACCCAGAGTGGTGGGAAG GGAGCTTCAGGGCGT GGAGCTTCAGGGCTT	879 (Val34LeuF) 880 (Val34LeuR) 881 (Val34LeuFG) 882 (Val34LeuFT)
GPIIIa: PLA1/PLA2	GCTCCAATGTACGGGGTAAAC GGGGACTGACTTGAGTGACCT	909 (PIA2F:5) 910 (PIA2R:5)
t-PA: Alu IV.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 GAGGTACCAGAGACAGAGACGTG 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 μ l

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

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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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.

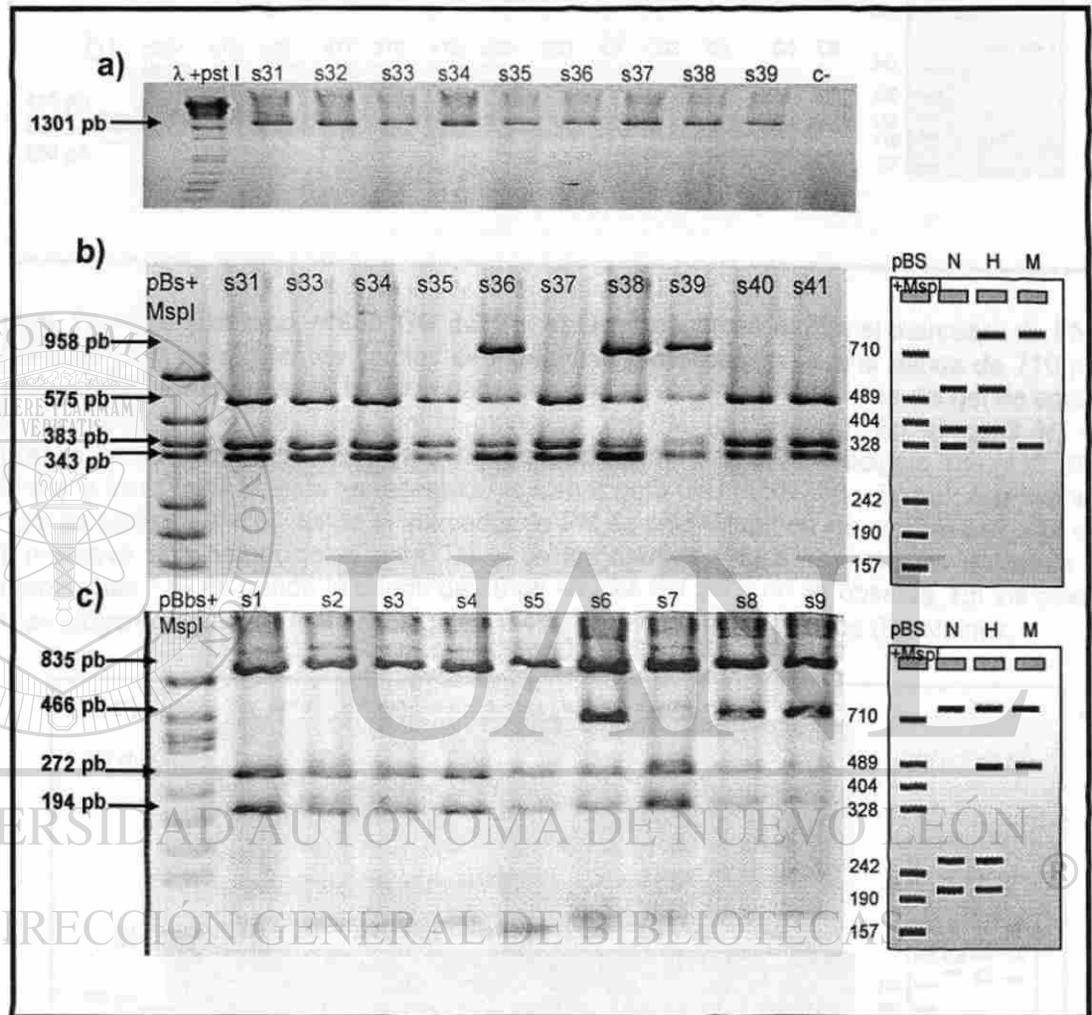


Figura 16.- Polimorfismos -455 G/A y -148 C/T del gen del Fg. a) Gel de agarosa al 2% el marcador de PM es λ +Pst I, y se observa la amplificación de un PA de 1301 pb de varias muestras el cual contiene los dos polimorfismos. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos -455 G/A, con el marcador de PM (pBS+MspI). 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+MspI, 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+MspI) 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+MspI, 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.

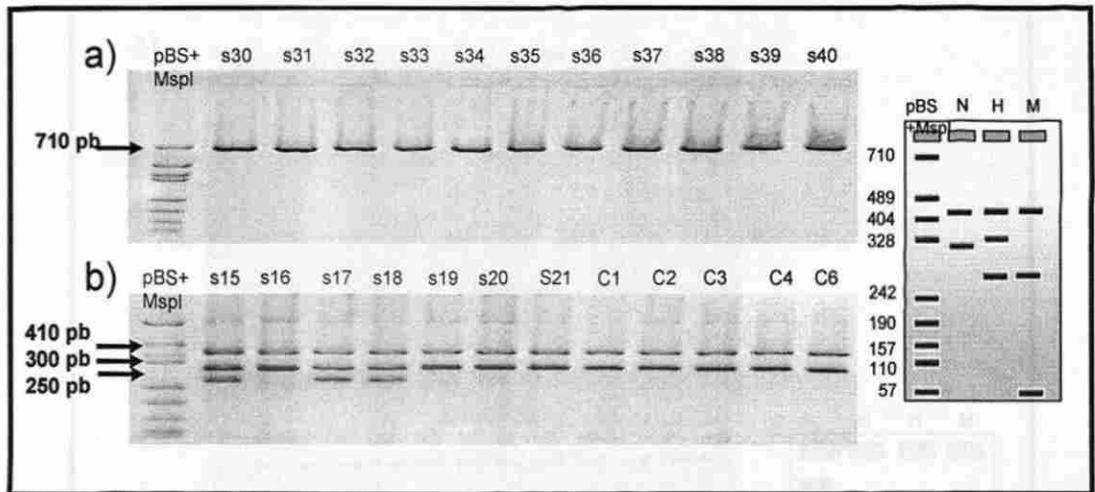


Figura 17.- Polimorfismo +1689 T/G del Fg. a) Gel de agarosa al 2%, el marcador de PM es pBS+MspI y en los siguientes carriles se muestra la amplificación de una banda de 710 pb la cual contiene el polimorfismo. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos +1689 T/G, 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.

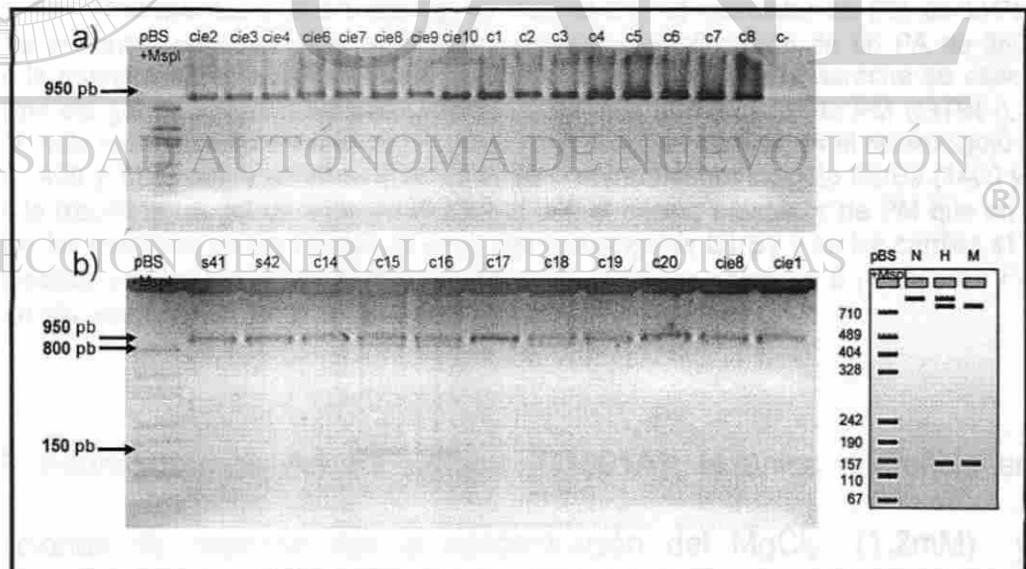


Figura 18.- Polimorfismo Taq I del Fg. a) Gel al 2%, el marcador de PM es pBS+MspI y en los siguientes carriles se muestra la amplificación de una banda de 950 pb la cual contiene el polimorfismo. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos Taq I, con el marcador 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.

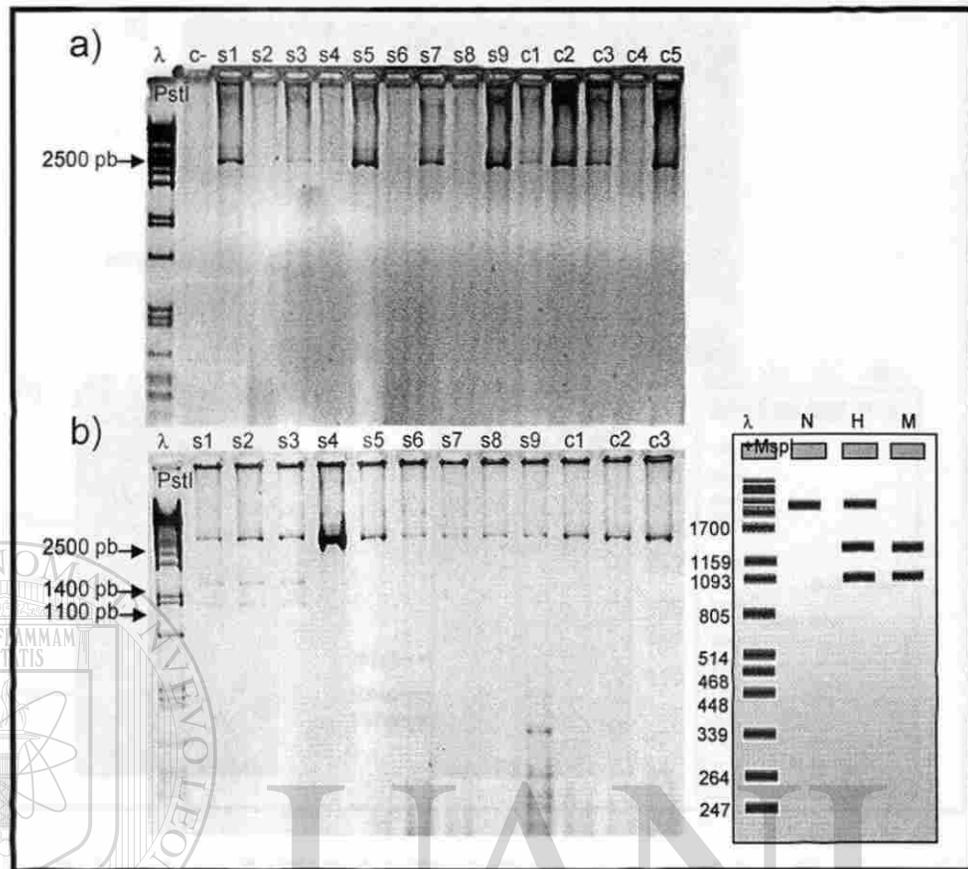


Figura 19.- Polimorfismo Bcl-1 del Fg. a) Gel al 2%, el marcador de PM es λ +Pst I se observa el control negativo en el carril c- y después la amplificación de un PA de 2500 pb, donde la muestra s2, s6 y s8 no se ve amplificación. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos 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 gels al 2% se cargaron 5 μ l del PA y en los gels 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).

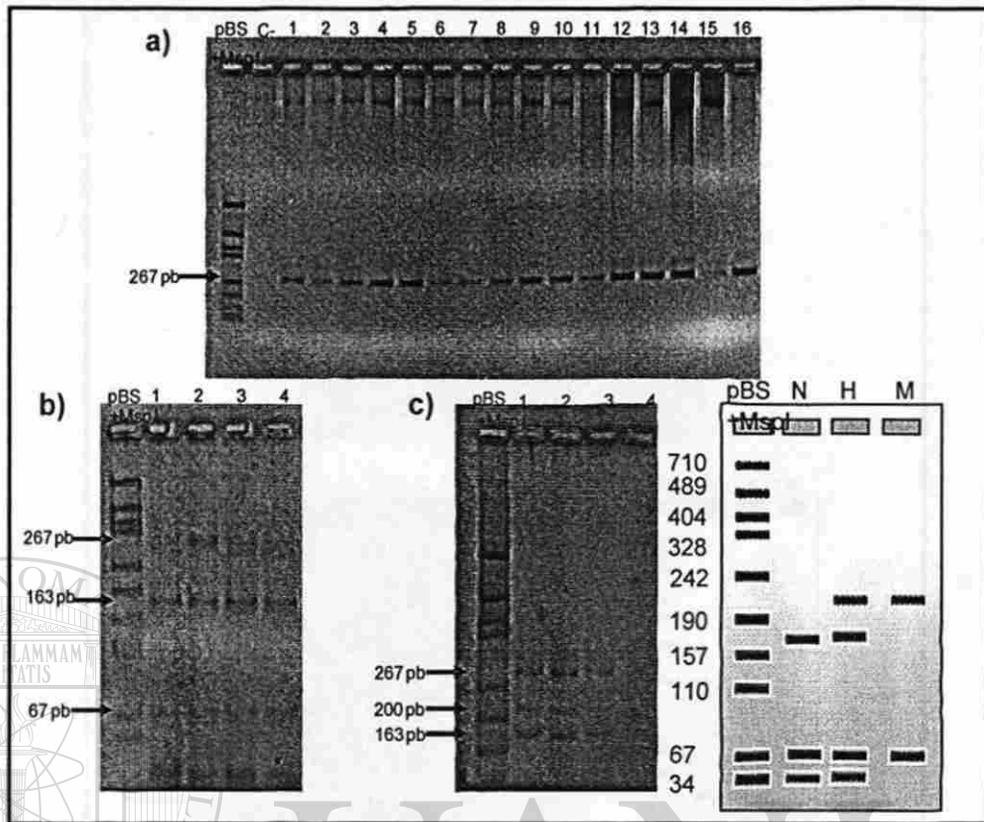


Figura 20.- Polimorfismo G1691A del FV. a) Gel de agarosa al 2%. El primer carril es el control negativo c- y en los carriles siguientes se observa un PA de 267 pb que corresponde a un fragmento del gen del FV. b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismo G1691A, con 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.

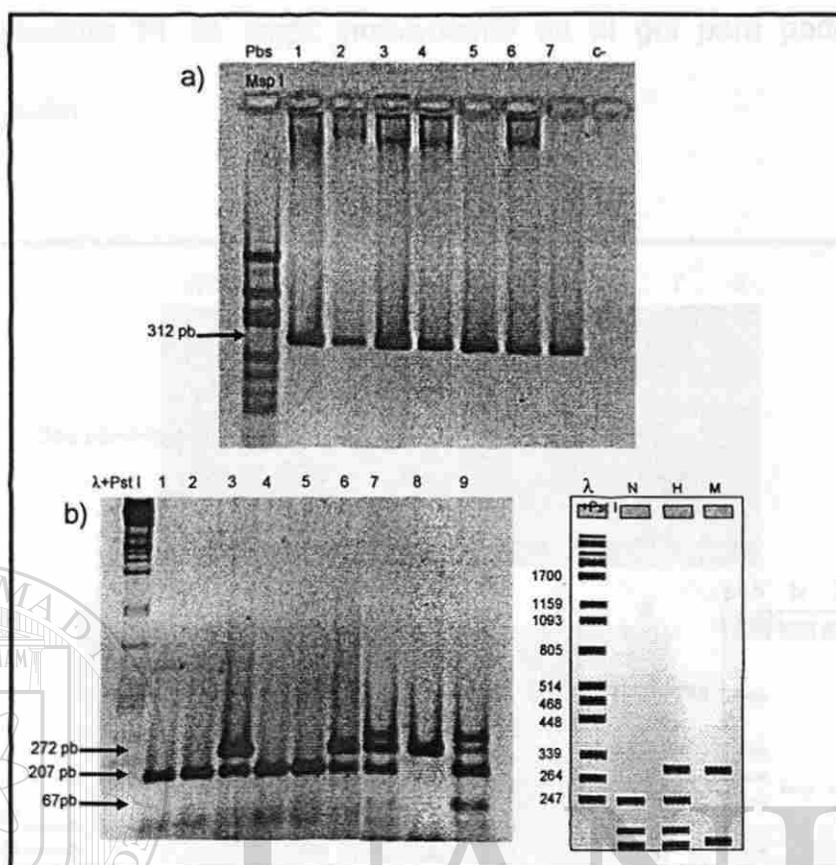


Figura 21.- Polimorfismo R353Q del FVII. a) Gel de agarosa al 2%, el carril c- es el control negativo y el resto de los carriles son muestras que amplifican un PA de 312 pb en donde el marcador de PM es PBS+Msp I y b) En la parte derecha se observa el esquema del gel de agarosa del polimorfismos R353Q, 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.

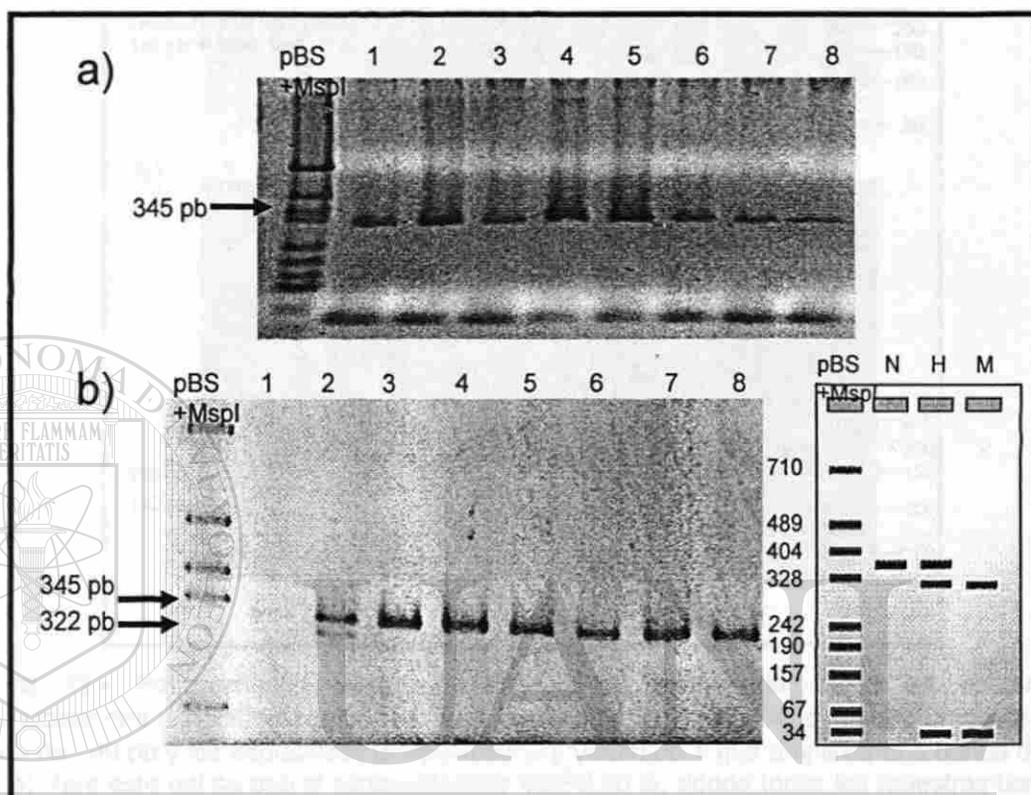


Figura 22.- Polimorfismo G20210A del FII. a) Gel al 2%, en los carriles se observa un PA de 345 pb que corresponde a un fragmento del gen del FII. b) En la parte derecha se observa el esquema de un gel de agarosa del polimorfismo G20210A, con el marcador de PM ((pBS+Msp I). En el carril N, esta representado 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 polimorfismo 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).

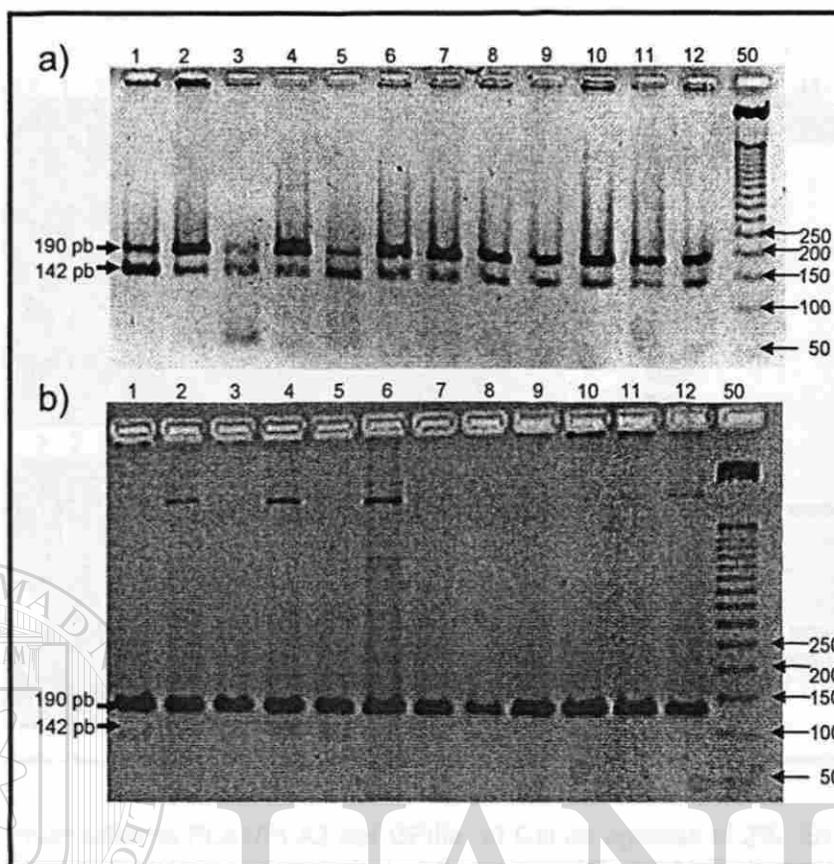


Figura 23.- Polimorfismo V34L del FXIII. Para este polimorfismo se usaron los oligonucleótidos específicos comunes que fueron Val34Leu F y Val34Leu R que amplifican una banda de 190 pb y los específicos el Val34Leu G y Val34Leu T que amplifica una banda de 142 pb. a) Para este gel se usó el oligonucleótido 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).

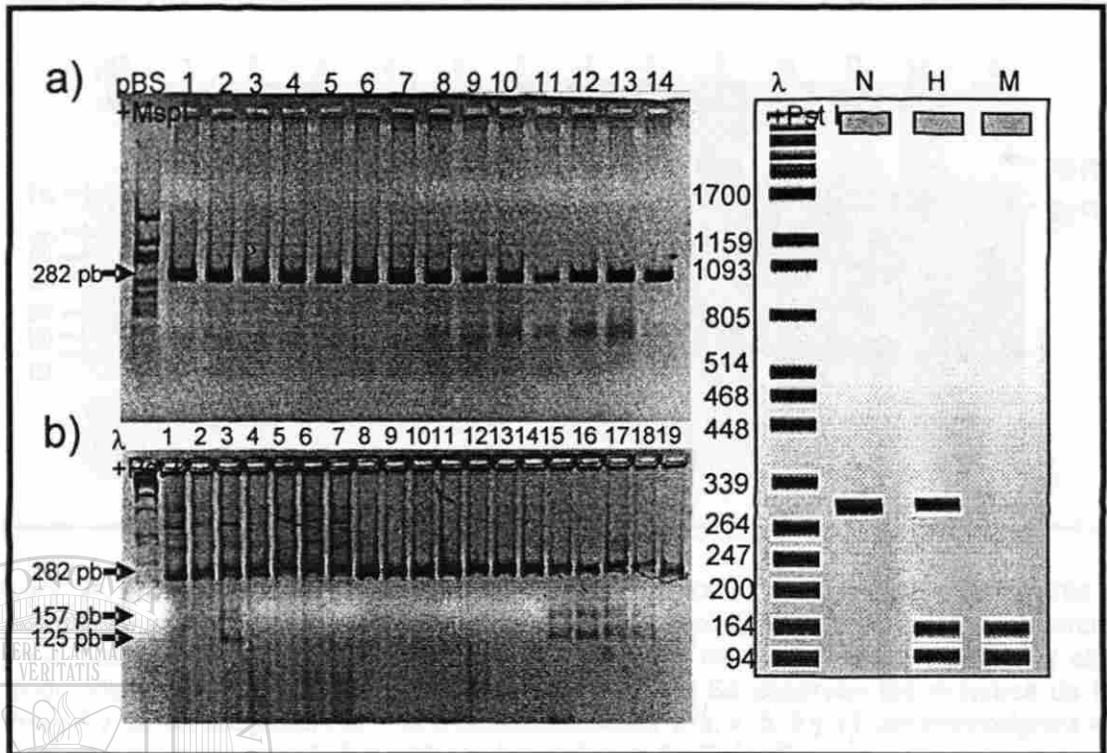


Figura 24.- Polimorfismo PLA1/PLA2 del GPIIb/IIIa. a) Gel de agarosa al 2%. En los carriles se observa un PA de 282 pb que corresponde a un fragmento del gen. b) En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es λ +Pst I. En el carril N está representado 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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).

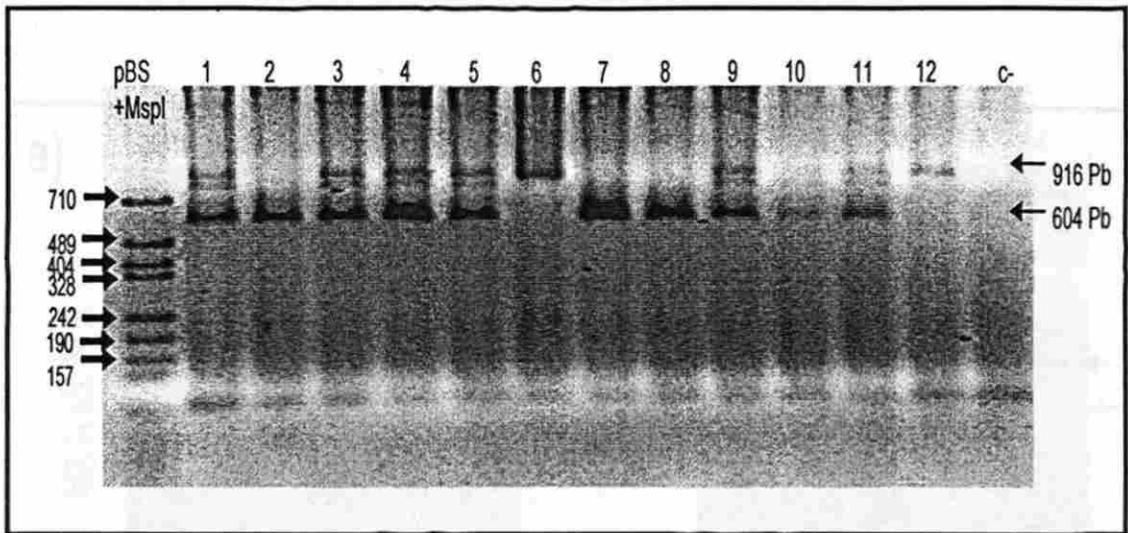


Figura 25. Polimorfismos Alu I/D del t-PA. Este polimorfismo se analiza directamente al observar la banda del PA de 916pb que representa al alelo común (se le denomina de Inserción porque incluye la secuencia Alu de 312 pb) y una banda de 604 pb que representa al alelo mutado (denominado D porque pierde 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).

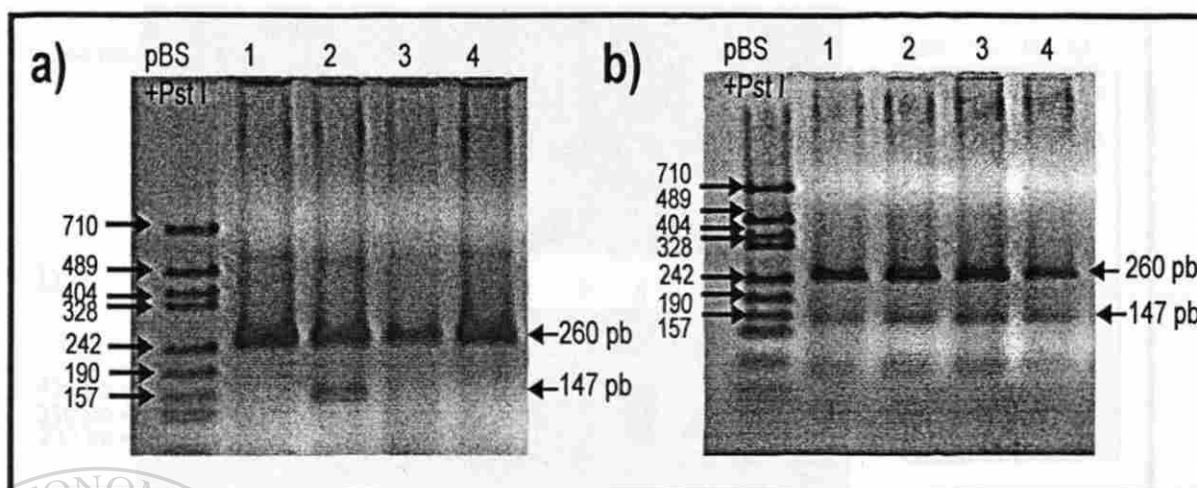


Figura 26. Polimorfismo 4G/5G del PAI-1. Para este polimorfismo se usaron oligonucleótidos comunes para los dos alelos que fueron 5G/4GR:5' y CoGF:5' que amplifican una banda de 260 pb y los específicos: el 4GF:5' y 5GF:5' que amplifica una banda de 147 pb. a) Gel de agarosa al 4%, en el cual se usó 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.

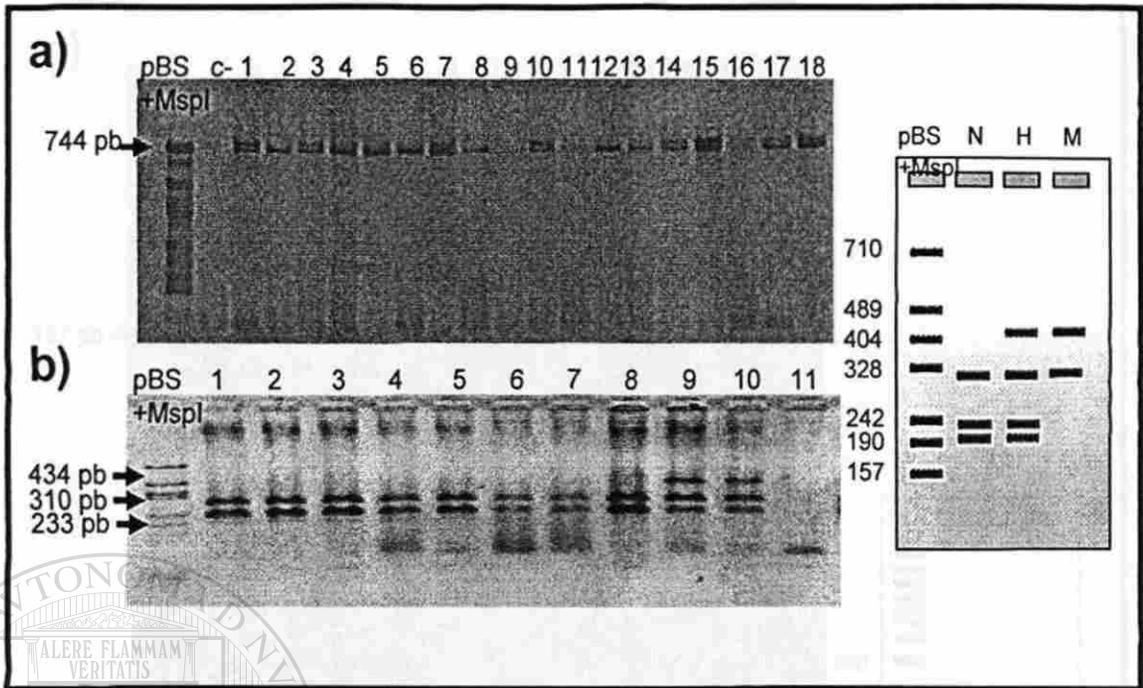


Figura 27.- Polimorfismo G1059C de la CRP. a) Gel al 2%, el carril c- es el control negativo y en el resto de los carriles se observa un PA de 744 pb que corresponde a un fragmento del gen. b) En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es pBS+Msp 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.

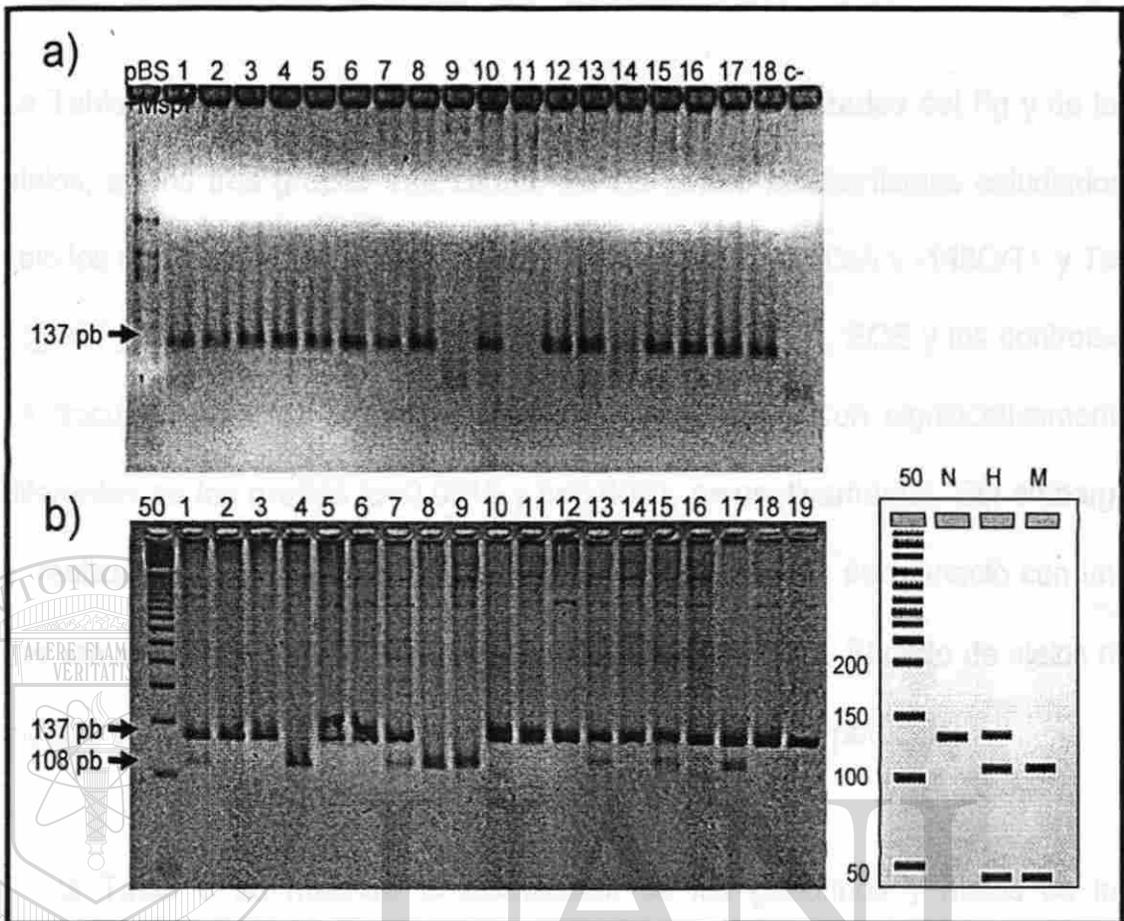


Figura 28.- Polimorfismo -717A/G de la CRP. a) Gel de agarosa al 2%, el carril c- es el control negativo y en el resto de los carriles se observa un PA de 137 pb que corresponde a un fragmento del gen. **b)** En la parte de la derecha se observa el esquema del gel del polimorfismo, en donde el marcador de PM es unaescalera 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} 2.93 (1.3-6.4), 0.01 ^{ac}
C/T + T/T	21	31	34	1.30 (.57-2.9), NS ^{bc}
353FVII:				
R/R	27	32	21	1.51 (0.7-3.3), 0.31 ^{ab} 1.62 (0.7-3.5), 0.23 ^{ac}
R/Q + Q/Q	23	18	29	2.45 (1.1-5.3), 0.03 ^{bc}
34FXIII:				
L/L	47	32	18	8.81 (2.3-26), 0.04 ^{ab} 27.9 (7.0-81), <.0001 ^{ac}
V/L+V/V	3	18	32	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 1.50 (0.7-3.4), 0.3
I/I	17	10	22	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} 4.57 (0.9-16.8), 0.07 ^{ac}
G/G	2	1	8	9.33 (1.1-39.3), 0.03 ^{bc}

ab=Controles vs ECE; ac= Controles vs SCA; bc= ECE vs 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 trombolastina 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 trombolastina parcial activada

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

meses a partir del periodo de hospitalización. Sin embargo, dos no pudieron localizarse durante el seguimiento a los 3 y 6 meses y a los 12 meses otros dos se perdieron. Estos 4 pacientes no se localizaron porque no contestaron las llamadas telefónicas, ni los telegramas enviados. Si cambiaron de domicilio, no nos fué notificado.

Los eventos adversos seguidos en este proyecto fueron: isquemia recurrente, re-IAM, choque y muerte, de los cuales el tiempo y el número de eventos de los pacientes se observan en la Figura 29.

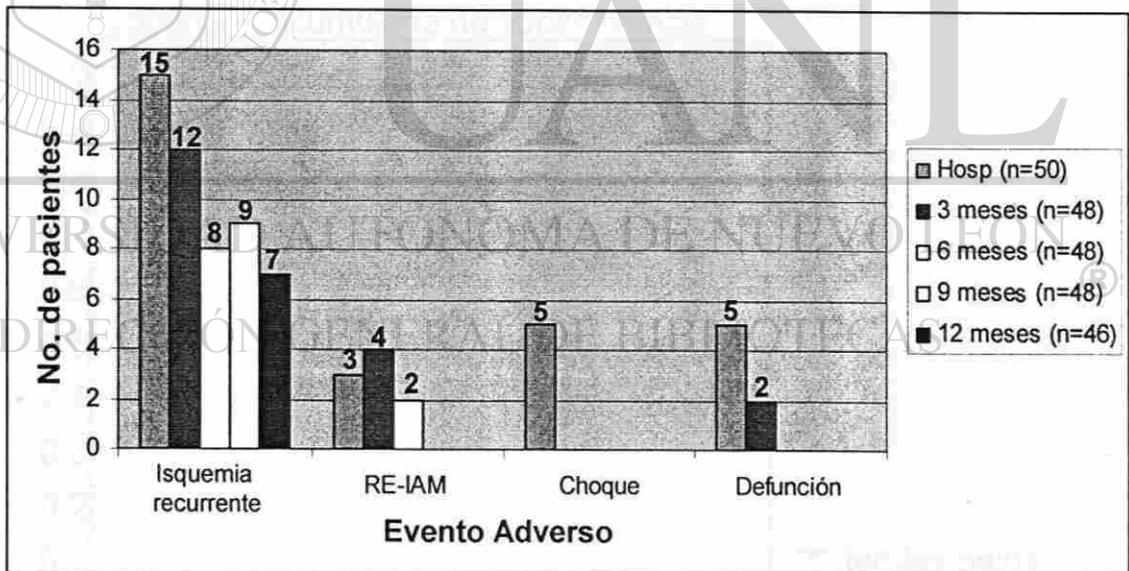


Figura 29.- Gráfica de seguimiento de los pacientes con SCA. El evento Isquemia recurrente fue el más frecuente. Por ejemplo: Tuvieron izquemia: quince pacientes en hospitalización, doce a los 3 meses de seguimiento, ocho a los 6 meses, nueve a los 9 meses y siete a los 12 meses.

Correlaciones estadísticas entre: las variables dependientes (eventos adversos como isquemia recurrente, infarto, etc.) y las variables independientes (hallazgos bioquímicos, hematológicos y genéticos).

La primera correlación que se hizo fue la de analizar la influencia de las variables clínicas, bioquímicas y genéticas en el tiempo de supervivencia de los pacientes con SCA. Encontrando los niveles de fibrinógeno plasmático mayores a 450 mg/dl (Figura 30) y los niveles de leucocitos mayores a 8,500 cel/mm³ (Figura 31), como marcadores de mal pronóstico de supervivencia a un año de seguimiento en estos pacientes.

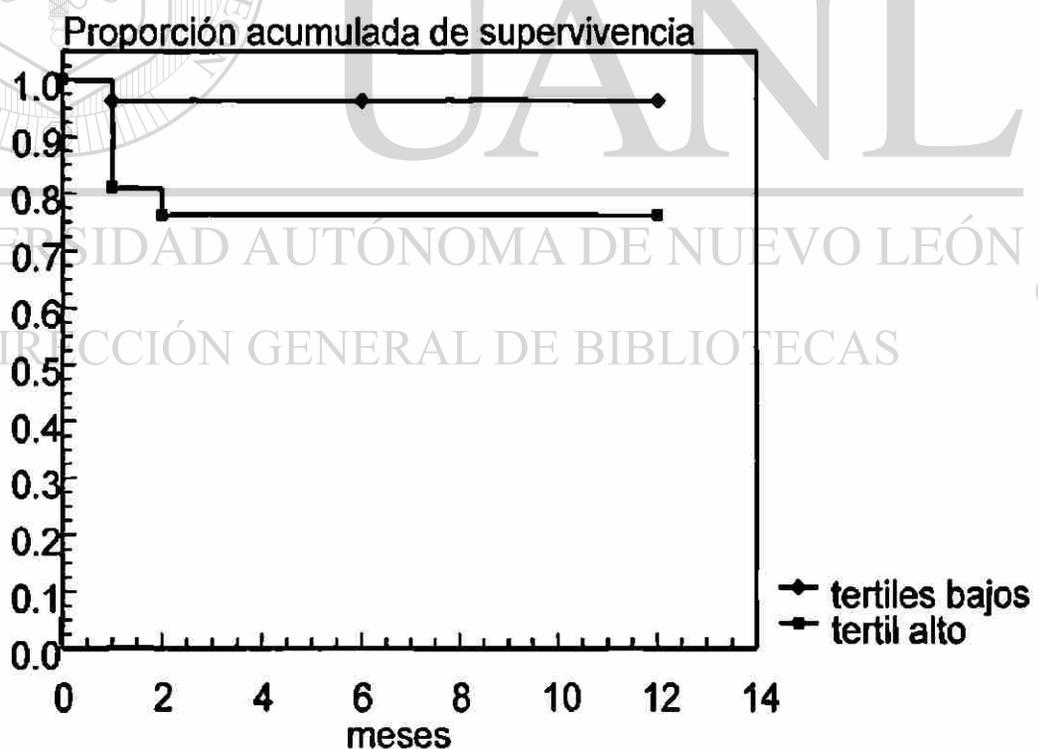


Figura 30. Grafica de Supervivencia de los pacientes con SCA al comparar los niveles del Fg. Se compararon los tertiles de Fg: alto (>450 mg/dl) contra los tertiles bajos (450 a 350 y <350 mg/dl) ($p=0.03$), observándose una menor proporción de supervivencia en los pacientes con los tertiles más elevados.

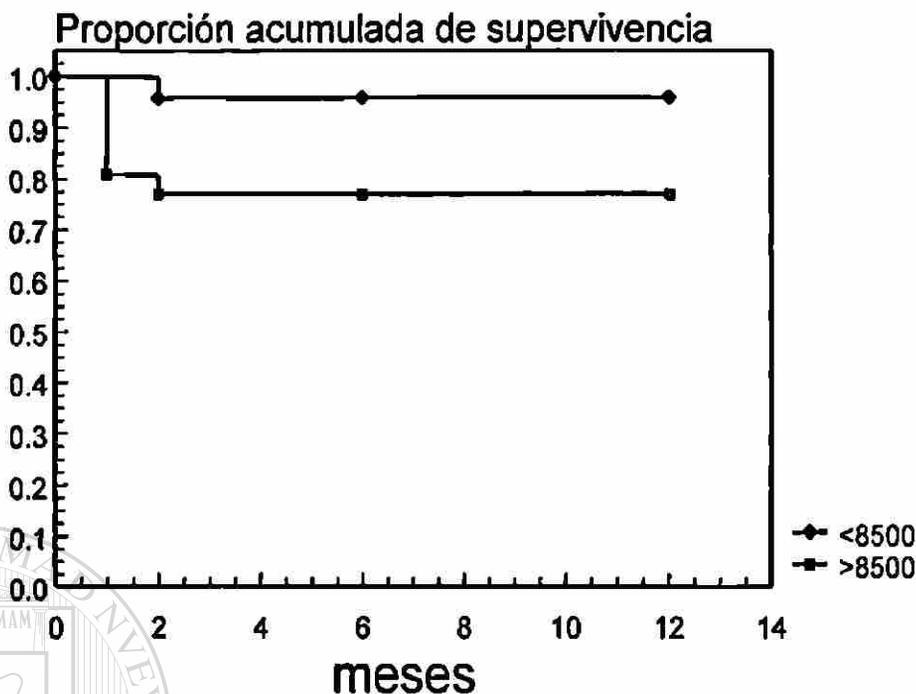


Figura 31. Gráfica de supervivencia de los de los pacientes con SCA al comparar los niveles de leucocitos. Se compararon los niveles mayores de 8,500 cel/mm³ contra niveles menores de 8, 500 cel/mm³ (p=0.05). En contrando menor proporción de supervivencia en los pacientes con leucocitos mayores a 8,500 cel/mm³.

La segunda correlación se realizó usando regresiones logísticas simples, comparando las variables dependientes (angina, re-IAM, Choque y Muerte) contra las variables independientes clínicas, bioquímicas y genéticas, a un año de seguimiento. Encontrándose como marcadores para: a) angina después del SCA, a la carga genética -148 CT/TT del Fg y -717 AG/GG de la CRP; b) re-IAM, a la carga genética del 1691GA+AA; c) Choque, a los niveles de neutrófilos elevados; d) Muerte, al daño del ventrículo derecho; y d) en los eventos adversos totales, a la severidad de la enfermedad (representado por el CATT) (Figura 32).

Var. Independ.	Isquemia OR, P	Re-IAM OR, P	Choque OR, P	Defunción	EAT
-148 CT+TT	2.0, 0.04	---	---	---	---
-717 AG+G	2.0, 0.04	---	---	---	---
1691 AG+GG	---	2.4, 0.01	---	---	---
Neutrófilos	---	---	2.0, 0.04	---	---
Vent. Derecho	---	---	---	1.9, 0.05	---
CATT	---	---	---	---	2.0, 0.04

Figura 32.- Regresión Logística Simple de las variables dependientes a un año de seguimiento de los pacientes con SCA.

Además de estas variables estadísticamente significativas, todas las variables que tuvieron una $p < 0.15$ se utilizaron para hacer los modelos de regresión multivariada logística de cada uno de los eventos adversos de manera individual y en conjunto (EAT).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

En el evento angina, la carga genética del -148CT/TT permaneció estadísticamente significativa, mientras que el -717AG+GG no se mantuvo la significancia. Otras variables, como la presencia de CATT y la carga genética del PLA1/PLA2+PLA2/PLA2 que no fueron significativas en la regresión simple en el modelo, adquirieron evidencia estadísticamente significativa en la regresión logística multivariada (Tabla 15).

Para el evento re-IAM y choque, la carga genética del FV(1691AG+GG) y neutrófilos no permanecieron estadísticamente significativos y ningún modelo fue significativo para ellos.

Tabla 15.- Modelo de regresión multivariada logística de isquemia recurrente a un año de seguimiento (p=0.002).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
Hipertensión	0.43	0.58	0.55
CATT	1.81	2.13	0.03
Fg(-455 GA+AA)	-0.42	0.49	0.62
Fg(-148 CT+TT)	1.88	2.03	0.04
GpIIa (PLA1/PLA2+ PLA2/PLA2)	2.80	2.28	0.02
CRP(-717 AG+GG)	1.44	1.66	0.09

En el evento muerte, el daño en el ventrículo derecho no permaneció estadísticamente significativo, pero la FE y el genotipo Alu I/I, que no fueron significativos en el modelo la regresión simple, adquirieron evidencia estadísticamente significativa en la regresión multivariada (Tabla 16).

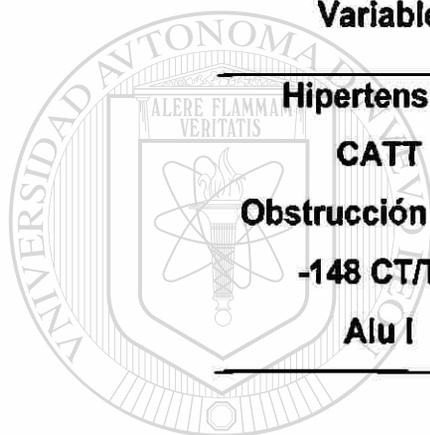
Tabla 16.- Modelo de regresión multivariada logística de muerte a un año de seguimiento (p=0.001).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
SCA +ST	2.22	0.96	0.33
Ventric. Der.	1.25	0.73	0.46
FE	-0.02	-1.96	0.04
Neutro >6,500	-2.26	-1.33	0.18
Leucos >8,500	9.45	0.98	0.32
Fg >450	-0.96	-0.97	0.33
Alu I/I	3.37	2.16	0.03

Para los eventos adversos totales (EAT), el CATT no permaneció estadísticamente significativa, pero la carga genotípica del Fg(-148CT/TT) que no fue significativo en el modelo de la regresión simple, adquirió evidencia estadísticamente significativa en el modelo multivariado (Tabla 17).

Tabla 17.- Modelo de regresión multivariada logística de EAT a un año de seguimiento (p=0.04).

Variable	Coefficiente Beta	OR (IC 95%)	p
Hipertensión	0.47	0.67	0.49
CATT	1.73	1.31	0.18
Obstrucción >70%	-0.50	-0.38	0.69
-148 CT/TT	1.45	1.91	0.05
Alu I	1.45	1.68	0.09



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

En este estudio se analizaron tres cohortes (SCA, ECE, y sujetos sanos) para investigar marcadores genéticos que pudieran ser utilizados como posibles predictores de la evolución clínica a mediano plazo, de sujetos que llegan al servicio de urgencias, con la enfermedad aguda (SCA).

Analizando los datos obtenidos, encontramos que antecedentes familiares (diabetes, SCA y hipertensión), tabaquismo y dislipidemia son marcadores de enfermedad coronaria, lo cual ha sido ya reconocido mundialmente.^{17,184-188}

Las investigaciones epidemiológicas y clínicas demuestran un incremento en las complicaciones trombóticas asociadas a ciertos factores de riesgo cardiovascular, como DM, hiperlipemia y tabaquismo.^{189,190} Algunos estudios clínicos y experimentales han establecido que los factores de riesgo pueden promover el desarrollo de un estado hipercoagulable que actúa como desencadenante de la trombogenicidad sanguínea.^{191,192} Concretamente, se ha descrito en pacientes con SCA, que las cifras elevadas de lípidos predisponen a la ruptura de placas vulnerables, mientras que el tabaquismo predispone a la trombosis aguda.¹⁹³

Se encontraron que las variables bioquímicas como los leucocitos, neutrófilos, fibrinógeno y creatinina están relacionadas a enfermedad coronaria, y para el riesgo de un nuevo evento de SCA sólo leucocitos y neutrófilos se mantuvieron significativos. Además, leucocitos $>8500 \text{ cell/mm}^3$ y Fg $>450 \text{ mg/dl}$ son predictores de mala evolución a un año, a pesar de que estos niveles (con excepción del Fg) se encuentran por debajo de los valores normales de referencia.¹⁹⁴⁻²⁰⁰ Por lo que nos hace pensar en la re-valoración de los niveles normales en estos marcadores. Proponiendo, como ha sucedido para otros factores de riesgo (como el colesterol, glucosa, IMC y medida de la cintura), que éstos tendrían que ser más estrictos (más bajos). Toda esta evidencia nos indica un proceso inflamatorio elevado, con problemas en la función renal, lo que se traduce a un mayor daño en el endotelio con placas ateromatosas más vulnerables, repercutiendo en un mayor riesgo de enfermedad coronaria, nuevos SCA y mal pronóstico de evolución.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las distribuciones genotípicas de los genes estudiados en la enfermedad coronaria son las primeras que se reporta en el país, encontrando que polimorfismos que son muy importantes para el riesgo cardiovascular en poblaciones caucásicas (principalmente europeas), como el G20210A del FII y G1691A del FV, no representan ningún riesgo e inclusive son muy raros en nuestra población, como se ha demostrado en poblaciones americanas, asiáticas y africanas.²⁰¹⁻²⁰⁵

Tal vez el hallazgo más relevante de este trabajo es el riesgo de sufrir un evento cardiovascular adverso, angina y muerte en los siguientes a doce meses post-SCA, cuando están presentes algunos polimorfismos de la hemostasis. Siendo éste el primer trabajo que reporta esta asociación, según los descritos en la literatura a esta fecha.

Los polimorfismos del Fg(-148C/T y -455G/A) y del FXIII(V34L) son marcadores de enfermedad coronaria, mientras que los de FXIII(V34L) y t-PA(Alu I/D) son marcadores de nuevo evento de SCA. Además, la carga genética del polimorfismo Fg(-148T) y la del GpIIa (PLA2) son marcadores independientes de isquemia recurrente, y de muerte el t-PA(Alu I/I).

En el caso de los polimorfismos en el promotor del Fg, éstos se correlacionaron con el fenotipo al encontrar asociación independiente al resto de los factores como tabaquismo, dislipidemia, diabetes, edad y sexo. Estos niveles de la proteína son superiores a los reportados por otros trabajos en los que se utiliza el método de Clauss para medir el Fg.^{206,207} En todo caso, las diferencias estadísticas observadas entre los grupos, sugieren estratificaciones fenotípicas que pudieran estar asociadas a riesgo cardiovascular incrementado.

También se observa que los niveles de Fg fueron predictores de muerte durante el seguimiento a un año del grupo SCA y que los valores de esta proteína durante el evento agudo en los sujetos que fallecieron fueron de 468.3 mg/dl (± 185.8 mg/dl). Estos hallazgos se han reportado en poblaciones israelíes,²⁰⁵

japonesa–americana,²⁰⁹ estadounidense²¹⁰ y española.²¹¹ Más aún, al comparar el valor predictivo del Fg con la RCP en pacientes con enfermedad coronaria inestable sin elevación del ST y sin necrosis miocárdica, se observaron resultados similares en la tasas de mortalidad.²¹²

La comparación de cargas genéticas conteniendo a los alelos Fg(-455A y -148T) demuestran asociación con la enfermedad coronaria, siendo lógico pensar que los polimorfismos en el promotor de la cadena β , la cual es la responsable de la regulación de los niveles del Fg, están asociados a la enfermedad. Por ejemplo, el polimorfismo Fg(-455G/A) se ha encontrado asociado a la enfermedad en la mayoría de los grupos étnicos alrededor del mundo,²¹³⁻²¹⁶ aunque reportes como los de Tybjarg-Hansen²¹⁶ y Doggen²¹⁷ no encontraron asociación cuando estudiaron poblaciones danesa y holandesa, respectivamente.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otra parte para el polimorfismo Fg(-148C/T) no ha sido definitivamente asociado como determinante de riesgo cardiovascular, aunque recientemente se reportó asociación con IM²⁰⁸ y con la predicción de aterosclerosis en carótidas,³⁷ en una población Asiática. Por lo que este estudio apoya la asociación de este polimorfismo con los SCAs.

En conjunto, los resultados de este trabajo muestran que el alelo Fg(-148T) está íntimamente ligado a valores altos de Fg, a enfermedad coronaria en general y

a eventos adversos post-SCA, y que el alelo Fg(-455A) está asociado a valores altos de Fg y enfermedad coronaria. La asociación simultánea de los alelos Fg(-455A y -148T) concuerdan con la hipótesis de un posible desequilibrio de ligamiento entre estos dos polimorfismos, como se ha reportado para poblaciones caucásicas.^{219,220} Sin embargo el presente estudio no permite establecer esta conclusión.

Los dos polimorfismos que resultaron ser significativos, se ubican en la región promotora del gen FgB, muy cerca del elemento de respuesta a IL-6 y C/EBP y de los sitios HNF1 y HNF3.^{31,215,221-224} Los cuales son esenciales para una respuesta total del promotor a la IL-6, la cual es una citocina responsable de la respuesta inflamatoria, relacionada a niveles elevados de proteínas de fase aguda como el Fg y la Proteína C Reactiva. Por lo que es posible que estos polimorfismos estén involucrados a mayor respuesta del promotor de Fg a los estímulos como disfunción endotelial, trombosis, estrés oxidativo, etc. Lo que explicaría las asociaciones observadas en este estudio.

Con respecto a los hallazgos del polimorfismo del FXIII(V34L) es importante pensar en que el cambio de aminoácido está muy cerca de su sitio de anclaje a la trombina, por lo que es muy importante en la activación del factor. In vitro se ha reportado que el polimorfismo 34L forma coágulos más estables a la fibrinólisis endógena.⁸⁸ Pero que en la clínica es a la inversa, donde el 34V es el asociado a trombosis e IM.^{86,92} Esto se puede explicar debido a la interacción que tiene el FXIII con la estructura del coágulo de fibrina y la función del Fg.

Donde altas concentraciones de Fg, en muestras homocigotos para 34 L, forman coágulos con permeabilidad incrementada y una estructura más laxa, con fibras más densas que los coágulos formados por las muestras homocigotos para 34V. Por lo tanto, un efecto protector del FXIII emerge en presencia de concentraciones de Fg asociadas a riesgo cardiovascular (Figura 33).⁹⁵ En donde el coágulo formado por los niveles elevados de Fg y el alelo V34 del FXIII es menos accesible para la fibrinólisis endógena y exógena.

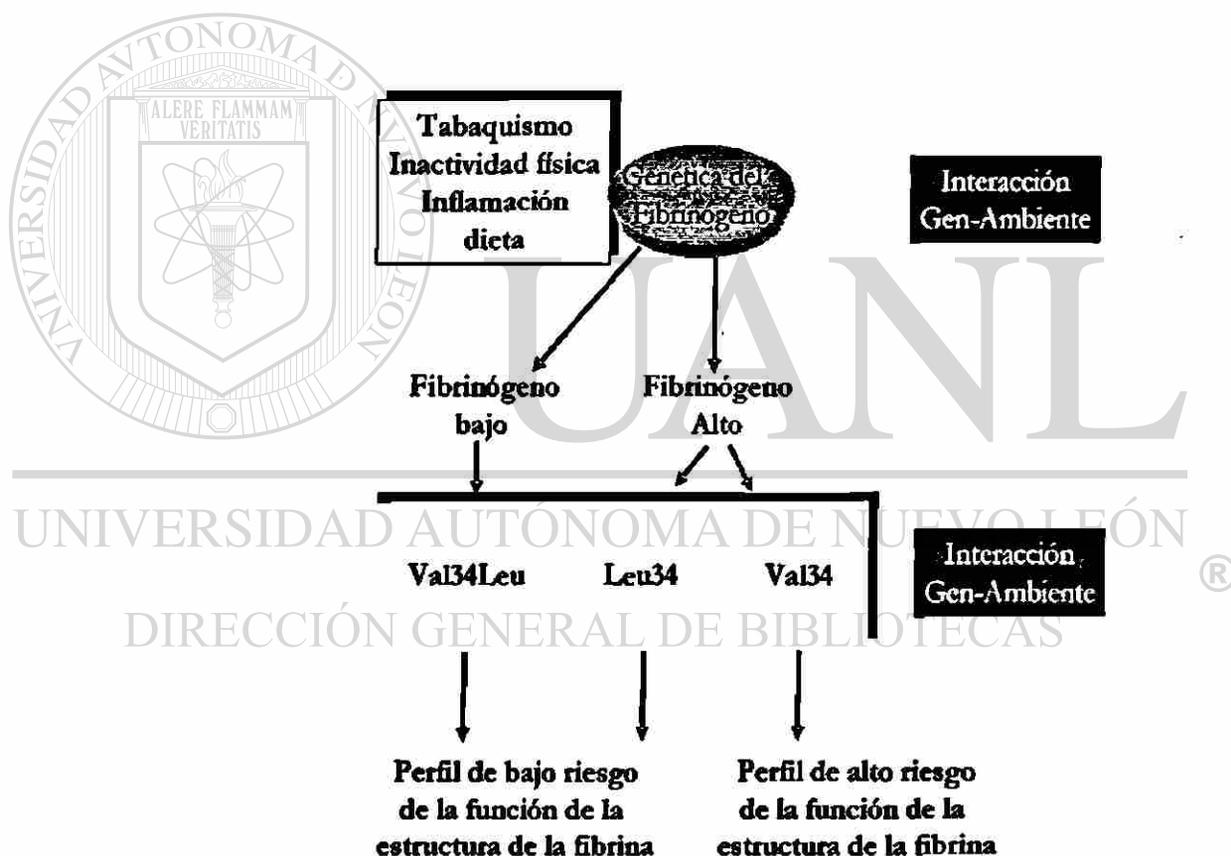


Figura 33.- Interacción niveles de Fibrinógeno y el polimorfismo V34L del FXIII. Se observa un estímulo en el gen del Fg el cual dependiendo de los polimorfismos en su promotor (-148, -455, etc.) los niveles de fibrinógeno serán bajos o altos. Si son bajos no importa el alelo que tenga el paciente, la fibrina formará coágulos más laxos y permeables. Para los niveles elevados de Fg: en presencia del alelo 34L, la fibrina formará coágulos laxos y permeables y con el alelo 34V el coágulo formado es más estable y la permeabilidad se ve disminuida.

Por otra parte los resultados del polimorfismo PLA2 del GpIIb como marcador de Isquemia recurrente post-SCA, podría explicarse con el hecho que el polimorfismo está en el sitio más importante de unión a Fg, para que se lleve a cabo la adhesión y agregación plaquetaria.⁴⁰ Esto da pie a pensar que este alelo da una mayor hiperactividad a las plaquetas, sin embargo recientemente un estudio *in vitro* encontró que el alelo PLA2 está asociado con una deficiencia en la función de éstas.²²⁴ Lo cual nos hace suponer, como sucede en la interacción FXIII y niveles de Fg, en la hipótesis de que *in vivo* la presencia del alelo PLA2 y niveles elevados de Fg podrían dar como resultado una mayor actividad y estabilidad de las plaquetas con respecto al alelo PLA1. Lo que se traduce en una mayor trombogenicidad.

Por último, si nos basamos en la teoría de que las personas con una capacidad fibrinolítica disminuida están en un riesgo creciente de un MI, pensaríamos que la disminución de los niveles plasmáticos de t-PA, podrían ser un factor de riesgo, y así explicaríamos en nuestro trabajo que Alu I/I es un marcador de muerte post- SCA. En contraste, varios estudios han reportado que el genotipo no correlaciona con los niveles plasmáticos de t-PA.²²⁵⁻²²⁷ La naturaleza de la inserción de una repetición Alu en un intrón del gen t-PA, hace difícil pensar que esta mutación esté afectando los niveles de la proteína, aunque no puede hacerse ninguna aseveración hasta no demostrar si realmente afecta o no los niveles de la proteína,²²⁸ ya que dicho polimorfismo pudiera tener efecto en la estabilidad y/o procesamiento del mRNA.

Actualmente se ha demostrado que es mejor medir los niveles secretados de la proteína (t-PA) por las células endoteliales que medir los circulantes.²³⁰ Debido a que después de la secreción del endotelio vascular la actividad del t-PA se remueve extremadamente rápido de la circulación por la separación de la proteína a través de receptores del hígado, así como por la interacción con PAI-1. De modo que las concentraciones sistémicas del t-PA dependen de la secreción, separación y del complejo que forma con el PAI-1.²²⁹ Además, el t-PA es más potente en la lisis de la fibrina cuando el coágulo ya está formado^{231,232} y los niveles de la secreción por las células endoteliales es mayor a las que está circulante.

Dos estudios han encontrado una asociación entre el polimorfismo Alu I/D y la secreción de la proteína,^{233,234} lo cual nos hace suponer que los pacientes con

este polimorfismo tienen una deficiencia en el sistema fibrinolítico, lo que a su vez induciría a una respuesta ineficiente a una trombosis aguda.

Por tanto, paralelamente al concepto establecido de «placa vulnerable» o de «alto riesgo», se puede establecer el concepto de «sangre vulnerable» o de «sangre de alto riesgo» para referirnos al estado pretrombótico asociado a la presencia de polimorfismos en los genes de las proteínas que participan en la hemostasis. Estos factores son capaces de iniciar el proceso aterotrombótico produciendo disfunción endotelial y activando los procesos inflamatorio y trombótico.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

De los resultados aquí presentados, se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- ✓ Los antecedentes familiares (diabetes, SCA y hipertensión), tabaquismo, dislipidemia son factores de riesgo de enfermedad coronaria.

- ✓ El fibrinógeno, Leucocitos, Neutrófilos, Creatinina, Fg(-148T y -455A) y FXIII(34V) son biomarcadores de riesgo de enfermedad coronaria.

- ✓ Los leucocitos, neutrófilos, FXIII(34V) y t-PA(AluI/I) son biomarcadores de riesgo de SCA.

- ✓ Los polimorfismos Fg(-148T y -455A) se asocian independientemente a niveles plasmáticos elevados del Fg.

- ✓ Los niveles >450 mg/dl del Fg y >8500 cel/mm³ de leucocitos son marcadores de mal pronóstico de supervivencia en pacientes con SCA.

- ✓ La enfermedad más severa y la carga genética del -148T del Fg y PLA2 del GPIIIa son marcadores independientes de Isquemia recurrente post-SCA a seguimiento de un año.

- ✓ La FE reducida y el polimorfismo Alu I/I del t-PA son marcadores independientes de muerte post-SCA a seguimiento de un año.

✓ La carga genotípica del polimorfismo Fg(-148T) es un biomarcador independiente de EAT.

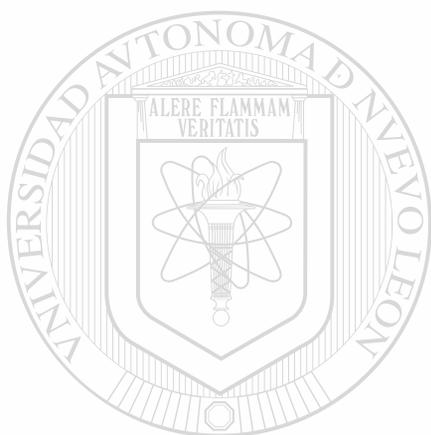
- ✓ En conclusión, todos estos marcadores clínicos, bioquímicos y genéticos en conjunto podrían ser útiles para una mejor estratificación de riesgo de enfermedad coronaria y de mala evolución de los pacientes post-SCA en nuestra población. Además proporcionan la base para buscar marcadores de resistencia a tratamiento en los pacientes con enfermedad coronaria.

CAPÍTULO IX

PERSPECTIVAS

- Con base a los resultados encontrados en esta investigación, es primordial determinar niveles plasmáticos de RCP altamente sensible, IL-6 y t-PA, para correlacionar los hallazgos genéticos encontrados con los fenotipos, como se realizó con el Fg.
- Analizar un mayor número de pacientes con SCA para poder tener mayores cifras de pacientes en cada uno de los eventos adversos y poder establecer modelos de riesgos para re-IAM y Choque, ya que en este estudio no se pudieron realizar, debido al número tan reducido de casos en cada uno de estos eventos adversos.
- Analizar estos polimorfismos en otras poblaciones mexicanas para ver su comportamiento y establecer si funcionarían como marcadores de eventos adversos y mal pronóstico.
- Analizar las otras rutas metabólicas involucradas en la patofisiología de la enfermedad, como las que implican genes que participan en la disfunción endotelial e inflamación, para poder generar un cardiograma genético de riesgo para la enfermedad coronaria de la población mexicana.

- Y por último se necesita que la detección de los polimorfismos analizados en este estudio y que fueron estadísticamente significativos se realicen con una metodología que permita la identificación rápida de los poliorfismos, como es la tecnica con sondas TaqMan (Q-PCR).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO X

REFERENCIAS

1. O'Rourke RA, Hochman JS, Cohen MC, Lucore CL, Popma JJ, Cannon CP: New approaches to diagnosis and management of unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. Arch Intern Med 2001;161(5): 674-682.
2. Wiggins BS, Wittkowsky AK, Nappi JM: Clinical use of new antithrombotic therapies for medical management of acute coronary syndromes. Pharmacotherapy 2001; 21(3):320-337.
3. Estadísticas demográficas cuaderno número 14, edición 2002, pag 134 [homepage on the Internet]. MEXICO: INEGI. 2004 02/07/04. Available from: http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/cuad13/cua-pob14.pdf?
4. Libby P. Atherosclerosis: the new view. Sci Am. 2002 May;286:46-55.
5. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC: Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. european concerted action on thrombosis and disabilities angina pectoris study group. N Engl J Med 1995; 332(10):635-641.
6. Cannon CP, McCabe CH, Diver DJ, Herson S, Greene RM, Shah PK, et al: Comparison of front-loaded recombinant tissue-type plasminogen activator, anistreplase and combination thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 4 trial. J Am Coll Cardiol 1994; 24(7):1602-1610.
7. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. the GUSTO angiographic investigators. N Engl J Med 1993; 329(22):1615-1622.
8. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina).: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. Catheter Cardiovasc Interv 2000; 51(4): 505-521.
9. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). J Am Coll Cardiol 2000; 36(3): 970-1062.
10. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). Circulation 2000; 102(10): 1193-1209.

11. Kennon S, Price CP, Mills PG, Ranjadayalan K, Cooper J, Clarke H, et al: The effect of aspirin on C-reactive protein as a marker of risk in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(5): 1266-1270.
12. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, Sparks CE, Oakes D, Greenberg H, et al: Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999; 99(19): 2517-2522.
13. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M: Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(4): 1210-1216.
14. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L: Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. *frangin during instability in coronary artery disease. N Engl J Med* 2000; 343(16): 1139-1147.
15. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J; American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. 2004;109:2617-2625.
16. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med*. 2003;253:120-127.
17. Navarro-Lopez F. [Genes and coronary heart disease] *Rev Esp Cardiol* 2002. 55:413-31.
18. Jerjes-Sánchez, Díaz C, Comparan-Núñez A, Ibarra-Flores M, Decanini-Arcaute H, Archondo T. Marcadores Hemostáticos y de Inflamación en Síndromes Coronarios Agudos y su relación con eventos cardiovasculares adversos. *Chest* 2002. 122:177S.
19. Doolittle RF, Spraggon G, Everse SJ. Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8:792-798.
20. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31:741-746.
21. Haidaris PJ, Francis CW, Sporn LA, Arvan DS, Collichio FA, Marder VJ. Megakaryocyte and hepatocyte origins of human fibrinogen biosynthesis exhibit hepatocyte-specific expression of gamma chain-variant polypeptides. *Blood*. 1989;74:743-750.
22. Koenig W: Fibrin (ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost* 2003; 89:601-609.
23. Kamath S, Lip GY: Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM* 2003; 96:711-729.
24. Young E, Prins M, Levine MN, Hirsh J: Heparin binding to plasma proteins, an important mechanism for heparin resistance. *Thromb Haemost* 1992; 67:639-643.
25. Cohen M, Arjomand H, Pollack CV Jr: The evolution of thrombolytic therapy and adjunctive antithrombotic regimens in acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Emerg Med* 2004; 22:14-23.
26. Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW: Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet* 1987; 1:1452-1455.
27. Hamsten A, Iselius L, de Faire U, Blombäck M: Genetic and cultural inheritance of plasma fibrinogen concentration. *Lancet* 1987; 2:988-991.

28. Kant JA, Fornace AJ, Jr, Saxe D, Simon MI, McBride OW, Crabtree GR: Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:2344-2348.
29. Yu S, Sher B, Kudryk B, Redman CM: Fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. *J Biol Chem* 1984; 259:10574-10581.
30. Thomas AE, Green FR, Kelleher CH, Wilkes HC, Brennan PJ, Meade TW, et al: Variation in the promoter region of the beta fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers. *Thromb Haemost* 1991; 65:487-490.
31. Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M: Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001; 38:1199-1203
32. Fellowes AP, Brennan SO, George PM: Identification and characterization of five new fibrinogen gene polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936:536-541.
33. De Maat MP, Kastelein JJ, Jukema JW, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, et al: -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:265-271.
34. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al: Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde*. *Circulation* 1996; 93:440-449
35. Scarabin PY, Bara L, Ricard S, Poirier O, Cambou JP, Arveiler D, et al: Genetic variation at the beta-fibrinogen locus in relation to plasma fibrinogen concentrations and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:886-891.
36. Berg K, Kierulf P: ADN polymorphisms at fibrinogen loci and plasma fibrinogen concentration. *Clin Genet* 1989; 36:229-235.
37. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K et al. Beta-fibrinogen gene polymorphism (C148T) is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:487-492.
38. Connor JM, Fowkes FG, Wood J, Smith FB, Donnan PT, Lowe GD. Genetic variation at fibrinogen loci and plasma fibrinogen levels. *J Med Genet* 1992; 29:480-482.
39. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455-> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest* 1997; 99:3034-3039.
40. Beutler E, Lichman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. *Williams Hematology*. Sixth Edition, McGrawHill. 2001; pag:1418-1419.
41. Kalafatis M, Mann KG. Factor V Leiden and thrombophilia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:620-627.
42. Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*. 1992; 31:3777-3785.
43. Kane WH, Davie EW. Cloning of a cADN coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:6800-6804.

44. Jenny RJ, Pittman DD, Toole JJ, Kriz RW, Aldape RA, Hewick RM, Kaufmann RJ, Mann KG. Complete cADN and derived amino acid sequence of human factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:4846-4850.
45. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem.* 1994;269:31869-31880.
46. Nesheim ME, Mann KG. Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V. *J Biol Chem.* 1979;254:1326-1334.
47. Esmon CT. The subunit structure of thrombin-activated factor V. *J Biol Chem.* 1979;254:964-973.
48. Suzuki K, Dahlbäck B, Stenflo B. Thrombin-catalyzed activation of human coagulation factor V. *J Biol Chem.* 1982;257:6556-6564.
49. Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Nature.* 1990;29:1118-1128.
50. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:516-530.
51. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68:1370-1373.
52. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest.* 1984;74:2082-2088.
53. Lane DA, Grant PJ. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood.* 2000;95:1517-1532.
54. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, vander Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-67.
55. Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood.* 1998;91:1135-1139.
56. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 1;90(3):1004-1008.
57. Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet.* 1993;342:1503-1506.
58. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1004-1008.
59. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis.* 1994.;24:139-151.
60. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, ten Cate JW, Mertens K, van Mourik JA. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg506 of factor V. *Lancet.* 1994;343:1535-1536.
61. Svensson PJ, Dahlback B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med.* 1994;330:517-522.
62. Dahlback B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest.* 1994;94:923-927.

63. Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. *Lancet*. 1995;346:1133-1134.
64. Chan LC, Bourke C, Lam CK, Liu HW, Brookes S, Jenkins V, Pasi J. Lack of activated protein C resistance in healthy Hong Kong Chinese blood donors--correlation with absence of Arg506-Gln mutation of factor V gene. *Thromb Haemost*. 1996;75:522-523.
65. Rabes JP, Trossaert M, Conard J, Samama M, Giraudet P, Boileau C. Single point mutation at Arg506 of factor V associated with APC resistance and venous thromboembolism: improved detection by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Thromb Haemost*. 1995;74:1379-1380.
66. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Eisenberg PR, Miletich JP. Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1995;332:912-917.
67. Ardissino D, Peyvandi F, Merlini PA, Colombi E, Mannucci PM. Factor V (Arg 506-->Gln) mutation in young survivors of myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1996;75:701-702.
68. Cushman M, Rosendaal FR, Psaty BM, Cook EF, Valliere J, Kuller LH, Tracy RP. Factor V Leiden is not a risk factor for arterial vascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost*. 1998;79:912-915.
69. Longstreth WT Jr, Rosendaal FR, Siscovick DS, Vos HL, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: factor V Leiden and prothrombin gene variant (G20210A). *Stroke*. 1998;29:577-580.
70. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Beverly RK, Psaty BM, Longstreth WT Jr, Raghunathan TE, Koepsell TD, Reitsma PH. Factor V Leiden (resistance to activated protein C) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood*. 1997;89:2817-2821.
71. Doggen CJ, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation*. 1998;97:1037-1041.
72. Kiechl S, Muigg A, Santer P, Mitterer M, Egger G, Oberhollenzer M, Oberhollenzer F, Mayr A, Gasperi A, Poewe W, Willeit J. Poor response to activated protein C as a prominent risk predictor of advanced atherosclerosis and arterial disease. *Circulation*. 1999;99:614-619.
73. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:216-229.
74. Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet*. 1986;2:533-537.
75. Hunault M, Arbini AA, Lopaciuk S, Carew JA, Bauer KA. The Arg353Gln polymorphism reduces the level of coagulation factor VII: in vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 2825-2829.
76. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Kluff C, Benedetta Donati M. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998; 338: 79-85.

77. Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso S, Manzato F, Mazzucco A, Bernardi F, Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;343:774-780.
78. Lindman AS, Pedersen JI, Arnesen H, Hjerkin EM, Veierod MB, Prydz H, Seljeflot I. Coagulation factor VII, R353Q polymorphism, and serum choline-containing phospholipids in males at high risk for coronary heart disease. *Thromb Res.* 2004;113:57-65.
79. Folsom AR, Wu KK, Rosamond WD, Sharrett AR, Chambless LE. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation.* 1997; 96: 1102-1108.
80. Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RT, Hamerton JL. Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat Cell Mol Genet.* 1987;13:285-292.
81. Degen SJ, Schaefer LA, Jamison CS, Grant SG, Fitzgibbon JJ, Pai JA, Chapman VM, Elliott RW. Characterization of the cADN coding for mouse prothrombin and localization of the gene on mouse chromosome 2. *ADN Cell Biol.* 1990;9:487-498.
82. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet.* 2001;28:389-392.
83. Reiner AP, Siscovick DS, Rosendaal FR. Hemostatic risk factors and arterial thrombotic disease. *Thromb Haemost.* 2001; 85: 584-595.
84. Nowak-Gottl U, Strater R, Heinecke A, Junker R, Koch HG, Schuierer G, von Eckardstein A. Lipoprotein(a) and genetic polymorphisms of clotting factor V, prothrombin, and methylenetetrahydrofolate reductase are risk factors of spontaneous ischemic stroke in childhood. *Blood.* 1999; 94: 3678-3682.
85. Rosendaal FR, Siscovick DS, Schwartz SM, Psaty BM, Raghunathan TE, Vos HL. A common prothrombin variant (20210 G to A) increases the risk of myocardial infarction in young women. *Blood.* 1997; 90: 1747-1750.
86. Redondo M, Watzke HH, Stucki B, Sulzer I, Biasiutti FD, Binder BR, Furlan M, Lammle B, Wuillemin WA. Coagulation factors II, V, VII, and X, prothrombin gene 20210G-->A transition, and factor V Leiden in coronary artery disease: high factor V clotting activity is an independent risk factor for myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1020-1025.
87. Inbal A, Freimark D, Modan B, Chetrit A, Matetzky S, Rosenberg N, Dardik R, Baron Z, Seligsohn U. Synergistic effects of prothrombotic polymorphisms and atherogenic factors on the risk of myocardial infarction in young males. *Blood.* 1999; 93: 2186-2190.
88. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, Rosendaal FR. Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation.* 1998;97:1037-1044.
89. Ariens RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 2002; 100: 743-754.

90. Kohler HP, Ariens RA, Whitaker P, Grant PJ. A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb Haemost.* 1998; 80: 704.
91. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood.* 2000; 96: 988–995.
92. Kohler HP, Stickland MH, Ossei-Gerning N, Carter A, Mikkola H, Grant PJ. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998 Jan;79(1):8-13.
93. Kohler HP, Grant PJ. Clustering of haemostatic risk factors with FXIIIVal34Leu in patients with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1998;80:862.
94. Kohler HP, Mansfield MW, Clark PS, Grant PJ. Interaction between insulin resistance and factor XIII Val34Leu in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 1999;82:1202-1203.
95. Lim BC, Ariens RA, Carter AM, Weisel JW, Grant PJ. Genetic regulation of fibrin structure and function: complex gene-environment interactions may modulate vascular risk. *Lancet.* 2003; 361: 1424–1431.
96. Elbaz A, Poirier O, Canaple S, Chedru F, Cambien F, Amarenco P. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infarction. *Blood.* 2000; 95: 586–591.
97. Franco RF, Pazin-Filho A, Tavella MH, Simoes MV, Marin-Neto JA, Zago MA. Factor XIII Val34Leu and the risk of myocardial infarction. *Haematologica.* 2000; 85: 67–71.
98. Dardik R, Solomon A, Loscalzo J, Eskaraev R, Bialik A, Goldberg I, Schiby G, Inbal A. Novel proangiogenic effect of factor XIII associated with suppression of thrombospondin 1 expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1472–1477.
99. Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997;349:370-371.
100. Lanza F, Kieffer N, Phillips DR, Fitzgerald LA. Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor beta-subunit gene. *J Biol Chem.* 1990;265:18098-18103.
101. Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, van Tuinen P, Ledbetter DH, Nussbaum RL, Kaos FT, Schwartz E, Phillips D, Bennett JS, et al. Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest.* 1988;81:1993-1998.
102. Honda S, Honda Y, Bauer B, Ruan C, Kunicki TJ. The impact of three-dimensional structure on the expression of PIA alloantigens on human integrin $\alpha 3$. *Blood.* 1995; 86: 234–242.
103. Newman PJ. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet.* 1997; 349: 370–371.
104. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1090–1094.
105. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PIA polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet.* 1996;348:485-486.

106. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis. *Lancet*. 1997;349:385-388.
107. Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F. The Leu33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins de l'Infarctus du Myocarde. Thromb Haemost*. 1997;77:1179-1181.
108. Carter AM, Ossei-Gerning N, Wilson IJ, Grant PJ. Association of the platelet PI(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bb448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Circulation*. 1997;96:1424-1431.
109. Samani NJ, Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1997;33:693-697.
110. Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Tuddenham EG. Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIA gene PLA2 polymorphism. *Thromb Haemost*. 1998 Aug;80(2):218-219.
111. Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG; Copenhagen City Heart Study. Platelet glycoprotein IIb/IIIa PI(A2)/PI(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:661-667.
112. Mamotte CD, van Bockxmeer FM, Taylor RR. Pla1/a2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1998;82:13-16.
113. Gardemann A, Humme J, Stricker J, Nguyen QD, Katz N, Philipp M, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Association of the platelet glycoprotein IIIa PIA1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients. *Thromb Haemost*. 1998;80:214-217.
114. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1998;79:731-735.
115. Ludwig M, Wohn KD, Schleuning WD, Olek K. Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. *Hum Genet*. 1992;88:388-392.
116. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cADN in *E.coli*. *Nature*. 1983;301:214-301221.
117. Jornvall H, Pohl G, Bergsdorf N, Wallen P. Differential proteolysis and evidence for a residue exchange in tissue plasminogen activator suggest possible association between two types of protein microheterogeneity. *FEBS Lett*. 1983;156:47-50.
118. Yang-Feng TL, Opdenakker G, Volckaert G, Francke U. Human tissue-type plasminogen activator gene located near chromosomal breakpoint in myeloproliferative disorder. *Am J Hum Genet*. 1986;39:79-87.

119. Degen SJ, Rajput B, Reich E. The human tissue plasminogen activator gene. *J Biol Chem.* 1986 25;261:6972-6985.
120. van der Bom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, de Jong PT, Hofman A, Klufft C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation.* 1997; 95: 2623-2627.
121. Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1687-1690.
122. Sartori MT, Saggiorato G, Spiezia L, Varvarikis C, Carraro G, Patrassi GM, Irolami A. Influence of the Alu-repeat I/D polymorphism in t-PA gene intron 8 on the stimulated t-PA release after venous occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9:63-69.
123. Bang CO, Park HK, Ahn MY, Shin HK, Hwang KY, Hong SY. 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and insertion/deletion polymorphism of the tissue-type plasminogen activator gene in atherothrombotic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2001;11:294-299.
124. Booth NA, Bennett B. Fibrinolysis and thrombolysis. *Baillieres Clin Haematol.* 1994;7:559-572.
125. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Gelehrter TD. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1673-1680.
126. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart N, Stanislovitis P, Watkins P, Douglas R, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:8548-8552.
127. Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, Cousin E, Genton CY, Bachmann F, Kruthof EK. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1090-1100.
128. Sobel BE, Woodcock-Mitchell J, Schneider DJ, Holt RE, Marutsuka K, Gold H. Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombolysis and its persistence. *Circulation.* 1998;97:2213-2221.
129. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1792-1801.
130. Wiman B, Ljungberg B, Chmielewska J, Urden G, Blomback M, Johnsson H. The role of the fibrinolytic system in deep vein thrombolysis. *J Lab Clin Med* 1985;105:265-270.
131. Margaglione M, Di Minno G, Grandone E, et al. Abnormally high circulation levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with a history of ischemic stroke. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1741-1745.
132. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* 1998;98:2241-2247.

133. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, et al. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.
134. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blombäck M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1985;313:1557-1563.
135. Francis RB Jr, Kawanishi D, Baruch T, Mahrer P, Rahimtoola S, Feinstein DI. Impaired fibrinolysis in coronary artery disease. *Am Heart J* 1988;115:776-780.
136. Juhan-Vague I, Pyke SDM, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation* 1996;94:2057-2063.
137. Angleton P, Chandler WL, Schmer G. Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). *Circulation* 1989;79:101-106.
138. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, et al. Major circadian fluctuations in fibrinolytic factors and possible relevance to time of onset of myocardial infarction, sudden cardiac death and stroke. *Am J Cardiol* 1988;65:635-637.
139. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb* 1991;11:183-190.
140. Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1993;268:10739-10745.
141. Eriksson P, Kallin B, van 't Hooft FM, Bavenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1851-1855.
142. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 1995;74:842-847.
143. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:20-26.
144. Sironi L, Mussoni L, Prati L, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis and mRNA expression in HepG2 cells are regulated by VLDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:89-96.
145. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thromb Haemost* 1995;74:1032-1034.
146. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:33-37.
147. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:152-156.

148. Iwai N, Shimoike H, Nakamura Y, Tamaki S, Kinoshita M. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 1998;136:109-114.
149. Ye S, Green FR, Scarabin PY, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. *Thromb Haemost* 1995;74:837-841.
150. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, Stampfer MJ, Miletich JP. Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men. *Circulation* 1997;95:59-62.
151. Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W. The 4G/5G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphisms is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease. *Thromb Haemost* 1999;82:1121-1126.
152. Catto AJ, Carter AM, Stickland M, Bamford JM, Davies JA, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects with cerebrovascular disease. *Thromb Haemost* 1997;77:730-734.
153. Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati MB. The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;80:1029-1030.
154. Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer A C, Greenhough TJ. *Nat Struct Biol* 1996;3:346-354.
155. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure Fold Des.* 1999;7:169-177.
156. Whitehead AS, Bruns GA, Markham AF, Colten HR, Woods DE. Isolation of human C-reactive protein complementary ADN and localization of the gene to chromosome 1. *Science.* 1983;221:69-71.
157. Kushner I, Jiang SL, Zhang D, Lozanski G, Samols D. Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann N Y Acad Sci.* 1995;762:102-107.
158. Verma S, Yeh ET. C-reactive protein and atherothrombosis—beyond a biomarker: an actual partaker of lesion formation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R1253-R1256.
159. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, et al. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation.* 2003;108:1917-1923.
160. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003;111:1805-1812.
161. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation.* 2001;103:1813-1818.
162. Ridker PM, Rifai N, Rose L, et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
163. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, et al. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective

- analysis from the Women's Health Initiative Observational Study. *JAMA*. 2002;288:980–987.
164. Albert CM, Ma J, Rifai N, et al. Prospective study of C-reactive protein, homocysteine, and plasma lipid levels as predictors of sudden cardiac death. *Circulation*. 2002;105:2595–2599.
165. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, et al. C-reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J*. 2000;21:1584–1590.
166. Koenig W, Sund M, Froelich M, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999;99:237–242.
167. Sakkinen P, Abbott RD, Curb JD, et al. C-reactive protein and myocardial infarction. *J Clin Epidemiol*. 2002; 55: 445–451.
168. Verma S, Szmitko PE, Yeh ET. C-reactive protein: structure affects function. *Circulation*. 2004 ;109:1914-1917.
169. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 2001;154:681–689.
170. Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, Ratcliffe PJ, Watkins HC, Keavney B. Genotype at a promotor polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res*. 2002;53:1029–1034.
171. MacGregor AJ, Gallimore J, Spector TD, Pepys MB. Genetic factors determine baseline levels of C-reactive protein and serum amyloid A. *Ann Rheum Dis*. 1999;58:43.
172. Hengstenberg C, Broeckel U, Holmer S, Glockner C, Mayer B, Commuzie AG, Riegger GAJ, Schunkert H. Genetic linkage analysis for C-reactive protein in families with myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2003;24(suppl):156.
173. Cao H, Hegele RA. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. *J Hum Genet*. 2000;45(2):100-101.
174. Zee RYL, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis*. 2002;162:217–219.
175. Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RY. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):139-145.
176. Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GD, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(11):2063-2069.
177. Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GDO, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. 2003;23:2063–2069.

178. Zee RY, Hegener HH, Fernandez-Cruz A, Lindpaintner K. C-reactive protein gene polymorphisms and the incidence of post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis*. 2004;176(2):393-396.
179. Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson CG, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2005;178(1):193-198.
180. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in molecular biology*. Fourth edition. 1999. Editorial Board.
181. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2001. Third Edition. Tomo III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
182. Bladbjerg EM, Gram J, Jespersen J, de Maat MP. Internal quality control of PCR-based genotyping methods: practical experiences. *Vascul Pharmacol*. 2002;39:127-129.
183. Carneiro AV. Coronary heart disease in diabetes mellitus: risk factors and epidemiology. *Rev Port Cardiol*. 2004;23(10):1359-1366.
184. Fox CS, Sullivan L, D'Agostino RB Sr, Wilson PW; Framingham Heart Study. The significant effect of diabetes duration on coronary heart disease mortality: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care*. 2004;27(3):704-708.
185. Leone A, Giannini D, Bellotto C, Balbarini A. Passive smoking and coronary heart disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(2):175-182.
186. Richey Sharrett A, Coady SA, Folsom AR, Couper DJ, Heiss G; ARIC Study. Smoking and diabetes differ in their associations with subclinical atherosclerosis and coronary heart disease-the ARIC Study. *Atherosclerosis*. 2004;172(1):143-149.
187. Singh BK, Mehta JL. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. *Curr Opin Cardiol*. 2002;17(5):503-511.
188. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 1979;241:2035-2038.
189. Kuuslasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary events rates across the WHO MONICA Project population. *Lancet* 2000;335:675-687.
190. Morishita E, Asakura H, Jokaji H, Saito M, Uotani C, Kumabashiri I, et al. Hypercoagulability and high lipoprotein(a) levels in patients with type II diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1996;120: 7-14.
191. Rao AK, Chouhan V, Chen X, Sun L, Boden G. Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation during prolonged hyperglycemia in young healthy men. *Diabetes* 1999;48:1156-1161.
192. Burke AP, Farb A, Malcolm GT, Liang YH, Smialek J, Vimani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med* 1997;336:1276-1281.
193. Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol*. 2001;154(8):758-764.

194. Brown DW, Giles WH, Croft JB. White blood cell count: an independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol.* 2001;54(3):316-322.
195. Haumer M, Amighi J, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Schlager O, Schwarzingler I, Wagner O, Minar E, Schillinger M. Association of neutrophils and future cardiovascular events in patients with peripheral artery disease. *J Vasc Surg.* 2005;41(4):610-617.
196. Home BD, Anderson JL, John JM, Weaver A, Bair TL, Jensen KR, Renlund DG, Muhlestein JB; Intermountain Heart Collaborative Study Group. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(10):1638-1643.
197. Cremer P, Nagel D, Seidel D, van de Loo JC, Kienast J. Considerations about plasma fibrinogen concentration and the cardiovascular risk: combined evidence from the GRIPS and ECAT studies. Goettingen Risk Incidence and Prevalence Study. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Am J Cardiol.* 1996;78:380-381.
198. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation.* 1991; 83:836-844.
199. Schillaci G, Reboldi G, Verdecchia P. High-normal serum creatinine concentration is a predictor of cardiovascular risk in essential hypertension. *Arch Intern Med.* 2001;161(6):886-891.
200. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998 (4):706-708.
201. Donmez Y, Kanadasi M, Tanriverdi K, Demir M, Demirtas M, Cayli M, Alhan C, Baslamisli F. Prothrombin 20210GA and factor V Leiden mutations in patients less than 55 years old with myocardial infarction. *Jpn Heart J.* 2004 (3):505-512.
202. Franco RF, Santos SE, Elion J, Tavella MH, Zago MA. Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematol.* 1998;100(1):9-12.
203. Chan, W. P.; Lee, C. K.; Kwong, Y. L.; Lam, C. K.; Liang, R. :A novel mutation of arg306 of factor V gene in Hong Kong Chinese. *Blood* 1998;91: 1135-1139.
204. Gregg, J. P.; Yamane, A. J.; Grody, W. W. ;Prevalence of the factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am. J. Med. Genet* 1997;73: 334-336.
205. Heinrich J, Ballseisen L, Schulte H, Assmann G, van de Loo J. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:54-59.
206. Stec JJ, Silbershatz H, Tofler GH, Matheney TH, Sutherland P, Lipinska I, Massaro JM, Wilson PF, Muller JE, D'Agostino RB Sr. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation.* 2000;102:1634-1638.
207. Benderly M, Graff E, Reicher-Reiss H, Behar S, Brunner D, Goldbourt U, for the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) Study Group. Fibrinogen Is a

- Predictor of Mortality in Coronary Heart Disease Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1996;16:351-356.
208. Yano K, Grove JS, Chen R, Rodriguez BL, Curb JD, Tracy RP: Plasma fibrinogen as a predictor of total and cause-specific mortality in elderly Japanese-American men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1065-1070.
209. Acevedo M, Pearce GL, Kottke-Marchant K, Sprecher DL. Elevated fibrinogen and homocysteine levels enhance the risk of mortality in patients from a high-risk preventive cardiology clinic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1042-1045.
210. Arnao Vives MA, Rueda Soriano J, Martínez Dolz LV, Osa Saez A, Almenar Bonet L, Morillas Blasco P, et al: [Prognostic value of fibrinogen in patients admitted with suspected unstable angina and non-q-wave myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55:622-630.
211. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L: Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1997;96:4204-4210.
212. Pegoraro RJ, Ranjith N, Rom L. Coagulation gene polymorphisms as risk factors for myocardial infarction in young Indian Asians. *Cardiovasc J S Afr*. 2005;16:152-157.
213. de Maat M, Kastelein J, Jukema J, Zwinderman AH, Jansen H, Groenemeier B, Brusckhe A, Kluft C, on behalf of the REGRESS Group. -455G/A Polymorphism of the β -Fibrinogen Gene is Associated With the Progression of Coronary Atherosclerosis in Symptomatic Men Proposed Role for an Acute-Phase Reaction Pattern of Fibrinogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;8:265-271.
214. Lam KS, Ma OC, Wat NM, Chan LC, Janus ED. -fibrinogen gene G/A-455 polymorphism in relation to fibrinogen concentrations and ischaemic heart disease in Chinese patients with type II diabetes. *Diabetologia*. 1999;42:1250-1253.
215. Carter AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*. 1996;19:1265-1268.
216. Tybjaerg-Hansen A, Agerholm-Larsen B, Humphries SE, Abildgaard S, Schnohr P, Nordestgaard BG. A common mutation (G-455→A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Invest*. 1997;99:3034-3039.
217. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Rosendaal FR. Fibrinogen polymorphisms are not associated with the risk of myocardial infarction. *Br J Haematol*. 2000;110:935-938.
218. Laffan MA. Fibrinogen polymorphisms and disease. *Eur Heart J*. 2001;22:2224-2226.
219. van 't Hooft FM, von Bahr SJ, Silveira A et al. Two common, functional polymorphisms in the promoter region of the beta-fibrinogen gene contribute to regulation of plasma fibrinogen concentration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:3063-3070.
220. Verschuur M, de Jong M, Felida L, de Maat MP, Vos HL. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen beta promoter is important for interleukin 6-

- induced expression, and its activity is influenced by the adjacent -148C/T polymorphism. *J Biol Chem.* 2005;280:16763-16771.
221. Anderson GM, Shaw AR, Shafer JA. Functional characterization of promoter elements involved in regulation of human B beta-fibrinogen expression. Evidence for binding of novel activator and repressor proteins. *J Biol Chem.* 1993;268:22650-22655.
222. Dalmon J, Laurent M, Courtois G. The human beta fibrinogen promoter contains a hepatocyte nuclear factor 1-dependent interleukin-6-responsive element. *Mol Cell Biol.* 1993;13:1183-1193.
223. Gervois P, Vu-Dac N, Kleemann R, Kockx M, Dubois G, Laine B, Kosykh V, Fruchart JC, Kooistra T, Staels B. Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J Biol Chem.* 2001;276:33471-33477.
224. Andrioli G, Minuz P, Solero P, Pincelli S, Ortolani R, Lussignoli S, Bellavite P. Defective platelet response to arachidonic acid and thromboxane A(2) in subjects with PI(A2) polymorphism of beta(3) subunit (glycoprotein IIIa). *Br J Haematol.* 2000;110(4):911-918.
225. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, de Knijff de P, D'Orazio C, Klufft C, Donati MB. Alu-repeat polymorphism in the tissue-type plasminogen activator (t-PA) gene, t-PA levels and risk of familial myocardial infarction (MI). *Fibrinolysis.* 1996;10(suppl 2):13-16.
226. van der Boom JG, de Knijff P, Haverkate F, Bots ML, Meijer P, de Jong PTVM, Hofman A, Klufft C, Grobbee DE. Tissue plasminogen activator and risk of myocardial infarction: the Rotterdam study. *Circulation.* 1997;95:2623-2627.
227. Ridker PM, Baker MT, Hennekens CH, Stampfer MJ, Vaughan DE. Alu-repeat polymorphism in the gene coding for tissue-type plasminogen activator (t-PA) and risks of myocardial infarction among middle-aged men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1687-1690.
228. Makalowski W, Mitchell GA, Labuda D. Alu sequences in the coding regions of mRNA: a source of protein variability. *Trends Genet.* 1994;10:188-193.
229. Chandler WL, Levy WC, Stratton JR. The circulatory regulation of TPA and UPA secretion, clearance, and inhibition during exercise and during the infusion of isoproterenol and phenylephrine. *Circulation.* 1995;92:2984-2994.
230. Emeis JJ. Local fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2005;3(9):1945-1946.
231. Brommer EJ. The level of extrinsic plasminogen activator (t-PA) during clotting as a determinant of the rate of fibrinolysis, inefficiency of activators added afterwards. *Thromb Res* 1984; 34: 109-115.
232. Fox KA, Robison AK, Knabb RM, Rosamund TL, Sobel BE, Bergman SR. Prevention of coronary thrombosis with subthrombolytic doses of tissue-type plasminogen activator. *Circulation* 1985; 72: 1346-1354.
233. Jern C, Ladenvall P, Wall U, Jern S. Gene polymorphism of t-PA is associated with forearm vascular release rate of t-PA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(2):454-459.
234. Sartori MT, Saggiorato G, Spiezia L, Varvarikis C, Carraro G, Patrassi GM, Girolami A. Influence of the Alu-repeat I/D polymorphism in t-PA gene intron 8 on the stimulated t-PA release after venous occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9(1):63-69.

ANEXO I



- **Forma de consentimiento informado**

- **Cuestionario**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**CENTRO MEDICO DEL NORTE
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

INFORME DE CONSENTIMIENTO

**PROTOCOLO
MARCADORES GENÉTICOS EN SINDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU
RELACIÓN CON EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS**

INVESTIGADOR: Dr. Carlos Jerjes Sánchez D

INSTITUCION: Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax
Centro Médico del Norte. IMSS.
Av. Lincoln y Patrimonio Familiar
Monterrey, NL.
Tel. 399-4300

INTRODUCCION:

1. Usted ha sido invitado a participar en un estudio de investigación clínica, que se llevará a cabo bajo la supervisión del Dr. Carlos Jerjes y un grupo de médicos del Hospital de Enfermedades Cardiovasculares y del Tórax núm. 34 del IMSS

2. Estoy enterado de que durante mi estancia en el servicio de urgencias se tomarán muestras de sangre para intentar determinar algunas sustancias que podrían ser útiles para entender mejor las enfermedades cardiovasculares.

3. Estoy consciente que estas muestras se toman en forma cotidiana a todo paciente que ingresa con una enfermedad cardíaca como la mía y que no representa ningún riesgo, no retrasa mi tratamiento y no interfiere en la evolución de mi enfermedad

Este estudio y sus procedimientos me han sido explicados a mi entera satisfacción, en mi propio idioma, y se me ha proporcionado una copia de este informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a mi entera satisfacción. Por lo tanto e decidido participar voluntariamente en este proyecto.

Nombre y firma del paciente

Fecha

Domicilio

Teléfono

Firma del Investigador (o quien él designe)

Fecha

Firma de un Testigo (1)

Fecha

Firma de un Testigo (2)

Fecha

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



PROTOCOLO:

**MARCADORES GENÉTICOS EN SINDROMES CORONARIOS AGUDOS Y SU RELACIÓN
CON EVENTOS CARDIOVASCULARES ADVERSOS**

Clave del Paciente: _____

Fecha: _____

Nombre del Paciente: _____

Cedula _____

Sexo: _____ Edad: _____ Peso: _____ Talla: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Teléfono de amigo: _____

MOTIVO DE INGRESO:

Angina inestable: _____

IAM previo: _____

Angina crónica: _____

Sano: _____

Lugar de envío y tratamiento: _____

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES

Antecedentes de SCA (SI) (NO) Quién: _____

Diabetes _____ Quién: _____

Hipertensión _____ Quién: _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Tabaquismo (NO) (SI) N° de años _____ N° de cigarrillos/día _____ Activo (SI) Inactivo desde hace _____

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Enfermedad	Año de Diagnóstico	Tratamiento	Evolución	Respuesta
Diabetes				
Hipertensión				
Tabaquismo				
Dislipidemia				
Menopausia				
Artritis reumatoide				
Obesidad				
Sedentarismo				
Otras				

COMENTARIOS:

DIAGNÓSTICO

SCA desnivel neg del segmento ST: _____

SCA con elevación del segmento ST: _____

Infarto anterior: _____

Infarto inferior: _____

Ventrículo derecho: _____

Kill y Kimball: _____

CUADRO CLÍNICO

Angina: _____ Equivalente: _____ Clase funcional: _____[®]

Presión arterial: _____ Frecuencia Cardíaca: _____ S3: _____

Soplo: _____ Crepitos: _____

ECG

Normal: _____ Ritmo sinusal: _____

ISQ Subepicardio: _____ ISQ Subendocardio: _____

< SST: _____ >SST: _____ Anterior: _____

Inferior: _____ Arritmia: _____ QS: _____

Bloq de Haz de Hiss: _____

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Generales:	Normal	Resultado
HB		
HTO		
Glucosa		
Colesterol		
Coagulación		
Antitrombina III	80-120%	
Proteína C activa (PC)	60-140%	
Proteína S	60-140%	
Resistencia a la proteína C (RPC)	>2.0	
Fibrinógeno	<350 mg/dl	
TP		
TPT		
Plaquetas		
Fibrinolisis		
Plasminógeno	80-120%	
Alfa2-antiplasmina (A2AP)	80-120%	
Inflamación		
Leucocitos	<9,000	
Proteína C Reactiva (PCR)	<3 mg/dl	
Linfocitos (%)		
Monocitos (%)		
Necrosis:		
CPK		
CPK-MB		
Función renal:		
Creatinina		
Urea		

ECOCARDIOGRAFIA

DDVI: _____ DSVI: _____ FE: _____
DISF/DIAST: _____ OTROS: _____

CATETERISMO

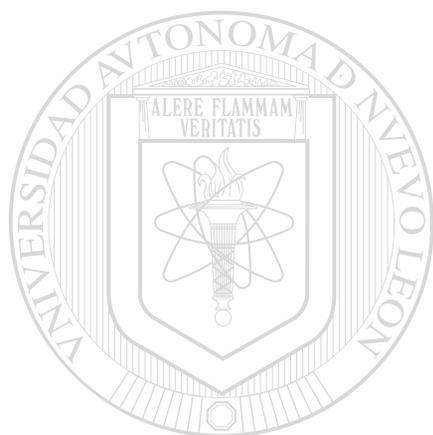
CATT: _____ VASOS: _____ TCI: _____
DA: _____ CD: _____ CX: _____
Obstrucción menor 70%: _____ Obstrucción mayor 70%: _____
D2VI: _____ Otros: _____

TRATAMIENTO

ESTABLECIDO: _____

EVOLUCION	Hospit.	30	90	150	210	270	330	360
Angina rec.								
IAM/RE-IAM								
CHOQUE								
ARRITMIA								
ACTP								
QX REVASC								
DEFUNCION								

DIAS-Esta Hospit: _____ DIAS Unid Cuida Coro: _____



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



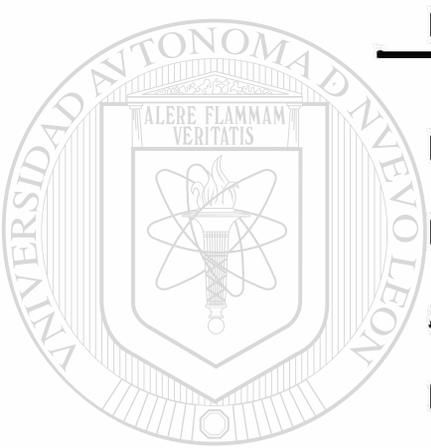
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Reacciones de las digestiones de los PA de los genes:

Con respecto a las condiciones de los corte enzimáticos, estos fueron muy variados con respecto a lo planteado en un principio, ya que para cada polimorfismo las concentraciones óptimas de los reactivos de corte y de la enzima fueron diferente para cada uno de ellos.

Digestión de los fragmentos del Fg:

Reacción de digestión para los polimorfismos -455 G/A y 148 C/T.



Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB2 10X	2.5 μ l (1.6X)
<i>Hae</i> III o <i>Hind</i> III	0.5 μ l (0.67U)
H ₂ O miliQ	2.0 μ l
Volumen final	15 μl

Las enzimas estaban a una concentración de 20 U/ μ l. Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs). Las enzimas se inactivaron a 65°C (*Hae* III) y a 80°C (*Hind* III) por 20 min.

Reacción de digestión para el polimorfismo +1689 T/G.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB4 10X	1.5 μ l (1X)
<i>Ava</i> II	0.6 μ l (0.6U)
H ₂ O miliQ	2.9 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 15 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y la enzima se inactivó a 65°C (20 min).

Reacción de digestión para el polimorfismo Taq I.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 μ l
NEB2 10X	1.5 μ l (1X)
<i>Msp I</i>	0.3 μ l (0.4U)
BSA 100X	1.5 μ l (10X)
H ₂ O miliQ	1.7 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 65°C (12 hrs) y se inactivaron a 80°C (20 min).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Reacción de digestión para el polimorfismo Bcl-1. ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Reactivos	Volumen μl
PA	20 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1X)
<i>Bcl-1</i>	0.5 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	2.0 μ l
Volumen final	25 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 50°C (12 hrs).

Digestión del polimorfismo G1691A:

Reacción de la digestión para el polimorfismo G1691A.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 μl
NEB2 10X	2.5 μl (1.7X)
<i>Mnl I</i>	0.6 μl (0.2U)
BSA 100X	1.0 μl (6.7X)
H ₂ O miliQ	0.9 μl
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 5 U/ μl . Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo R353Q:

Reacción de la digestión para el polimorfismo R353Q.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 μl
NEB2 10X	2.5 μl (1X)
<i>Msp I</i>	0.5 μl (0.5U)
H ₂ O miliQ	7 μl
Volumen final	20 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μl . Las reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo G20210A:

Reacción de digestión para el polimorfismo G20210A.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1X)
<i>Hind III</i>	0.3 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	2.2 μ l
Volumen final	15 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs) y se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión del polimorfismo PLA1/PLA2:

Reacción de digestión para el polimorfismos PLA1/PLA2.

Reactivos	Volumen μ l
PA	10 μ l
NEB3 10X	2.5 μ l (1.25X)
<i>Msp I</i>	0.3 μ l (0.3U)
H ₂ O miliQ	7.2 μ l
Volumen final	20 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacciones se incubaron a 37°C (12 hrs). La enzima se inactivó a 65°C (20 min).

Digestión de los polimorfismos G1059C y -717A/G:

Reacción de digestión para el polimorfismo G1059C.

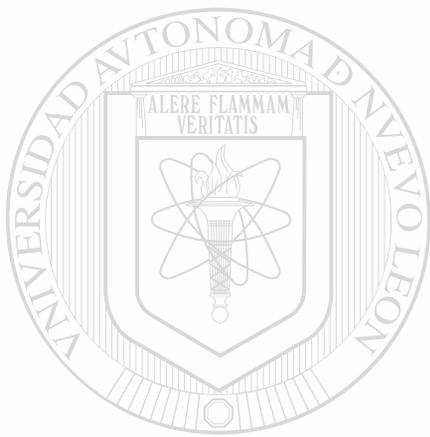
Reactivos	Volumen μl
PA	20 μ l
Buffer MaeIII	12.5 μ l (1.25X)
Mae III	0.5 μ l (0.07U)
H ₂ O miliQ	2 μ l
Volumen final	35 μl

La enzima estaba a una concentración de 5 U/ μ l. La reacción se incubó a 55°C (12 hrs).

Reacción de digestión para el polimorfismo -717A/G.

Reactivos	Volumen μl
PA	10 μ l
Neb 4	2.5 μ l (1X)
Sac II	0.5 μ l (0.4U)
H ₂ O miliQ	12 μ l
Volumen final	25 μl

La enzima estaba a una concentración de 20 U/ μ l. La reacción se incubó a 37°C (12 hrs) y la enzima se inactivó a 65°C (20 min).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1875