



DOCTORADO EN CIENCIAS PARA LA SALUD



***POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA
COMO MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN
POBLACIÓN CHIAPANECA
TESIS***

que para obtener el Grado de
DOCTORA EN CIENCIAS PARA LA SALUD

Presenta
SONIA ROSA ROBLERO OCHOA

DR. LUIS MIGUEL CANSECO ÁVILA
DIRECTOR

COMITÉ REVISOR
Dr. Sergio Domínguez Arrevillaga
Dr. Javier Aguilar Fuentes



TAPACHULA DE CÓRDOVA Y ORDOÑEZ. 2018



Universidad Autónoma de Chiapas

Centro Mesoamericano de Estudios en Salud Pública y Desastres
Área de Titulación

DOCTORADO EN CIENCIAS PARA LA SALUD
AUTORIZACIÓN/IMPRESIÓN DE TESIS



F-012-DCS

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; 24 de octubre de 2018
Oficio No. CEMESAD/CG/426/18

C. SONIA ROSA ROBLERO OCHOA
CANDIDATA AL GRADO DE DOCTORA
EN CIENCIAS PARA LA SALUD
PRESENTE

Por medio del presente, informo a Usted que una vez recibidos los votos aprobatorios de los miembros del Comité Tutorial de la tesis intitulada:

POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA PROTEINA C REACTIVA COMO MARCADORES
DE RIESGO CARDIOVASCAR EN POBLACION CHIAPANECA

Se le **AUTORIZA** que lleve a cabo la impresión definitiva de seis ejemplares de la misma y dos digitales (DC's), los cuales deberá entregar:

- | | |
|--|---|
| • Un CD con información de la tesis. | Dirección de Desarrollo Bibliotecario de la Universidad Autónoma de Chiapas |
| • Una tesis impresa | Biblioteca del CEMESAD |
| • Cinco tesis impresas y un CD con información de la tesis | Área de Titulación del CEMESAD para ser entregadas a los Sinodales. |

Se anexa oficio con los requisitos de entrega de tesis, emitido por la Dirección de Desarrollo Bibliotecario.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por la Conciencia de la Necesidad de Servir"

DR. GONZALO LÓPEZ AGUIRRE
COORDINADOR GENERAL
AUTONOMA
CENTRO MESOAMERICANO DE ESTUDIOS
EN SALUD PÚBLICA Y DESASTRES
COORDINACIÓN GENERAL

C.c.p. Expediente/archivo

Ciudad Universitaria Edificio "D", Carretera Ejido Emiliano Zapata Km. 8, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas C.P. 29076.
Tel: (961) 617 8000 ext. 8306 e-mail: titulacion.cemesad@unach.mx

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a DIOS, porque cada uno de mis logros es gracias a su apoyo infinito y esta tesis es una gran bendición. Te agradezco Dios todo lo que soy.

A mi madre por ser el ejemplo de ser una mujer valiente. Te amo mamá

A Tomás, por ser el principal motor de mi vida. Gracias hijo por ser la fuente de mi esfuerzo. Gracias por entender el significado del sacrificio y por estar siempre presente a mi lado.

Al doctor Luis Miguel Canseco Ávula, director de la tesis, por aceptarme en colaborar en su proyecto, en el desarrollo y culminación de la tesis. Gracias Doctor.

Al maestro Eleazar Serrano, por el apoyo brindado en el laboratorio de Biología Molecular.

A todos los que hicieron posible la realización de esta tesis.

Contenido

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	1
INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	5
I. MARCO TEÓRICO.....	8
1.1. Epidemiología	8
1.2. Síndrome coronario agudo (SCA)	10
1.3. Fisiopatología de SCA.....	12
1.4. Proceso inflamatorio.....	13
1.5. Ruptura y trombosis de la placa ateromatosa	14
1.6. Proteína C reactiva	16
1.7. El papel de PCR en la aterosclerosis	19
1.8. La PCR y su asociación con enfermedad cardiovascular	20
1.9. Gen de la proteína C reactiva	21
1.10. Polimorfismos genéticos.....	22
1.11. Polimorfismos en el gen de la proteína C reactiva	23
II. ANTECEDENTES	26
V. OBJETIVOS.....	29
5.1. OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
VII. METODOLOGÍA	30
VIII. RESULTADOS	34
IX. DISCUSIÓN	46
X. CONCLUSIÓN	50
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XII. ANEXOS	63

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

SCA	Síndrome coronario agudo
PCR	Proteína C reactiva
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
OMS	Organización Mundial de la Salud
ECV	Enfermedades cardiovasculares
AVC	Accidentes cerebrovasculares
AI	Angina inestable
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
MS	Muerte súbita
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
EIC	Enfermedades isquémicas del corazón
INEGI	Instituto Nacional de estadística y Geografía
SCACEST	Síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST
SCASEST	Síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST
LDL	Lipoproteína de baja densidad
ROS	Especies reactivas de oxígeno
O ²⁻	Ion superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
OH-	Ion hidróxilo
HOCl	Ion hipoclorito
LDL _{ox}	LDL oxidada
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOS	Óxido nítrico sintetasa
ON	Óxido nítrico
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
SICA	Síndrome isquémico coronario agudo
IL	Interleucina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN-γ	Interferón gamma
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
kDa	Kilodalton
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
CE	Células endoteliales
CML	Células musculares lisas
ARN _m	Ácido ribonucleico mensajero
LOX-1	Receptor 1 para LDL _{ox}
TF	Factor tisular
MMP	Metaloproteína de matriz
ADN	Ácido desoxirribonucleico

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Tabla	Título	Página
8.1	Lugar de procedencia de la población de estudio	34
8.2	Características clínicas y demográficas de la población de estudio	35
8.3	Frecuencia Genotípica del SNP rs1205 (3872 G/A)	36
8.4	Frecuencia Alélica del SNP rs1205 (3872 G/A)	36
8.5	Análisis estadístico de asociación del SNP rs1205 (3872 G/A)	37
8.6	Frecuencia Genotípica del SNP rs2808630 (5237 A/G)	37
8.7	Frecuencia Alélica del SNP rs2808630 (5237 A/G)	38
8.8	Análisis estadístico de asociación del SNP rs2808630 (5237 A/G)	38
8.9	Frecuencia Genotípica del SNP rs1800947 PCR (2667 C/G)	39
8.10	Frecuencia Alélica del SNP <i>rs1800947 PCR</i> (2667 C/G)	39
8.11	Análisis estadístico de asociación del SNP rs1800947 PCR (2667 C/G)	39
8.12	Modelo de regresión Logística para SNP 2667 C/G ajustado por variables clínicas y patológicas	40
8.13	Frecuencia Genotípica del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)	40
8.14	Frecuencia Alélica del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)	40
8.15	Análisis estadístico de asociación del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)	41
8.16	Frecuencia de haplotipos en la población de estudio	41
8.17	Asociación de haplotipos con SCA	42
8.18	Relación del SNP 5237A/G con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante.	43
8.19	Relación del SNP 3872G/A con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante	44
8.20	Relación del SNP 2667 A/C con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante	45
8.21	Relación del SNP 3006 A/C con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante	45
8.22	Frecuencia genotípica a nivel mundial	48
8.23	Frecuencia alélica a nivel mundial	48
Figura		
1	Formación de la aterosclerosis	16
2	Estructura pentamérica de la PCR	17
3	Localización y composición del Gen de PCR	22
4	Algunos SNP en el Gen de PCR estudiados	24
Gráficas		
1	Algunas causas de mortalidad en México, 1938-2016, tasas por 100 mil habitantes	9
2	Desequilibrio de enlace de los polimorfismos estudiados	42

RESUMEN

Los síndromes coronarios agudos (SCA), como el infarto agudo de miocardio y la angina inestable, a nivel mundial son los principales responsables de la mortalidad por cardiopatía isquémica, de manera directa o indirecta; originados por la formación de un trombo oclusivo, cuya causa más frecuente es la aparición de una fisura en la cápsula fibrosa de las lesiones ateroscleróticas. Se ha establecido una clara relación entre la presencia de actividad inflamatoria en las placas y la aparición de SCA.

El SCA es un padecimiento de etiología multifactorial en cuyo desencadenamiento participan factores ambientales y genéticos. Los estudios sobre factores genéticos implicados son limitados y en algunos casos controversiales. Uno de los marcadores inflamatorios más importante y que predice riesgos cardiovasculares futuros es la proteína C reactiva (PCR), por lo que es relevante estudiar si ciertos polimorfismos genéticos en el gen de dicha proteína se asocian en el desarrollo de SCA. El objetivo del proyecto es determinar la frecuencia y asociación de los polimorfismos en el gen de la PCR como marcador de riesgo cardiovascular.

El estudio fue de casos y controles, se incluyeron pacientes diagnosticados con enfermedad cardiovascular proveniente de todas las regiones del estado de Chiapas y que fueron admitidos en el Hospital Regional de Alta Especialidad *Ciudad Salud* en la Ciudad de Tapachula Chiapas. La presencia de los polimorfismos del gen de la proteína C reactiva se detectó por el método de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en su modalidad de discriminación alélica. Los datos fueron procesados en una base de datos con el paquete estadístico de Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) en su versión 18; los análisis de asociación de genotipos y haplotipos se realizaron con SNPStats. Nuestros resultados demostraron que los que portan el genotipo C/C del SNP 2667 tienen una probabilidad de 209 veces de sufrir SCA y los que portan el genotipo A/C de SNP 3006, tienen 2.31 veces de sufrir esta patología; sin embargo los portadores del SNP 3872

tienen un riesgo protector y el SNP 5237 no estuvo asociado con este síndrome. Los portadores del haplotipo GTCC presentan un riesgo de 6.72 veces de sufrir SCA. En conclusión se obtuvo asociación con el genotipo C/C del SNP 2667 y con el genotipo A/C del SNP 3006 con el desarrollo de síndrome coronario agudo. No se observó asociación con el SNP 5237 y con el SNP 3872 se obtuvo un efecto protector.

Palabras Clave: Síndrome coronario agudo, variantes genéticas, proteína C reactiva.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo; 7,4 millones de esas muertes se debieron a cardiopatía coronaria y 6,7 millones a accidentes cerebrovasculares (AVC). Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015).

En México, las enfermedades del corazón constituyen la segunda causa de muerte de la población general con una tasa de 64 por cada 100,000 habitantes durante el 2014.

El síndrome coronario agudo (SCA) incluye tres entidades clínicas, de acuerdo a la graduación del proceso fisiopatológico en el que la placa aterosclerótica complicada provoca el inicio de las manifestaciones isquémicas, que son la angina inestable (AI), el infarto agudo de miocardio (IAM) y la muerte súbita (MS).

Con frecuencia, el IAM representa la primera manifestación de una complicación aterosclerótica. Por lo tanto, la prevención primaria basada en la detección y tratamiento de los factores de riesgo tradicionales es fundamental para evitar este tipo de eventos perjudiciales.

También diversos estudios han demostrado que la inflamación desempeña un papel fundamental en el proceso aterosclerótico, desde la disfunción endotelial y en todas las etapas de la acumulación de placa aterosclerótica, hasta sus perjudiciales complicaciones isquémicas clínicas. La PCR se ha utilizado como un marcador sistémico altamente sensible de inflamación y daño tisular. En las reacciones de fase aguda del proceso inflamatorio, como en el caso de una infección o lesión tisular extensa, la PCR se eleva en un rango de 10,000 veces en 6 horas y tiene niveles máximos a 48 horas, debido a su síntesis hepática de *novo*, la cual es regulada por citocinas proinflamatorias, como

Interleucina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa. (Torzewski, 2005; Zimmermann, Zaczekiewicz, Graf, Liu, & Torzewski, 2014).

El SCA es un padecimiento de etiología multifactorial como muchas enfermedades, en cuyo desencadenamiento participan factores ambientales y genéticos. Los nuevos conocimientos y el desarrollo actual de la medicina genómica han permitido evaluar el papel que desempeña el componente genético en diversas patologías, destacando en el caso de SCA el papel que desempeñan los diversos polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) en la proteína C reactiva, como marcador de riesgo cardiovascular.

En diferentes estudios se ha documentado que existe una asociación significativa entre los genotipos de PCR y las concentraciones de la misma, y las estimaciones de heredabilidad para las concentraciones basales son entre el 35% y el 40% (Kathiresan et al, 2006). También algunos polimorfismos genéticos en el gen de la PCR se han asociado con cambios en los niveles plasmáticos y enfermedades cardiovasculares en diferentes poblaciones. (Carlson et al, 2005; Crawford et al, 2006; Miller et al, 2005; Kettunen et al, 2011; Lange, 2006; Perry, 2009 y Chen, 2015).

Por lo anteriormente expuesto, el propósito de este trabajo, fue determinar la frecuencia y asociación de los polimorfismos en el gen de la PCR como marcador de riesgo cardiovascular en pacientes que fueron atendidos en el Hospital de alta especialidad *Ciudad Salud* en la Ciudad de Tapachula Chiapas, previamente diagnosticados con síndrome coronario agudo. Los objetivos que se plantearon fueron determinar las variables clínicas y demográficas, genotipificar los polimorfismos en el gen de la PCR y determinar la asociación tanto de las variables clínicas como de los polimorfismos en la población de estudio.

La estructura del documento cumple con los lineamientos del programa doctoral y contiene los puntos más relevantes de un proyecto de calidad aceptable. En primer término se presenta un Resumen del trabajo, que incluye parte de los antecedentes y justificación, la metodología utilizada y los posibles aportes y beneficios de la investigación. A

continuación se presenta la Introducción, que aborda la importancia de realizar la investigación y describe la estructura del documento. El Marco Teórico comprende aspectos conceptuales sobre síndrome coronario agudo, epidemiología, proteína C reactiva y los polimorfismos estudiados, antecedentes de estudios realizados sobre la asociación de los polimorfismos de la proteína C reactiva y la enfermedad. Posteriormente continúa el Planteamiento del Problema que se pretende dar respuesta y la justificación o los motivos que justifican la realización del estudio. Después se redacta los objetivos general y específicos del estudio. Se continúa con todo detalle la metodología empleada en la realización del estudio, como son diseño metodológico, tamaño de muestra, métodos, instrumento de medición y análisis estadístico del estudio que permitirán obtener los resultados esperados, presentando los principales hallazgos y aportaciones obtenidos.

I. MARCO TEÓRICO

1.1. Epidemiología

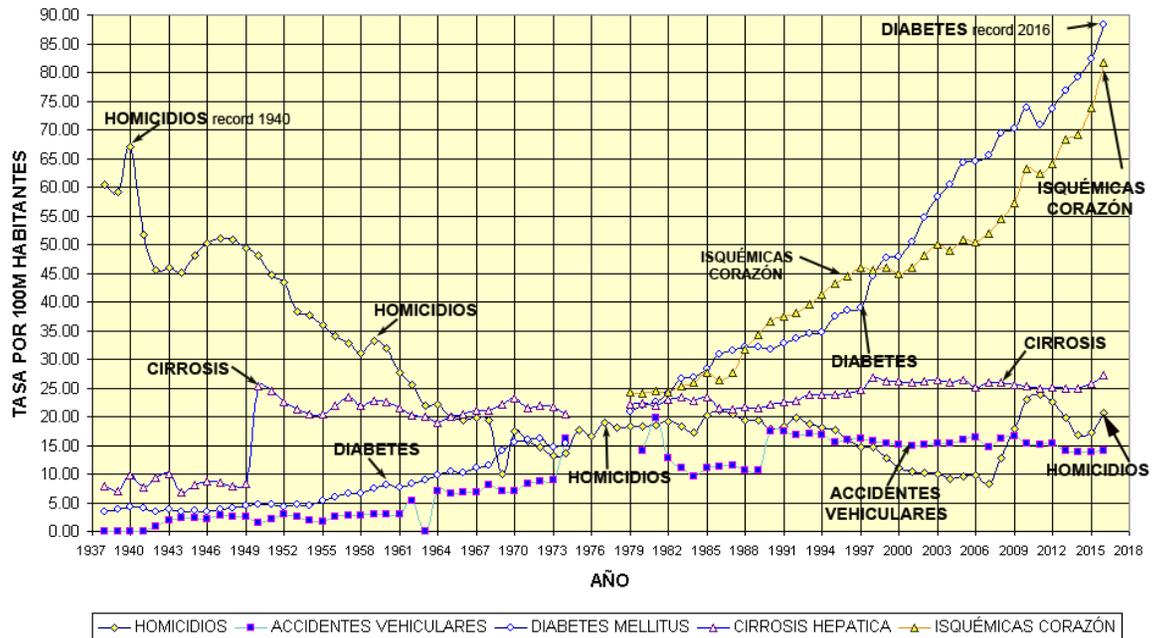
La OMS calcula que a nivel mundial en 2030 morirán cerca de 23,3 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y AVC, y se prevé que seguirán siendo la principal causa de muerte (OMS, 2015).

América Latina no difiere mucho de estas cifras, para el primer decenio del siglo XXI se calculan cerca de 20,7 millones de defunciones por estas causas. En el año 2005, el 31% de todas las defunciones ocurridas en América Latina y el Caribe pudieron atribuirse a estas enfermedades (Pereira, Peñaranda, Reyes, Caceres, y Cañizarez, 2015, Borges, Jardines y Borges, 2016).

Según los pronósticos, en los próximos dos decenios, la mortalidad por cardiopatía isquémica aumentará cerca de tres veces (Pereira, 2015).

Las enfermedades isquémicas del corazón (EIC) ocupan el segundo lugar como causa de mortalidad general en México y fue causa de 82,334 decesos durante 2014, se encuentra apenas por debajo de la diabetes mellitus, que ocupa el primer lugar (Aguirre Botello M, 2018)

Gráfica 1. Algunas causas de mortalidad en México, 1938-2016, tasas por 100 mil habitantes



Recuperado de Aguirre Botello M, recopilación datos de INEGI, OMS y SINAIS, 2018

En Chiapas, los reportes de 2011 indican que las enfermedades isquémicas del corazón son la tercera causa de muerte en la población menor de 59 años. En la población mayor de 60 años la mayoría de las defunciones se producen por enfermedades crónico degenerativas. En los hombres, las enfermedades isquémicas del corazón (14.3%), son la primer causa de muerte y en las mujeres ocupan el segundo lugar (12.6%) seguida de las enfermedades cerebrovasculares (6.9%) (INEGI, 2011).

Las causas más importantes de cardiopatía y AVC son una dieta malsana, la inactividad física y la obesidad, hipertensión arterial, diabetes, consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Estos factores de riesgo modificables son responsables de aproximadamente un 80% de los casos de cardiopatía coronaria y enfermedad cerebrovascular; pero también se encuentran los factores de riesgo no modificables como edad, sexo y la carga genética (Parmet, Glass, y Glass, 2004).

1.2. Síndrome coronario agudo (SCA)

Para desempeñar su función correctamente, el músculo cardíaco necesita un aporte continuo de oxígeno, que consigue a través de las arterias coronarias.

El SCA es un conjunto de manifestaciones de cardiopatía isquémica o insuficiencia coronaria, que tienen como causa común la disminución del aporte de sangre al miocardio como consecuencia de la obstrucción parcial o total de las arterias coronarias, generalmente causada por placas de ateroma o por la trombosis provocada por su rotura (Vilariño, Esper y Badimon, 2004, Montero, 2010, Sandoval, et al, 2016).

La enfermedad coronaria implica un estrechamiento de estas arterias causado por la formación de las placas de ateroma, unos depósitos de naturaleza lipídica que provocan el engrosamiento y endurecimiento de la pared vascular (Parmet, et al, 2004). La acumulación de estos depósitos lipídicos es una patología vascular, normalmente asociada a la edad, conocida como aterosclerosis. En determinadas circunstancias, la placa de ateroma puede debilitarse y llegar a romperse (placas vulnerables), lo que origina la formación de un trombo que puede llegar a bloquear la luz arterial, provocando una isquemia que es la causa de los SCA.

Comprende tres grupos de afecciones: angina de pecho inestable, cuando la isquemia no llega a provocar necrosis en el tejido miocárdico; el infarto agudo de miocardio con o sin elevación del segmento T en un electrocardiograma, cuando la isquemia produce necrosis en una porción del miocardio; y la muerte súbita cuando los impulsos eléctricos del corazón se alteran (taquicardia y/o fibrilación ventricular) provocando el paro cardíaco (Vidán, 1988).

La clínica producida por las distintas afecciones del SCA es muy similar y para establecer diagnóstico diferencial se requiere un electrocardiograma que permitirá dividir a los pacientes afectados de SCA en dos grupos:

— Con elevación del segmento ST (SCACEST).

— Sin elevación del segmento ST (SCASEST).

Dependiendo de la elevación o no de marcadores de necrosis miocárdica hablaremos de infarto propiamente dicho o bien de angina inestable. A su vez los infartos pueden o no presentar onda Q de necrosis residual, quedando, por lo tanto, la clasificación como sigue:

SCACEST: - IAM Q sobre todo / IAM no Q menos frecuente.

SCASEST: - IAM no Q sobre todo / IAM Q menos frecuente.

De acuerdo con el tiempo de duración de la obstrucción trombótica y a la pérdida de irrigación miocárdica se desencadenará una serie de alteraciones. Estas alteraciones se observarán inicialmente a nivel de los miocitos y promoverán un franco deterioro con desastrosas consecuencias a nivel de la anatomía regional y parietal cardíaca con desarreglos hemodinámicos e interacciones compensadoras a nivel neurohormonal. La situación en que se presenta la angina inestable no parece relacionada con un mayor trabajo cardíaco. Es decir, la isquemia miocárdica no parece justificarse por un mayor consumo miocárdico de oxígeno y, por lo tanto, la causa es una disminución aguda del flujo sanguíneo coronario (Vilariño, et al, 2004).

La rotura de la placa va seguida de una hemorragia intralesional a través de su superficie rota y una trombosis intraluminal que provoca crecimiento rápido de ésta, lo que da lugar a la progresión brusca de la lesión coronaria. Otro mecanismo que contribuye a esta progresión aguda podría ser la proliferación acelerada de células musculares lisas y el aumento de matriz, consecuencia de mecanismos inflamatorios superficiales, denudación endotelial, adherencia y degranulación de las plaquetas y factores de crecimiento sanguíneos. La presencia clínica y el resultado dependen de la intensidad y la duración de la isquemia.

El SCA es por tanto, consecuencia de un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno a nivel del miocardio y suele producirse por una reducción aguda o subaguda de dicho aporte debido a la disrupción de una placa aterosclerótica asociada a fenómenos inflamatorios, trombosis, vasoconstricción y microembolización.

1.3. Fisiopatología de SCA

En condiciones normales el endotelio, es un órgano de un trillón de células que producen más de 60 moléculas, las cuales contribuyen a la homeostasis y la hemostasis vascular mediante la regulación de la vasodilatación arterial, la inflamación y proliferación celular, y la modulación de la trombosis-fibrinólisis.

Actualmente se considera que la inflamación juega un papel importante en el desarrollo del SCA. Muchas observaciones han demostrado que es la responsable de la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, por lo que ahora ésta se considera una enfermedad inflamatoria.

Diversos estudios han demostrado que la aterosclerosis inicia con la hipercolesterolemia compuesta en su mayoría por lipoproteína de baja densidad (LDL), causando una activación focal en el endotelio y espacio subendotelial de las arterias coronarias (Pankow, 2001).

La hipercolesterolemia provoca la infiltración y retención de LDL en la íntima arterial que inicia una respuesta inflamatoria en la pared arterial, provocando la disfunción endotelial (Stroes, y Rabelink, 1997). El proceso inflamatorio inicia con la oxidación de las LDL, en la cual, el endotelio, las células del músculo liso, macrófagos y la matriz extracelular tienen un papel importante, ya que se consideran fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el ion superóxido (O_2^-) (Harrison, 1997). También durante la fagocitosis se producen otros ROS como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ion hidróxilo (OH^-) y iones hipoclorito ($HOCl$). Las LDL oxidadas (LDL_{ox}) son transportadas a través del endotelio hacia la pared arterial, desencadenándose una inflamación aguda con liberación de moléculas que dan lugar a un evento isquémico coronario agudo. (Vargas et al, 2011)

Asimismo, otro mecanismo que se activa es el complejo NADPH oxidasa, tal vez la mayor fuente de O_2^- , observado en estudios de cultivo celular y en modelos animales que han evidenciado el papel de la NADPH oxidasa en el proceso aterosclerótico, ya que se encuentra aumentada la concentración de NADPH oxidasa y de O_2^- .

La LDLox tiene diferentes acciones, se ha visto que altera la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS), provocando una disminución de la producción de óxido nítrico (ON), un importante vasodilatador que disminuye la expresión de moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), además de mantener el tono vascular adecuado. Asimismo, la LDLox también puede activar al factor nuclear de transcripción NFkB estimulando la producción de la MCP-1 y al factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). La LDL contiene una lisofosfatídil colina que induce la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y selectinas E y P, entre otras que se exponen en el endotelio, que participan en la adhesión, rodamiento y migración del monocito hacia el espacio subendotelial.

Por otro lado, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que aumenta en la hipercolesterolemia, produce una inactivación oxidativa del ON, produciendo un potente peroxi-nitrito (ONOO-), que en concentraciones elevadas es tóxico para las células endoteliales, provocando una disfunción endotelial (Anderson, 1999).

Se trata de un estado particular de activación endotelial, que se caracteriza por un proceso proinflamatorio, proliferativo y procoagulante que favorece la aterogénesis (Ross, 1999).

1.4. Proceso inflamatorio

Actualmente se acepta que la aterogénesis es una respuesta inflamatoria a las LDL que se han depositado en el subendotelio y a la presencia de otros factores de riesgo coronario (Libby, Ridker, y Maseri, 2002, Skalen, 2002). Aunque al inicio se trata de un mecanismo de defensa del endotelio, finalmente contribuye a la generación y el desarrollo de la lesión ateromatosa. La presencia de LDLox en el espacio subendotelial induce en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión y de mediadores quimiotácticos capaces de atraer diversas células inflamatorias (Libby, 2002). Los monocitos circulantes, atraídos por estas proteínas quimiotácticas, abandonan el espacio vascular, se unen a las células endoteliales y migran a la íntima donde se diferencian a macrófagos, en respuesta al factor

estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). A continuación los macrófagos se cargan de lípidos, transformándose en células espumosas, asociadas a la aparición de las estrías grasas (Li y Glas, 2002, Barderas et al, 2004, Gonzalez-Barderas, et al, 2004, y Hansson G.K y Libby P. 2006). Finalmente, la lesión progresa con la participación de otras células, particularmente las musculares lisas, que segregan diversos componentes de la matriz extracelular para formar una cubierta fibrosa sobre el núcleo lipídico, más o menos vulnerable a la rotura, conocida como placa de ateroma (Skalen, 2002).

Las citocinas liberadas por las células inflamatorias activadas tienen el potencial de activar el endotelio y transformar sus propiedades anti adhesivas y anticoagulantes en propiedades adhesivas y pro coagulantes, desempeñando así un papel importante en el desarrollo de los procesos trombóticos.

1.5. Ruptura y trombosis de la placa ateromatosa

La causa más frecuente de la complicación de la placa de ateroma es la aparición de una fisura o incluso de una rotura en la cápsula fibrosa, ya que pone en contacto la sangre con su núcleo lipídico que es rico en factor tisular (proteína que activa la vía extrínseca de la cascada de la coagulación). De este modo se desencadenará la trombosis, favorecida por la disfunción del endotelio vascular que habrá perdido su capacidad antitrombótica (Hoekstra, et al, 2006).

En los últimos años se ha demostrado que la inflamación juega un papel esencial en la rotura de la placa (Skalen, 2002). Así, se ha observado que las placas inestables presentan infiltración de macrófagos, linfocitos T y células musculares lisas activadas con mucha mayor frecuencia que las estables (Libby, 2002; Skalen, 2002). La hipótesis más aceptada es que los macrófagos (derivados de monocitos circulantes) degradarían la matriz extracelular de la cápsula fibrosa por fagocitosis o secreción de enzimas proteolíticas (metaloproteinasas), debilitando la cubierta de la placa de ateroma. Por otra parte, se ha sugerido que la apoptosis podría también favorecer la trombosis, ya que afectaría a los

macrófagos, provocando la liberación de las metaloproteinasas y del factor tisular y también a las células musculares lisas, responsables de la síntesis de proteínas de matriz extracelular que confieren resistencia a la cápsula (Arce-Torres, 2008, Bauriedel et al, 1994). Todo ello en conjunto debilitaría aún más la placa y podría desencadenar su ruptura por las fuerzas hemodinámicas a que está sometida (Falk, Shah y Fuster, 1995, Matrisian, 1992, Davies, 1996, Mori, 1995).

La rotura de la placa de ateroma promueve la liberación de diferentes factores pro inflamatorios, como son la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) por las células endoteliales y leucocitos activados; localmente estimula la producción de reactantes de fase aguda en el ámbito sistémico, como la proteína C reactiva (PCR), fibrinógeno y amiloide A del suero (Tremoli et al, 1993), que se correlacionan con el desarrollo de enfermedad arterial coronaria y su severidad (Libby, 2002, Zakynthinos y Pappa, 2009).

En las últimas décadas varios estudios han demostrado que el proceso inflamatorio es importante en el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo (SICA) y en eventos inflamatorios, en especial las citocinas pro y anti-inflamatorias como la IL-1, la IL-6, la IL-10, el TNF- α , el IFN- δ y el TGF- β que inducen la producción de las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva), regulan y/o activan el proceso inflamatorio. Diversos estudios han reportado varios polimorfismos ubicados en genes que codifican para estas moléculas y que podrían estar participando como marcadores de susceptibilidad para el desarrollo del SICA.

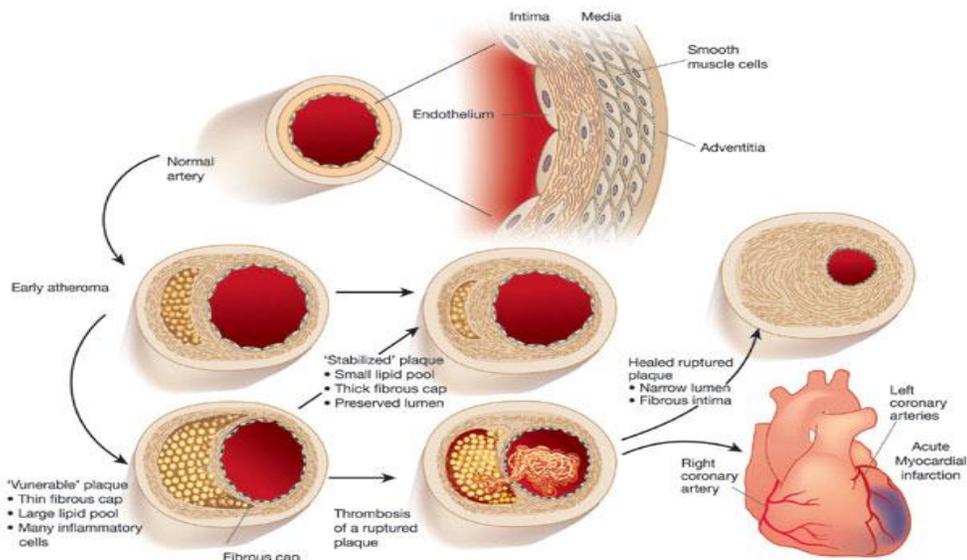


Figura 1. Formación de la aterosclerosis.
 Recuperado de Libby, P. Nature. 2002.

1.6. Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR) fue descubierta en 1930 por Tillet Y Francis en pacientes con neumonía aguda producida por neumococos. Fue la primera proteína de fase aguda descubierta. Su nombre deriva de su capacidad para precipitar al polisacárido somático C del *Streptococcus pneumoniae*. La PCR forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular por infecciones, inflamación o neoplasias. Es sintetizada por hepatocitos y células del endotelio vascular y su expresión está regulada por citocinas, particularmente por la IL-6 y en menor grado la IL-1 y el TNF- α (Nordestgaard y Zacho, 2009, Amezcua-Guerra, 2007, Barba, 2007).

La PCR pertenece a una familia de proteínas pentaméricas dependientes de calcio llamadas pentraxinas. Se produce como monómero pero la molécula funcional está compuesta por cinco subunidades polipeptídicas de 23 kDa idénticas asociadas de manera no covalente en una configuración anular con simetría cíclica, con un peso molecular total

de 118 kDa. En condiciones fisiológicas es muy resistente a la proteólisis (Thompson et al, 1999).

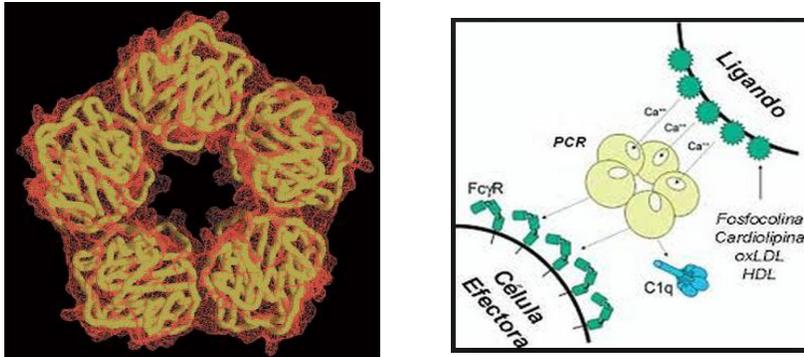


Figura 2. Estructura pentamérica de la PCR. Recuperado de Ledue, T.B., y Rifai, N., 2003

La PCR se une con gran afinidad a una amplia variedad de ligandos tanto autólogos (lipoproteínas plasmáticas nativas y modificadas membranas celulares dañadas, residuos de fosfatidilcolina, histonas, cromatina, ribonucleoproteínas pequeñas y células apoptóticas) como extrínsecos (glucanos, fosfolípidos y otros componentes somáticos y capsulares de bacterias, hongos y parásitos) mediante la unión principalmente a los residuos de fosfocolina expresadas en la superficie de estos microbios (Casas et al, 2008). La PCR se une a células dañadas o muertas, pero no a la superficie de células vivas saludables. También se une a células apoptóticas, LDL oxidada, LDL modificada, y VLDL, así como al factor activador de plaquetas (Koenig, 2013, Yasojima, 2001).

Hay evidencias recientes que sugieren que la PCR también se produce en las lesiones ateroscleróticas, especialmente por células endoteliales (CE), células musculares lisas (CML) y macrófagos. Se han encontrado niveles de RNAm de PCR en la placa de ateroma 10 veces mayores que en el vaso normal (Gershov et al, 2000).

Cuando la PCR está unida a ligandos macromoleculares, es reconocida por C1q y activa la vía clásica del complemento, adicionalmente, provee sitios de unión para el factor H regulando la amplificación de la vía alterna y a las convertasas de C5; por otro lado inhibe el ensamblaje de los componentes terminales del complemento (C5-C9), atenuando la formación del complejo de ataque a la membrana y limitando la lisis celular por esta vía

(Kramer et al, 2008) . También es capaz de unirse a complejos inmunes y facilitar la depuración de detritus solubles y partículas apoptóticas al ser reconocida por receptores para la IgG sobre los macrófagos activados, que producen el factor de crecimiento transformante β , que inhibe el desarrollo de respuesta inmune adaptativa (Thompson et al, 1999).

La síntesis de *novo* de la PCR principia a las 6 horas después de iniciado el estímulo inflamatorio y alcanza su máximo a las 24-72 horas. Su vida media es relativamente corta (19 horas) pero su concentración plasmática es constante bajo cualquier condición y no se modifica con la ingestión de alimentos ni presenta variación circadiana. Una vez finalizado el estímulo de IL-6, la PCR regresa a valores normales al cabo de 7 días, lo que refleja en forma directa la intensidad de los procesos patológicos que estimularon su síntesis (Ridker, 2003). A diferencia de otras proteínas de fase aguda sus niveles permanecen estables por largos períodos en ausencia de un nuevo estímulo (Nordestgaard y Zacho, 2009).

La concentración media de la PCR en donadores sanos es de 0.8 mg/dL, pero después de un estímulo inductor, esta proteína puede incrementar su producción más de 10,000 veces.

Empleando métodos de detección de alta sensibilidad, la distribución de PCR es muy similar entre géneros y grupos étnicos. Los valores séricos de PCR pueden interpretarse como < 1 , 1 a 3 y > 3 mg/L, lo que indica grupos de *Bajo*, *Moderado* y *Alto* riesgo para desarrollar eventos coronarios agudos a futuro (Jialal, Devaraj y Venugopal, 2004).⁵⁹ En general, cuando la PCR es < 10 mg/L traduce procesos inflamatorios leves como gingivitis, angina o ejercicio vigoroso. Elevaciones moderadas (10-100 mg/L) se encuentran en el infarto agudo del miocardio, la pancreatitis, las infecciones de mucosas (bronquitis, cistitis) y en la mayoría de las enfermedades reumáticas. Una concentración mayor de 100 mg/L se encuentra en las infecciones bacterianas agudas graves (como en la sepsis), traumatismos mayores (incluyendo quemaduras extensas) o vasculitis sistémica (Thompson et al, 1999).

1.7. El papel de PCR en la aterosclerosis

La PCR no es solamente un marcador inflamatorio, sino que hay estudios que sugieren que participa directamente en el proceso inflamatorio de aterogénesis (Nordestgaard y Zacho, 2009).

Aunque todavía hay controversia sobre si la PCR pueda estar involucrada directamente en el proceso aterosclerótico, una serie de estudios *in vitro* y en animales sugieren un papel proaterogénico de PCR. Existen mecanismos que han dilucidado el papel de la PCR en la disminución de la sintasa de óxido nítrico endotelial, un aumento en la expresión de LOX-1 (receptor para LDLox) que tienen un efecto perjudicial sobre la función endotelial e incrementa el efecto pro-inflamatorio inducido por la angiotensina II. También se ha demostrado que afecta el número y la función de las células progenitoras endoteliales mediante la promoción de la apoptosis y la atenuación de sus capacidades en su migración y adherencia. Por otra parte, se ha relacionado a la PCR a un estado protrombótico mediante la estimulación del factor tisular (TF) liberado de las células endoteliales de musculo liso, aumento de la actividad del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI)-1 con una reducción concomitante del activador tisular del plasminógeno (t-PA) que resulta en el deterioro general de la fibrinólisis. Además, también se visto que aumenta la síntesis de metaloproteínas de matriz (MMP) con un aumento consecutivo en la degradación de colágeno en los monocitos-macrófagos. Finalmente, la PCR activa el sistema del complemento, dando como resultado un aumento significativo en el tamaño del infarto en varios modelos animales, así como en los seres humanos.

Estudios realizados en ratones deficientes en apolipoproteína-E, demuestran una aceleración de la progresión de la aterosclerosis, que sugiere la participación directa de la PCR en la aterogénesis y su presencia en las lesiones ateroscleróticas, pero no en la pared vascular normal. Por último, se ha demostrado que la PCR podría estar implicada en la captación de LDLox por los macrófagos, convirtiéndolas en células espumosas, un paso

más crítico en la aterogénesis (Devaraj, Singh y Jialal, 2009a, Devaraj, Singh y Jialal, 2009b).

Sin embargo, varios experimentos controlados cuidadosamente diseñados por varios grupos, han demostrado que la PCR ejerce efectos pro-aterogénicos tanto in vitro como en los seres humanos. Por ejemplo, Devaraj, Singh y Jialal, (2009), demostraron que la desnaturalización de la PCR inducida por calor abolió los efectos proaterogénicos. Además, Bisioendial, Kastelein, y Levels, (2005) observaron que la infusión de la PCR induce la inflamación y activa la coagulación en los seres humanos. Por lo tanto, es posible que las alteraciones en la concentración de la PCR sérica, además de reflejar la vulnerabilidad de las lesiones aterosclerosas, participen directamente en su formación y ruptura.

1.8. La PCR y su asociación con enfermedad cardiovascular

La relación existente entre los niveles basales de PCR y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares ha sido consistente entre estudios. Diversos estudios epidemiológicos han mostrado que los niveles séricos de PCR tienen valores predictivo para el desarrollo de síndromes coronarios agudos, eventos vasculares cerebrales, enfermedad arterial periférica y muerte súbita cardíaca.

En algunos estudios han localizado a la PCR en la placa aterosclerótica y han sugerido que juega un papel importante en la vulnerabilidad de la placa y en la patogénesis de angina inestable, así como en la restenosis después de una intervención coronaria. Se ha encontrado que los niveles de PCR están relacionados a factores de riesgo cardiovascular tales como, obesidad, tabaquismo, presión sanguínea, nivel de triglicéridos, apolipoproteína B, glucosa sanguínea en ayuno y fibrinógeno e inversamente a los niveles de colesterol HDL, tanto en niños como en adultos (Yasojima, Schwab y McGeer, 2001).

Muchos estudios muestran independencia de estos factores con el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares y los niveles basales de PCR. Más aún, su valor predictivo se mantiene hasta por 20 años después de la primera determinación de PCR (Barba, 2007).

En infartos de miocardio, se ha visto que los niveles de PCR están asociados con el tamaño del infarto y se relaciona con la presencia de ruptura de la placa y al incremento de la temperatura de las placas coronarias inestables. Sin embargo en estudios realizados en pacientes con angina estable, inestable e infarto agudo de miocardio, se encontró que el riesgo significativo es mayor en pacientes con angina estable e inestable (1.8 y 2.7, respectivamente) y menor (1.0) para infarto agudo de miocardio (Nordestgaard y Zacho, 2009).

Después de un infarto agudo de miocardio, los niveles séricos de la PCR se elevan rápidamente, reflejando la extensión de la necrosis. Los niveles máximos alcanzados a las 48 horas del evento agudo son útiles como factor pronóstico de la evolución de estos pacientes (Lagrand, 1997). Se ha demostrado que la PCR se deposita con fracciones activadas del complemento dentro de las zonas de infarto agudo, contribuyendo ambas a la gravedad de la lesión isquémica (Griselli, M, et al., 1999, Kushner, Rzewnicki, y Samols, 2006). Sin embargo, algunos de los hallazgos sobre el papel de la PCR en la aterogénesis continúan siendo controversiales.

Existen evidencias que indican que un componente genético pueda influenciar de manera directa y previsible el estado estacionario del nivel de PCR en sangre (Kluft, y de Maat, 2003, Kathiresan, et al., 2006, Hingorani, Shah, y Casas. 2006). La comprensión de que existen polimorfismos genéticos en PCR y que algunos de estos podrían ser de importancia clínica debido a la predisposición genética de los valores basales altos de PCR, pudiendo explicar que una proporción significativa de personas tienen mayor riesgo a la enfermedad (Hage y Szalai, 2007).

1.9. Gen de la proteína C reactiva

El gen de la proteína C reactiva se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 1 en la región 1q23.2. Está compuesto de un intrón que separa dos exones. El primer exón codifica un péptido de señal y los dos primeros aminoácidos de la proteína madura. El exón 1 es seguido por el intrón de 278 nucleótidos de largo e incluye secuencias repetidas de GT.

El segundo exón codifica los 204 aminoácidos restantes (Figura 2). La producción de ARNm es regulado por la región promotora (Crawford, et al., 2006).

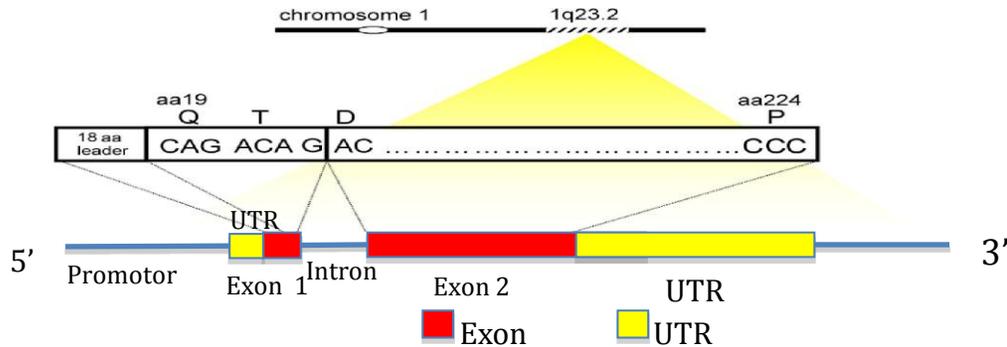


Figura 3. Localización y composición del Gen de PCR. El gen está compuesto por dos exones separados por un solo intrón. (modificado de Hage, F. G. et al. J Am Coll Cardiol 2007).

1.10. Polimorfismos genéticos

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y se adquieren con cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Para ser considerado polimorfismo la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población. Dentro de estos, los denominados polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son los más frecuentes y consisten en una variación en una sola base de la secuencia de ADN. Los polimorfismos son la base de la evolución, aunque algunos también pueden contribuir a causar enfermedades (Iniesta, Guinúa y Moreno, 2005).

Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de «alta penetrancia», ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad, pero suelen ser de baja frecuencia en la población general. Sin embargo, hay genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad y son llamados de «baja penetrancia» (Iniesta, et al., 2005).

1.11. Polimorfismos en el gen de la proteína C reactiva

En una re-secuenciación sistémica del gen de PCR realizada por Crawford, et al, (2006) revelaron más de 40 polimorfismos con la formación de 29 haplotipos diferentes y la mayor diversidad de nucleótidos se observó en afroamericanos. En el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) se encuentran reportados variantes genéticas en el gen de la PCR, presentes en el exon 2, intrón, región promotora, region downstream 3' (río abajo) y región no traducida 3', de acuerdo a estudios que han reportado asociación de los SNP con el nivel de proteína C reactiva (PCR) en sangre o el estado de la enfermedad [Figura 4]. (Tjörvi, et al., 2009)

dbSNP rs#	Chromosome Position [†]	Nucleotide Position ^{††}	Role	Minor:Major Allele	MAF (%)
rs1572970	chr1:157940209	10691	3' Downstream	G:A	0.287
rs876537	chr1:157941557	9343	3' Downstream	T:C	0.393
rs876538	chr1:157942341	8559	3' Downstream	A:G	0.186
rs2794520	chr1:157945440	5460	3' Downstream	T:C	0.337
rs3093077	chr1:157946260	4640	3' Downstream	G:T	0.071
rs2808630	chr1:157947492	3408	3' Downstream	C:T	0.265
rs1205	chr1:157948857	2043	3'UTR	T:C	0.342
rs1130864	chr1:157949715	1185	3'UTR	T:C	0.299
rs3093066	chr1:157949723	1177	3'UTR	A:C	0.009*
rs1800947	chr1:157950062	838	Coding synonymous	C:G	0.071
rs1417938	chr1:157950810	90	Intron	A:T	0.296
rs3091244	chr1:157951289	-390	Promotor	---	0.624 (C) 0.301 (T) 0.075 (A)
rs2794521	chr1:157951720	-821	Promotor	C:T	0.266
rs3093059	chr1:157951760	-861	Promotor	C:T	0.075
rs3093058	chr1:157951939	-1040	Promotor	T:A	0.006*
rs3122012	chr1:157955947	-5048	Promotor	C:T	0.295
rs2794517	chr1:157959329	-8430	Promotor	A:G	0.224
rs3116654	chr1:157962385	-11486	Promotor	C:T	0.123
rs3116653	chr1:157963534	-12635	Promotor	G:C	0.296

[†]NCBI hg version 36. ^{††}Nucleotide position given relative to ATG start codon of the *CRP* gene. The alleles of the triallelic SNP rs3091244 are described in the MAF column. *Excluded from further analyses due to minor allele frequency (MAF) <1%.

Figura 4. Algunos SNP en el Gen de PCR estudiados. Recuperado de Tjörvi, et al., 2009

Los polimorfismos que se estudiarán en este proyecto son los siguientes:

ID SNP	Alelos	Región	Localización
rs1800947	C/G	Exón 2	2667 (1059)
rs3093066	A/C	UTR 3'	3006
rs1205	A/G	UTR 3'	3872
rs2808630	A/G	Región flanqueante 3'	5237

El SNP 3872 rs1205 se encuentra localizado en la posición chr1:157948857, en la región 3' UTR del gen de proteína C reactiva y consta de un cambio de C>T en la posición +2043.

El SNP 2667 rs1800947, se encuentra localizado en la posición chr1:157950062, en el exón 2 del gen de proteína C reactiva y consta de un cambio de G>C en la posición +838.

El SNP 3006 rs3093066, se encuentra localizado en la posición chr1:157949723, en la región UTR 3' del gen de proteína C reactiva y consta de un cambio de C>A en la posición +1177.

El SNP 5237 rs2808630, se encuentra localizado en la posición chr1:157947492, en la región downstream 3' (río abajo) del gen de proteína C reactiva y consta de un cambio de T>C en la posición +3408.

II. ANTECEDENTES

Hay numerosos estudios que han investigado los diferentes aspectos del síndrome coronario agudo empleando parámetros clínicos, epidemiológicos y moleculares.

Se reconoce al SCA como una enfermedad multifactorial, poligénica y compleja que resulta de una combinación de factores vasculares, ambientales y genéticos. Se ha estudiado la variación genética del gen de la proteína C reactiva, uno de los factores de riesgo inflamatorio más importante, asociándola con la concentración plasmática de PCR y diferentes enfermedades cardiovasculares desde hace ya algunos años; sin embargo el papel de dicha proteína continúa siendo controversial, por lo que consideramos importante estudiar si la presencia de ciertos polimorfismos en el gen de la proteína C reactiva, tiene asociación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Algunas investigaciones han estudiado algunos polimorfismos del gen de la proteína C reactiva y la asociación con enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo relacionados.

En el 2007, Kolz, et al, evaluaron la asociación de siete SNPs en individuos sobrevivientes de infarto de miocardio con diferentes concentraciones de PCR, encontrando que los alelos menores de dos SNP (rs1800947 y rs1205), estuvieron fuertemente asociados con los niveles más bajos de la PCR.

Mediante un estudio de casos y controles anidado, Pai, et al en 2008, encontraron que los alelos menores de los SNP 1919A/T y 4741G/C se asociaron significativamente con mayores niveles de PCR, y los SNP 2667G/C y 3872C/T se asociaron con niveles más bajos de PCR; el SNP 2667G/C se asoció de forma individual con un riesgo aumentado de enfermedad coronaria. Dos de los cinco haplotipos comunes se asociaron con niveles más bajos de PCR, y el haplotipo 4 que incluyó alelos menores para 2667 y 3872 se asoció con niveles significativamente más bajos de PCR y un riesgo elevado de enfermedad coronaria. En lo que respecta al SNP 5237, no se encontró asociación con los niveles de PCR ni con enfermedad coronaria.

Liu, et al, (2008), investigaron la relación de la distribución de la aterosclerosis cerebral con las concentraciones de PCR aumentadas después de accidente cerebrovascular isquémico/ataque agudo isquémico transitorio y el polimorfismo 1059G>C (rs1800947) del gen de PCR, encontrando asociación con enfermedad aterosclerótica cerebral.

En un estudio realizado por Ben, et al (2009), observaron asociación entre la variación genética de PCR y aterosclerosis, ya que encontraron que el SNP -757T>C (rs3093059) de la región flanqueante 5' de PCR, estaba asociado con la concentración de PCR y la aterosclerosis carótida en personas sanas.⁷⁴

En un trabajo realizado por Kettunen, et al, (2011), se genotipificaron los polimorfismos del gen CRP -717A/G (rs2794521), -286C/A (rs3091244), +1059G/C (rs1800947), +1444C/T (rs1130864) y +1846G/A (rs1205) y midieron la concentración de PCR, encontrándose una asociación significativa entre el genotipo rs1800947 y la concentración de PCR.

En el año 2013, Shen et al, reportaron que los polimorfismos genéticos de PCR [rs3093059 (-757 T>C), rs2794521 (-717 T>C) rs3091244 (-286 C>W (T/A) rs876537 (T>C)], se asociaron con un menor riesgo de accidente cerebrovascular isquémico y elevada PCR hs. Posteriormente en el año 2015, Chen, et al., realizaron un estudio de casos y controles basado en la población para determinar si dos SNP de PCR (rs1800947 y rs3093059) estaban asociados con accidente cerebrovascular isquémico en la población Han china y evaluar su interacción con factores de riesgo ambientales. Encontraron que el genotipo GC del SNP rs1800947 se asoció significativamente con el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico, particularmente en la enfermedad de pequeños vaso y su subtipo. El análisis cruzado reveló que los pacientes con el genotipo GC del SNP rs1800947 y los hábitos de fumar o beber eran más susceptibles al accidente cerebrovascular isquémico.

Yanping Zhao, et al., (2012) estudiaron la asociación entre ocho variantes genéticas de proteína C reactiva e hipertensión en una población china, a través de un estudio de

casos y controles, en el que reportaron que el SNP 5237 (rs2808630) presento efecto significativo sobre la presión sanguínea sistólica y diastólica en población hipertensiva sin tratamiento, Este estudio es importante considerando que la HT es un factor de riesgo importante para enfermedades cardiovasculares.

En un estudio realizado en México en el año 2017 por Reynoso-Villalpando en el occidente de país en pacientes con SCA, se encontro que el polimorfismo rs1205 del gen de PCR, no se asoció con SCA. Concluyendo que este polimorfismo no es un marcador genético de susceptibilidad al SCA en la población del occidente de México. Este es el único estudio reportado en población mexicana.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia y asociación de los polimorfismos en el gen de la Proteína C Reactiva como marcador de riesgo cardiovascular, en pacientes con síndrome coronario agudo atendidos en el Hospital de Alta Especialidad *Ciudad Salud*, de Tapachula, Chiapas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las variables clínicas y demográficas en los sujetos de la población de estudio.
- Genotipificar los polimorfismos del gen de la Proteína C Reactiva en las muestras de los sujetos de la población de estudio.
- Determinar la asociación de las variables clínicas y los polimorfismos en el gen de la Proteína C Reactiva en la población de estudio.

VII. METODOLOGÍA

7.1. Población de estudio

La población de estudio incluyó pacientes que fueron admitidos en el Hospital Regional de Alta Especialidad *Ciudad Salud* en la Ciudad de Tapachula, Chiapas.

7.2. Muestra de estudio

La muestra estuvo conformada por los pacientes que provinieron de ocho regiones socioeconómicas del estado de Chiapas, previamente diagnosticados que fueron admitidos en el Hospital Regional de Alta Especialidad *Ciudad Salud* en la Ciudad de Tapachula Chiapas.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas en el Hospital Regional de Alta Especialidad Ciudad Salud. Las extracciones de ADN y los ensayos de genotipificación para los SNP del gen de la Proteína C reactiva fueron procesados en el Área de Diagnóstico Molecular del Laboratorio Escuela de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chiapas.

7.3. Diseño del estudio

Casos y controles.

7.4. Criterios de selección de la población estudiada

7.4.1. Grupo con enfermedad coronaria cardiovascular

Criterios de inclusión

- Pacientes con edad de 35 a 80 años.
- Ingresar al Hospital de Alta Especialidad Ciudad Salud con diagnóstico de Enfermedad Coronaria Cardiovascular.

SCA definido por depresión o elevación de segmento ST, con o sin necrosis secundaria a aterotrombosis.

Criterios de exclusión

- Ser menor de 35 años y mayor de 80 años.
- Padecer Enfermedad Hematológica, hepática o neoplásica.
- Haber consumido un exceso de alcohol al momento de su ingreso.
- Pacientes que no desearon participar en el estudio.

7.4.2. Grupo control

Criterios de inclusión

- Sujetos que desearon participar en el estudio
- Sujetos que acudieron al hospital por otras causas y personal médico y administrativo del mismo nosocomio.

Todos los sujetos casos y controles firmaron una carta de consentimiento informado, como requisito para participar en el estudio.

7.5. Criterios de selección de la población estudiada

Se tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica por punción venosa, de los cuales 5 ml se colocaron en un tubo con anticoagulante EDTA y 5 ml en tubo sin anticoagulante. La extracción del DNA genómico se realizó a partir de la sangre con anticoagulante mediante el uso del Kit Comercial QIAamp ADN Mini Kit (Austin, Texas, USA). La determinación de las variables bioquímicas se llevó a cabo en el suero obtenido de la sangre sin anticoagulante.

7.6. Determinación de las variables bioquímicas

Las variables bioquímicas de interés fueron: glucosa, colesterol, triglicéridos, y marcadores cardiacos como troponina y creatinfosfoquinasas (CK), las cuales se determinaron en el Hospital Regional de Alta Especialidad “Ciudad Salud”, empleando estuches comerciales siguiendo protocolos de trabajo estandarizados.

7.7. Extracción del ADN genómico

El proceso de extracción de ADN genómico se realizó mediante la técnica del Kit Comercial QIAamp DNA Mini Kit (anexos).

La calidad del ADN se verificó en gel de agarosa al 0.8% y se cuantificó por espectrofotometría en el equipo eppendorf bio-photometer (anexos).

7.8. Genotificación de los polimorfismos del gen de la proteína C reactiva

A partir del ADN de cada uno de los participantes se procedió a realizar los ensayos de genotificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en su modalidad de discriminación alélica, siguiendo el protocolo estándar descrito por el proveedor (compañía Applied Biosystems), utilizando sondas Taqman.

Los primers y sondas utilizadas para los polimorfismos determinados fueron los siguientes:

SNP	PRIMERS		Alelo	SONDA
	Forward	Reverse		
2667 rs1800947	CCGCCAAGATAGATGGTG TTAATC	CCTGGTGGGAGACATT GGAA	C G	6FAM CTGGTGAGAGCACAAA MGBNFQ VIC CTGGTGACAGCACAA MGBNFQ
3006 rs3093066	CCTGAGAATGGAGGTAAA GTGTCT	AAACACCTCAAATCTGAA C	A C	6FAM CTCGTAACTATGCTGGGAA MGBNFQ VIC CTCGTAACTATGATGGGAA MGBNFQ
3872 rs1205	GCCATCTTGTTGCCACAT G	GTCCTCCACTTCCAG TTTGG	A G	VIC TGTCTCATAGTCTCT MGBNFQ 6FAM CCTCACAGTCTCTC MGBNFQ VIC ACCAGACTATGTATAGTAA MGBNFQ
5237 rs2808630	TCTTCAGAATTCAGTTGCT TGCAT	AAATTATTAAGGCCAG AGGCTGTCT	A G	6FAM CCAGACTACGTATAGTAA MGBNFQ

7.9. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas entre los grupos de estudio se analizaron mediante un análisis de t-student (medias). Para las variables cualitativas y el equilibrio de Hardy-Weinberg se empleó X^2 (chi cuadrada) Odd Ratio (OR) y con intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

Para determinar la asociación de las variables (antecedentes familiares, patológicos, bioquímicos y polimorfismos) con la enfermedad coronaria cardiovascular se realizó una regresión logística multivariada.

Un valor de $P > 0.05$ se considero estadísticamente significativo.

Los cálculos se realizaron en el software estadístico SPSS versión 22 y el software SNPStats (programa para estudios de asociación genética).

VIII. RESULTADOS

Se analizaron un total de 252 sujetos, de los cuales 138 fueron pacientes sanos utilizados como controles y 114 pacientes con enfermedad coronaria cardiovascular previamente diagnosticados y admitidos en el Hospital Regional de Alta Especialidad *Ciudad Salud* en la Ciudad de Tapachula, Chiapas. La mayoría de los pacientes y controles incluidos en el estudio provienen de las regiones Soconusco con un 56.5%. Las regiones Istmo-Costa y meseta comiteca le siguen con un porcentaje del 23%, el 4% de la población no se pudo determinar su procedencia (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Lugar de procedencia de la población de estudio

	SCA		Controles		Total
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	%
Soconusco	60	55	53	58,2	56,5
Meseta Comiteca	14	12,8	7	7,7	10,5
Istmo-Costa	12	11	13	14,3	12,5
Metropolitana	9	8,3	4	4,4	6,5
Sierra Mariscal	4	3,7	8	8,8	6
La Fraylesca	3	2,8	1	1,1	2
Valle Zoque	2	1,8	1	1,1	1,5
Altos	1	0,92	0	0	0,5
Se desconoce	4	3,6	1	1,1	4

8.1. Características heredofamiliares, patológicas y demográficas de la población de estudio

En la tabla 8.2 se presenta las características heredofamiliares, patológicas y demográficas de toda la población de estudio. La edad promedio de la población control es 45.8 ± 11.9 , menor que los casos con SCA SCA (59.2 ± 11.6); con respecto al sexo hay mas hombres en el grupo de pacientes (74.6%). También se puede corroborar que los antecedentes patológicos personales como tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus e hiperlipidemia, la frecuencia es significativamente más alta en los pacientes con SCA que en los controles ($p \leq 0.005$). Sin embargo, en los antecedentes heredofamiliares como factores de riesgo cardiovascular tales como infarto, tabaquismo y alcoholismo, la

frecuencia es significativamente más alta en los casos con SCA que en los controles. En lo que se refiere a DM2, el grupo control tuvo una frecuencia significativamente más alta que los casos, y en lo referente a obesidad e hipertensión no se observó diferencia significativa entre ambos grupos ($p>0.05$).

Tabla 8.2. Características clínicas y demográficas de la población de estudio

	Pacientes con		X ²	Valor de P	
	SCA, n = 114	Controles nn = 38			
Edad (media, DS)	59.22±11.6	45.83±11.99	T= 10.056	0.000	
Sexo	Hombres	85 (74.6)	77 (55.8)	T= 9.574	0.002
	Mujeres	29 (25.4)	61(44.2)		
Antecedentes patológicos personales					
Tabaquismo	47 (41.2)	18 (13.0)	25.909	<0.005	
Hipertensión	82 (71.9)	24 (17.5)	75.511	<0.005	
Diabetes mellitus	59 (52.2)	18 (13.1)	44.358	<0.005	
Dislipidemia	53 (46.5)	14 (10.1)	42.898	0.005	
Antecedentes heredofamiliares					
Infarto	80 (74.8)	25 (18.1)	78.980	0.000	
Diabetes mellitus	34 (43.6)	42 (30.4)	3.782	0.052	
Obesidad	22 (28.2)	26 (18.8)	4.466	0.107	
Hipertensión	31 (40.3)	42 (30.4)	2.127	0.145	
Tabaquismo	51 (44.7)	39 (28.3)	7.381	0.007	
Alcoholismo	62 (74.7)	53 (38.4)	27.352	0.000	

Fuente: Elaboración propia. DS = desviación estándar, X²= chi cuadrada, T= t student

8.2. Frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos

Para analizar la asociación de los SNP con el desarrollo de SCA, primeramente se realizó el análisis descriptivo de cada uno de los polimorfismos y la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg. A continuación se presentan los posibles modelos de herencia y el análisis simultáneo de múltiples polimorfismos: estimación de las frecuencias de haplotipos y análisis de asociación con la enfermedad.

8.3. Frecuencia genotípica y alélica del SNP 3872A/G (rs1205)

El cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas, así como el análisis de asociación se llevaron a cabo con el uso de la herramienta web SNPStats. El grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0.3$), igual que los pacientes.

En las tablas 8.3 y 8.4 se presentan la distribución genotípica y alélica del SNP 3872G/A, respectivamente.

Tabla 8.3. Frecuencia Genotípica del SNP rs1205 (3872 G/A)				
Genotipo	CASOS (n=114)		CONTROLES (n=138)	
	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica
G/G	47	41.2%	29	21%
G/A	45	39.5%	62	44.9%
A/A	22	19.3%	47	34.1%

Fuente: Elaboración propia. C: Citosina, T: Timina,

Tabla 8.4. Frecuencia Alélica del SNP rs1205 (3872 G/A)				
Alelo	CASOS		CONTROLES	
	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica
G	139	0.6096	120	0.4348
A	89	0.3904	156	0.5652

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, C: Citosina, T: Timina.
Prueba EHW control: $p=0.30$. Prueba EHW casos: $p= 0.08$

El modelo genético que mejor representa el SNP es el codominante ($p=0.009$). Al analizarlo se encontró que el genotipo G/A da un OR de 0.45, incrementando la protección con el genotipo AA (OR 0.29, IC 95%, 0.15-0.57, $p = 0.009$).

Tabla 8.5. Análisis estadístico de asociación del SNP rs1205 (3872 G/A)

Modelo	Genotipo	Casos [114(%)]	Control [138(%)]	OR (95% IC)	ValorP
Codominante	G/G	47 (41.2%)	29 (21%)	1.00	0.009
	G/A	45 (39.5%)	62 (44.9%)	0.45 (0.24-0.82)	
	A/A	22 (19.3%)	47 (34.1%)	0.29 (0.15-0.57)	
Dominante	G/G	47 (41.2%)	29 (21%)	1.00	0.005
	G/A-A/A	67 (58.8%)	109 (79%)	0.38 (0.22 to 0.66)	
Recesivo	G/G-G/A	92 (80.7%)	91 (65.9%)	1.00	0.0097
	A/A	22 (19.3%)	47 (34.1%)	0.46 (0.26-0.83)	
Sobre dominante	G/G- A/A	69 (60.5%)	76 (55.1%)	1.00	0.38
	G/A	45 (39.5%)	62 (44.9%)	0.80(0.48-1.32)	

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, OR: Odd Ratio, 95% IC: Intervalo de confianza de 95%, P: Valor de P, Citosina, T: Timina. Prueba EHW control: p=0.30. Prueba EHW casos: p= 0.08

Al realizar el ajuste por las variables edad, sexo, diabetes, hipertensión y tabaquismo los genotipos AG y AA permanecen independientes (p=0.00009).

8.4. Frecuencia genotípica y alélica del SNP rs2808630 (5237A/G)

En las tablas 8.6 y 8.7 se presentan la distribución genotípica y alélica del SNP 5237A/G. El grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg (p = 0.74).

Tabla 8.6. Frecuencia Genotípica del SNP rs2808630 (5237 A/G)

Genotipo	CASOS		CONTROLES	
	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica
A/A	80	70.2%	98	71.0%
A/G	28	24.5%	38	27.5%
G/G	6	5.3%	2	1.5%
EHW	Casos		0.11	
	Control		0.74	

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, C: Citosina, T: Timina.

Tabla 8.7. Frecuencia Alélica del SNP rs2808630 (5237 A/G)

Alelo	CASOS		CONTROLES	
	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica
A	188	0.8246	234	0.8478
G	40	0.1754	42	0.1522

Fuente: Elaboración propia, C, Citosina, T, Timina,

Observamos que la distribución genotípica y alélica de dicho SNP 5237 no fueron estadísticamente diferentes entre los casos y controles. De acuerdo al modelo de herencia en ninguno de los cuatro grupos determinados se encontró diferencia significativa, pero el modelo recesivo es el que representa a este SNP (Tabla 8.8)

Tabla 8.8. Análisis estadístico de asociación del SNP rs2808630 (5237 A/G)

Modelo	Genotipo	SCA	Control	OR (95% IC)	Valor P
Codominante	A/A	80 (70.2%)	98 (71%)	1.00	0.18
	A/G	28 (24.6%)	38 (27.5%)	0.9 (0.51-1.6)	
	G/G	6 (5.3%)	2 (1.4%)	3.67 (0.72-18.7)	
Dominante	A/A	80 (70.2%)	98 (71%)	1.00	0.88
	A/G-G/G	34 (29.8%)	40 (29%)	1.04 (0.6-1.8)	
Recesivo	A/A-A/G	108 (94.7%)	136 (98.5%)	1.00	0.11
	G/G	6 (5.3%)	2 (1.4%)	3.78(0.75-19.1)	
Sobredominante	A/A-G/G	86 (75.4%)	100 (72.5%)	1.00	0.59
	A/G	28 (24.6%)	38 (27.5%)	0.86(0.49-1.51)	

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, OR: Odd Ratio, IC 95%: Intervalo de confianza de 95%, P: Valor de p, C: Citosina, T: Timina.

8.5. Frecuencia genotípica y alélica del SNP rs1800947 (2667C/G)

La distribución genotípica y alélica del SNP 2667 C/G se presenta en las tablas 8.9 y 8.10. El grupo control se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p = 0.075$), mientras el grupo de casos esta en desequilibrio (0.001). El genotipo CC solo se encontró en el grupo de pacientes y el alelo en el 50%.

Tabla 8.9. Frecuencia Genotípica del SNP rs1800947 PCR (2667 C/G)				
	CASOS		CONTROLES	
Genotipo	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica
G/G	49	43 %	100	72 %
G/C	16	14 %	38	28 %
C/C	49	43 %	0	00
EHW	Casos		0.0001	
	Control		0.075	

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, C: Citosina, G: Guanina.

Tabla 8.10. Frecuencia Alélica del SNP rs1800947 PCR (2667 C/G)				
Alelo	CASOS		CONTROLES	
	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica
G	114	0.5000	238	0.8600
C	114	0.5000	38	0.1400

Fuente: Elaboración propia, C, Citosina, G, Guanina

En la tabla 8.11 se observan los modelos genéticos para el SNP 2667, el modelo dominante es el que más se ajusta con un OR de 3.49 (IC 95%: 2.06-5.91). Los paciente con el genotipo C/C tienen una probabilidad de 209 de sufrir SCA que aquellos personas que tienen el genotipo G/G y G/C ($p < 0.0002$).

Tabla 8.11. Análisis estadístico de asociación del SNP rs1800947 PCR (2667 C/G)					
Model	Genotipo	SCA	Control	OR (95% IC)	Valor de P
Codominante	G/G	49 (43%)	100 (72.5%)	1.00	0.0002
	C/G	16 (14%)	38 (27.5%)	0.86 (0.44-1.7)	
	C/C	49 (43%)	0 (0%)	*201 (12.2-3327)	
Dominante	G/G	49 (43%)	100 (72.5%)	1.00	<0.0001
	C/G-C/C	65 (57%)	38 (27.5%)	3.49 (2.06-5.91)	
Recesivo	G/G-C/G	65 (57%)	138 (100%)	1.00	<0.0002
	C/C	49 (43%)	0 (0%)	*209.34 (12.7-3447)	
Sobredominante	G/G-C/C	98 (86%)	100 (72.5%)	1.00	0.01
	C/G	16 (14%)	38 (27.5%)	0.43 (0.23-0.83)	

Fuente: Elaboración propia. EHW, Equilibrio de Hardy Weinberg, OR, Odd Ratio, IC 95%, Intervalo de confianza de 95%, P, Valor de p, C, Citosina, G, Guanina.

*Cálculo según Pagano & Gauvreau, 2000; Deeks & Higgins, 2010

Se realizó el análisis estadístico ajustado por las variables clínicas y patológicas, encontrando que el SNP 2667 C/G permanece como variable independiente de riesgo en la población, OR 261 (IC 95%: 15.6-4351; P< 0.0001)

Tabla 8.12. Modelo de regresión Logística para SNP 2667 C/G ajustado por variables clínicas y patológicas

Modelo	Genotipo	SCA	Control	OR (95% IC)	P
Codominante	G/G	30 (38%)	98 (72.1%)	1.00	<0.0001
	C/G	9 (11.4%)	38 (27.9%)	5.10 (0.59-43.87)	
	C/C	40 (50.6%)	0 (0%)	261 (15.6-4351)	

Fuente: Elaboración propia. OR, Odd Ratio, IC 95%, Intervalo de confianza de 95%, P, Valor de p, C, Citosina, G, Guanina.

8.6. Frecuencia genotípica y alélica del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)

En cuanto a la distribución genotípica y alélica se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg, estando solo presente el genotipo C/C y A/C (Tablas 8.13y 8.14).

Tabla 8.13. Frecuencia Genotípica del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)

Genotipo	CASOS		CONTROLES	
	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica
C/C	95	83%	127	92%
A/C	19	17%	11	8%
EHW	Casos		1.00	
	Control		1.00	

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, C: Citosina, A: Adenina.

Tabla 8.14. Frecuencia alélica del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)

Alelo	CASOS		CONTROLES	
	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica	Número de Alelos Observados	Frecuencia Alélica
C	209	0.9200	265	0.9600
A	19	0.0800	11	0.0400

Fuente: Elaboración propia. EHW: Equilibrio de Hardy Weinberg, C: Citosina, A: Adenina.

Al estar solo presente dos genotipos no se pudo realizar el análisis de los modelos genéticos. Se realizó el cálculo de OR, observando que la probabilidad es de 2.31 (IC 95%: 1.05-5.09; p=0.038) de sufrir SCA cuando se encuentra el genotipo A/C.

Tabla 8.15. Análisis estadístico de asociación del SNP rs3093066 PCR (3006 A/C)

Modelo	Genotipo	SCA	Control	OR (95% IC)	P
---	C/C	95 (83.3%)	127 (92%)	1.00	0.038
	A/C	19 (16.7%)	11 (8%)	2.31 (1.05-5.09)	

Fuente: Elaboración propia. OR: Odd Ratio, IC 95%: Intervalo de confianza de 95%, P: Valor de p, C: Citosina, A: Adenina.

8.7. Asociación de haplotipos con SCA

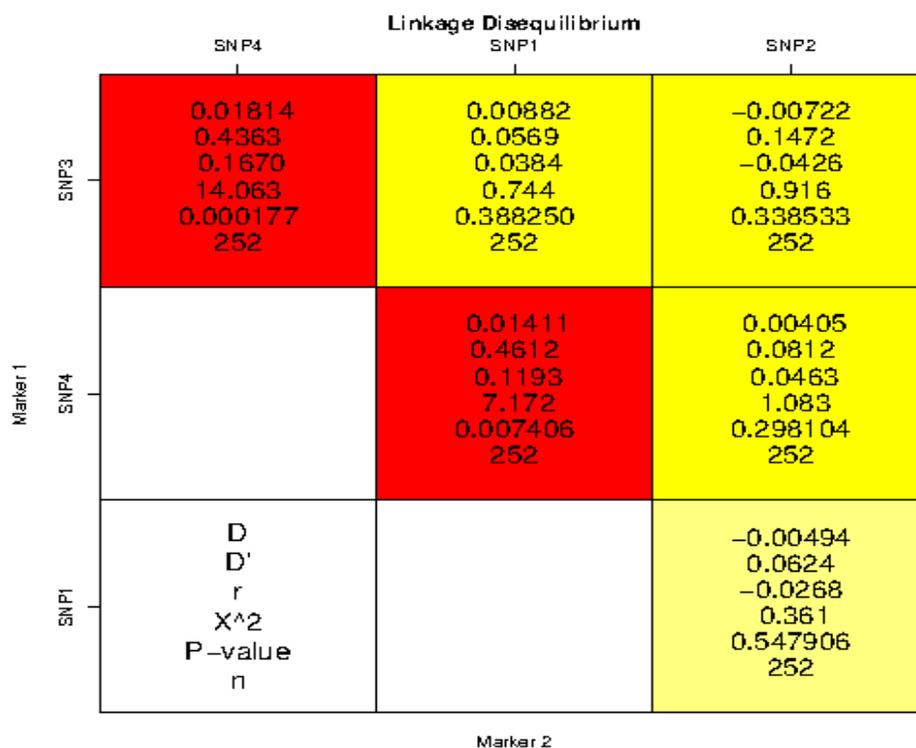
Se realizó análisis de haplotipos para identificar la asociación de riesgo con síndrome coronario agudo; examinando la combinación de alelos de los cuatro SNP's. En la Tabla 8.16 se muestran la frecuencia de haplotipos en la población de estudio. El haplotipo GTGC fue el más frecuente en los grupos de estudio, seguido por ATGC (Tabla 8.16).

Tabla 8.16. Frecuencia de haplotipos en la población de estudio							
	SNP3872	SNP5237	SNP2667	SNP3006	Total	SCA	Control
1	G	T	G	C	0.2912	0.2623	0.3239
2	A	T	G	C	0.2773	0.1394	0.3804
3	G	T	C	C	0.1177	0.203	0.034
4	A	T	C	C	0.1071	0.1517	0.085
5	G	C	G	C	0.0767	0.0939	0.0725

Fuente: Elaboración propia. G: Guanina. A: Adenina, C: Citosina, T: Timina

Los genotipos que se encuentran en desequilibrio de ligamento son el SNP 3006 con SNP 2667 y SNP 3872 de acuerdo a la grafica 2 ($p= 0.0002$; 0.007).

Gráfica 2. Desequilibrio de enlace de los SNP's estudiados



El análisis de asociación de haplotipos con SCA en la población de estudio, identifica con significancia estadística al haplotipo GTCC con un riesgo de 6.72 (IC 95%, 2.46 – 18.36, $p=0.0002$), (Ver Tabla 8.17) y ATGC con un riesgo protector (OR, 0.26; IC, 95%, 0.139-0.492, $p<0.0001$).

Tabla 8.17. Asociación de haplotipos con SCA

	SNP3872	SNP5237	SNP2667	SNP3006	Frecuencia	OR (IC 95%)	Valor de P
1	G	T	G	C	0.2908	1.00	---
2	A	T	G	C	0.2794	0.26 (0.139 – 0.492)	<0.0001
3	G	T	C	C	0.1218	6.72(2.46 – 18.33)	0.0002
4	A	T	C	C	0.1016	1.84 (0.84 – 4.03)	0.13
5	G	C	G	C	0.0736	1.3 (0.54 – 3.84)	0.54

Fuente: Elaboración propia. OR: Odd Ratio, IC 95%: Intervalo de confianza de 95%, P: Valor de p, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina

Al analizar solo los SNPs en desequilibrio de ligamentos se encontró que el haplotipo GCA con una frecuencia del 31.8% y ajustado por edad, sexo, diabetes, hipertensión y tabaquismo es independiente, permaneciendo como marcador protector ($p=0.0004$)

8.8. Relación de los SNPs con las variables clínicas en los casos

En las siguientes 4 tablas se muestra la relación de las variables clínicas (sobrepeso, obesidad e HTA), marcadores bioquímicos (glucosa, colesterol total, triglicéridos, úrea, creatinina y BNP) y troponina como marcador diagnóstico, con los cuatro SNP's estudiados.

En la siguiente tabla se observa que entre el SNP 5237A/G y las variables estudiadas no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa.

Tabla 8.18. Relación del SNP 5237A/G con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante.

SNP 5237C/T	T/T n=80	C/C n=6	C/T n=28	X ²	P
Sobrepeso	31	1	11	3.026	0.553
Obesidad	16	1	1	3.026	0.553
HTA	56	3	23	3.023	0.221
Glucosa	40	4	14	0.632	0.729
Triglicéridos	38	3	12	4.552	0.103
Colesterol	35	5	10	4.552	0.103
Úrea	10	0	4	0.948	0.662
Troponina	23	3	6	2.059	0.357
Creatinina	14	0	5	1.269	0.53
BNP	12	2	3	1.994	0.706

Fuente: Elaboración propia. C: Citosina, T: Timina, X²: chi cuadrada, P: valor de P, HTA: Hipertensión arterial, BNP: Péptido natriurético cerebral.

Tabla 8.19. Relación del SNP 3872G/A con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante

SNP 3872G/A	G/G n=22	A/A n=47	G/A n=45	X ²	P
Sobrepeso	11	14	18	2.435	0.293
Obesidad	1	9	9	0.554	0.758
HTA	13	35	34	2.239	0.326
Glucosa	11	27	20	1.564	0.450
Triglicéridos	14	16	23	6.104	0.047
Colesterol	11	15	24	4.701	0.095
Úrea	5	5	4	2.827	0.247
Troponina	10	7	15	7.952	0.019
BNP	4	6	7	0.371	0.831

Fuente: Elaboración propia. G: Guanina, A: Adenina, X²: chi cuadrada, P: valor de P, HTA: Hipertensión arterial, BNP: Péptido natriurético cerebral

Sin embargo al determinar la relación de las variables con el SNP 3872G/A, se encontró que triglicéridos y troponina si tuvieron una relación estadísticamente significativa (tabla 8.19).

En lo que respecta a los SNP's 2667A/C y 3006A/C, se observó que ambos tuvieron una relación estadísticamente significativa con colesterol, y el primero también tuvo relación con troponina y el segundo con sobrepeso (Tablas 8.20 y 8.21).

Tabla 8.20. Relación del SNP 2667 A/C con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante

SNP 2667 A/C	C/C	G/G	C/G	X ²	P
	n=49	n=49	n= 16		
Sobrepeso	23	16	4	0.245	0.945
Obesidad	9	7	3	0.554	0.885
HTA	33	36	12	1.256	0.534
Glucosa	30	22	6	3.946	0.139
Triglicéridos	28	19	6	4.386	0.112
Colesterol	28	14	8	8.408	0.015
Úrea	8	4	2	1.516	0.469
Troponina	25	5	2	22.45	0.000
Creatinina	11	7	1	2.630	0.269
BNP	9	7	1	1.422	0.491

Fuente: Elaboración propia. C: Citosina, A: Adenina, X²: chi cuadrada, P: valor de P, HTA: Hipertensión arterial, BNP: Péptido natriurético cerebral

Tabla 8.21. Relación del SNP 3006 A/C con las variables clínicas de los casos. Modelo codominante

SNP 3006 A/C	C/C	A/C	X ²	P
	n=49	n=49		
Sobrepeso	40	3	5.096	0.024
Obesidad	15	4	0.765	0.295
HTA	69	13	0.139	0.452
Glucosa	48	10	0.028	0.534
Triglicéridos	43	10	0.301	0.382
Colesterol	37	13	5.586	0.017
Úrea	12	2	0.065	0.576
Troponina	26	6	0.139	0.452
Creatinina	17	2	0.619	0.343
BNP	14	3	0.014	0.452

Fuente: Elaboración propia. C: Citosina, A: Adenina, X²: chi cuadrada, P: valor de P, HTA: Hipertensión arterial, BNP: Péptido natriurético cerebral

IX. DISCUSIÓN

En México las enfermedades isquémicas del corazón ocupan el segundo lugar como causa de mortalidad y según la transición epidemiológica se ha observado un aumento en la esperanza de vida, lo que nos lleva a pensar que la edad avanzada es un factor de riesgo en el aumento de dicha patología, ya que en la población estudiada la mitad correspondió a una edad mayor de 60 años. Estudios realizados por Velázquez-Monroy, et al, (2007) sugiere que la edad en donde la cardiopatía isquémica representa una causa importante de muerte en todos los adultos, es de 65 años o más en ambos sexos y García-Castillo A., et al, (2005) en el Registro Mexicano de SCA menciona que la edad promedio de los pacientes es mayor de 60 años, siendo más frecuente el sexo masculino. Nuestros resultados muestran que la población chiapaneca y en mayor frecuencia los hombres tienden a padecer la enfermedad cardiovascular a una edad parecida a lo reportado en el estudio Mexicano SICA.

En el presente trabajo se observó que los factores de riesgo del SCA como son tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipidemia, fueron los principales antecedentes patológicos personales que presentaron los pacientes, similares a lo observado en otros trabajos, como el realizado por García-Castillo, et al., (2005) en el que de acuerdo a dos estudios epidemiológicos (INTERSTROKE INTERHEART) se determinó que los principales factores de riesgo para infarto agudo de miocardio fueron obesidad, dislipidemia, tabaquismo e hipertensión arterial.

En el estudio realizado por Greenland, et al., (2003) demostraron que la hipertensión arterial, dislipidemia y tabaquismo, son los tres factores de riesgo modificables que con mayor fuerza se asocian de forma independiente con la enfermedad coronaria. Al igual Dreisbach, A., (2010) menciona que la hipertensión crónica es el factor de riesgo modificable más importante para desarrollar enfermedades cardiovasculares. Se sabe también que los hombres tienen más predisposición a desarrollar hipertensión arterial que las mujeres, situación que se modifica cuando la mujer llega a la menopausia, donde las hormonas protectoras desaparecen. En nuestro estudio se encontró que las mujeres del grupo de pacientes con antecedentes hereditarios de hipertensión y diabetes, muestran una

frecuencia mayor en comparación con los hombres; observándose también que la dislipidemia es el factor más común en hombres.

La diabetes sola o asociada con otros estados de disfunción endotelial crónica e inflamación (pacientes de edad avanzada, tabaquismo, hipertensión, lípidos anormales) podría explicar la elevada incidencia a nivel mundial (Yusuf, et al., 2004), la cual es un factor de riesgo importante de morbilidad y mortalidad cardiovasculares, y se asocia con un mal pronóstico después de un infarto del miocardio (Bartnik, et al., 2004). Nosotros encontramos resultados similares a los de la población mundial y asiática.

Según lo reportado en el portal de NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2794521, diversos estudios indican la frecuencia genotípica y alélica a nivel mundial. Respecto al SNP 3872 (rs1205) se ha reportado en las poblaciones asiática y europea la presencia de los 3 genotipos y en la población africana únicamente dos genotipos (GG y GA). En nuestra población se encontró la presencia de los 3 genotipos, siendo muy similar a la población asiática y europea en la frecuencia del genotipo GA, la cual fue la más frecuente.

Respecto al SNP 2667 (rs1800947) se ha reportado en las poblaciones hispana y caucásica la presencia de dos genotipos (GG y CG) y en la población africana únicamente el genotipo (GG). En nuestra población se encontró la presencia de dos genotipos (GG y CG), similar a la frecuencia en población hispana y caucásica, siendo el genotipo GG el más frecuente. En lo que se refiere a la frecuencia alélica, a nivel mundial se ha reportado la presencia de los dos alelos (G y C), siendo el alelo G más frecuente en las poblaciones africana, europea y caucásica y únicamente se ha reportado la presencia del alelo G en hispanos.

Para el SNP 3006 (rs3093066), se ha reportado únicamente la presencia del genotipo CC en población asiática y europea y en población afroamericana es la única en la que se encuentra reportado los genotipos CC y AC, similar a nuestra población en la que se encontró estos dos genotipos.

En relación al SNP 5237 TC, nuestros resultados son similares a lo obtenido en población hispana, siendo el genotipo TT mas frecuente en todas las poblaciones estudiadas. En la población africana es la única en la que se ha observado los genotipos CT y TT.

Tabla 8.22. Frecuencia genotípica a nivel mundial

SNP		POBLACIÓN						
		Afroamericana	Africana	Asiática	Europeo	Hispano	Caucásico	Nuestra población
2667 GC rs 1800947	CC	-	-	-	0.12	-	-	0.19
	CG	0.04	-	-	0.87	0.13	0.13	0.21
	GG	0.95	-	1.000	1.00	0.87	0.87	0.59
3006 CA rs3093066	AA	-	-	-	-	-	-	-
	AC	0.42	-	-	-	-	-	0.12
	CC	0.57	-	1.0	1.00	.	-	0.88
3872 CT rs1205	G/G	-	0.69	0.16	0.43	-	-	0.3
	G/A	-	0.30	0.51	0.45	-	-	0.42
	A/A	-	-	0.32	0.115	-	-	0.27
5237 TC rs2808630	CC	-	-	0.13	0.08	0.08	0.10	0.03
	CT	-	0.25	0.20	0.43	0.30	0.40	0.26
	TT	-	0.75	0.65	0.48	0.60	0.50	0.71

Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2794521

Tabla 8.23. Frecuencia alélica a nivel mundial

SNP		POBLACIÓN						
		ALELO	Afroamericana	Africana	Asiática	Europeo	Hispano	Caucásico
2667 GC	C	-	0.065	-	0.0625	-	0.04	0.3
	G	-	0.935	1.00	0.9375	1.00	0.956	0.7
3006 CA	A	0.21	-	-	-	-	-	0.06
	C	0.789	-	1.00	1.00	-	-	0.94
3872 CT	G	-	0.8495	0.4186	0.6592	-	-	0.51
	A	-	0.1504	0.5813	0.3407	-	-	0.49
5237 TC	C	-	0.125	0.2441	0.2991	0.2391	0.3	0.16
	T	-	0.875	0.7558	0.7008	0.7608	0.7	0.84

Fuente: www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2794521

Para determinar que la población del grupo control del estudio están en equilibrio después de un apareamiento al azar se analizo el equilibrio de Hardy-Weinberg encontrando que todos los SNPs están en equilibrio sin que ninguna mutación, migración o selección genética haya afectado. Esto no fue lo mismo por el grupo de pacientes en donde la población se modifica por la enfermedad.

No se encontró asociación en nuestra población, aunque estudios reportados anteriormente encontraron que el alelo C del rs2808630 (5237 C/T) se encontró con mayor frecuencia en mujeres del grupo de casos que en los controles y de igual manera el alelo C del SNP2667 fue más frecuente tanto en hombres como en mujeres (Pai, et al, 2008). En nuestro estudio

encontramos que el alelo A del SNP 3872 está asociado con disminución del riesgo a la enfermedad, al analizar la literatura no han encontrado asociación en el desarrollo de la enfermedad (Pai, et al, 2016; Kolz, et al, 2007). En un estudio realizado en México por Reynoso-Villalpando, (2016) en pacientes con SCA, se encontro que el polimorfismo rs1205 del gen de PCR, no se asoció con SCA.

Con respecto al SNP 3006, el riesgo de nuestra población es de 2 veces más, pero el SNP 2667 G/C permanece como variable independiente de riesgo en la población con un OR de 261, no importando si están presente diabetes, hipertensión y tabaquismo. Sin embargo es necesario ampliar la población de estudio, ya que el IC es muy amplio.

El haplotipo GTCC es un marcador de riesgo que se encontró en nuestra población, el cual es independiente de las variables clínicas y patológicas, aunque al realizar el análisis de desequilibrio de ligamentos, solo los SNPs 3006, 2667 y 3872 son los relacionados (GCA), permaneciendo independiente al ajustar por las variables diabetes, hipertensión, tabaquismo, edad y sexo, lo cual lo hace un marcador prometedor.

Nuestro estudio aporta información de las frecuencias genotípicas y alélicas en población latina y también conocimiento a la controversia si están o no asociados estos SNPs a la enfermedad, lo cual parece que dicha asociación es solo en poblaciones bien definidas.

Es necesaria la búsqueda de otros SNP`s en el gen de la PCR y nuevos marcadores genéticos para identificar a los pacientes con alto riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares y para contar con nuevas estrategias de predicción, prevención y tratamientos individualizados para poblaciones heterogéneas, como la nuestra.

X. CONCLUSIÓN

Las variables clínicas tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipidemia, son factores de riesgo para SCA en nuestra población.

La frecuencia de los antecedentes heredofamiliares tales como infarto, tabaquismo y alcoholismo, fue significativamente más alta en los casos que en los controles.

Los paciente con el genotipo C/C del SNP2667, tienen una probabilidad de 209 veces de sufrir SCA.

Los pacientes que portan el genotipo A/C del SNP rs3093066 (3006) tienen la probabilidad de 2.31 veces de sufrir SCA.

Los portadores del haplotipo GTCC presentan un riesgo de 6.72 veces de sufrir SCA.

Los portadores del haplotipo ATGC tiene 3.8 veces menos riesgo protector de sufrir SCA.

Los pacientes que portan el SNP rs1205 (3872 G/A) tienen un riesgo protector en el desarrollo de SCA (2.6 veces menos riesgo).

El SNP rs2808630 (5237A/G) no se encuentra asociado estadísticamente con SCA.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre Botello, M. recopilación datos de INEGI, OMS y SINAIS. México, principales causas de mortalidad 1938-2016 disponible en: www.mexicomaxico.org/Voto/MortalidadCausas.htm

Álvarez-Aliaga, A., & González-Aguilera, J.C. (2009). Algunos factores de riesgo de la cardiopatía hipertensiva. *Revista Cubana de Medicina*, 48(4), 139-151.

Amezcu-Guerra, L.M., Springall del Villar, R., Bojalil-Parra, R. (2007). Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Arch. Cardiol. Méx. [online]*, 77(1), 58-66. ISSN 1405-9940.

Anderson, T.J. (1999). Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 34(3):631-8. Review. PubMed PMID: 10483941.

Arce-Torres, M.A., Haro-Acosta, M.E., Ponce y Ponce De León, G., Nuñez-Soria, A.A., Ruiz-Esparza, J., Robinson-Navarro, O.M. (2008). Aterogenesis. *Revista de Salud Pública y Nutrición*. 9(4), sp

Barba-Evia, J.R. (2007). Síndrome coronario agudo: Marcadores de lesión miocárdica. *Rev Mex Patol Clin*, 54 (3), 116-135

Barderas, M. G., Gallego-Delgado, J., Durán, M. C., Lázaro, A., Hernández-Mérida, S., Mas, S., Jiménez-Nácher, J. J., ... Vivanco, F. (2004). Análisis proteómico de monocitos circulantes humanos. Aplicación a pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación Cardiovascular*, 7(1), 1-18.

Bartnik M, Malmberg K, Norhammar A, Tenerz A, Ohrvik J, Rydén L.(2004). Newly detected abnormal glucose tolerance: an important predictor of long-term outcome after myocardial infarction. *Eur Heart J*.25(22):1990-7. PubMed PMID: 15541834.

- Bauriedel, G., Hutter, R., Welsch, U., Bach, R., Sievert, H., Luderitz, B. (1999). Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res*, 41(2), 480-8. PubMed PMID: 10341848.
- Ben Assayag, E., Shenhar-Tsarfaty, S., Bova, I., Berliner, S., Usher, S., Peretz, H., Shapira, I., Bornstein, N.M. (2009). Association of the -757T>C polymorphism in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and carotid atherosclerosis. *Thromb Res*. 124(4):458-62. doi: 10.1016/j.thromres.2009.04.008. Epub 2009 May 9. PubMed PMID: 19428053
- Bisoendial, R.J., Kastelein, J.J., Levels, J.H., Zwavinga, J.J., van den Bogaard, B., Reitsma, P.H.,...Stroes, E.S. (2005). Activation of inflammation and coagulation after infusion of C-reactive protein in humans. *Circ Res*, 96(7), 714-6. PubMed PMID: 15774855.
- Borges-Moreno, Y., Jardines Basulto, G., y Borges-Moreno Y. (2016). Comportamiento clínico del síndrome coronario agudo en la Mujer. *Revista Cubana De Cardiología Y Cirugía Cardiovascular. Órgano Oficial de la Sociedad Cubana de Cardiología Volumen 22, No 2*
- Carlson, C.S., Aldred, S.F., Lee, P.K., Tracy, R.P., Schwartz, S.M., Rieder, M.,...Reiner A.P. (2005). Polymorphisms within the C-reactive protein (CRP) promoter region are associated with plasma CRP levels. *Am J Hum Genet*, 77, 64–77.
- Casas, J.T., Shah, T., Hingorani, A.D., Danesh, J., Pepys, M.B. (2008). C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Int Med*, 264(4), 295-314. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.02015.x.
- Chen, Z., Yu, D., Xu, Z.W., Li, S.S., Li, X.F., Li, J., Yang X. (2015). C-reactive protein gen polymorphisms and gene-environment interactions in ischaemic stroke. *Neurol Res*.37(11), 979-84. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000053.

- Chen, Z., Yu, D., Xu, Z.W., Li, S.S., Li, X.F., Li, J., Yang, X. (2015). C-reactive protein gene polymorphisms and gene-environment interactions in ischaemic stroke. *Neurol Res.* 2015, 37(11), 979-84. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000053.
- Crawford, D.C., Sanders, C.L., Qin, X., Smith, J.D., Shephard, C., Wong M,...Nickerson D.A. (2006). Genetic variation is associated with Creactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*; 114, 2458–65.
- Crawford, D.C., Yi, Q., Smith, J.D., Shephard, C., Wong, M., Witrak, L., ...Nickerson, D.A. (2006). Allelic spectrum of the natural variation in CRP. *Human Genetics*, 119(5):496-504. PubMed PMID: 16550411;
- Davies, M.J. (1996). Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 1996;94(8), 2013-20. Review. PubMed PMID: 8873680.
- Deeks JJ, Higgins JPT (2010) Statistical algorithms in Review Manager 5. Retrieved from <http://ims.cochrane.org/revman/documentation/Statistical-methods-in-RevMan-5.pdf>
- Devaraj, S., Singh, U., Jialal, I. (2009). Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*, 20(3),182-9. doi:10.1097/MOL.0b013e32832ac03e. Review.
- Devaraj, S., Singh, U., Jialal, I. (2009). The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem*, 55(2), 229–38. doi: 10.1373/clinchem.2008.108886.
- Dreisbach, A. (5 de Julio de 2010). https://es.wikipedia.org/wiki/Hipertensi%C3%B3n_arterial. Obtenido de https://es.wikipedia.org/wiki/Hipertensi%C3%B3n_arterial.

<http://webcache.googleusercontent.com/search?hl=es419&biw&bih&q=cache:e9Zba2PacTYJ>

Falk, E., Shah, P.K., Fuster, V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92(3), 657-71. Review. PubMed PMID: 7634481.

García-Castillo, A., Jerjes-Sánchez, C., Martínez-Bermúdez, P., Azpiri L.J.R., Autrey, C.A., Martínez, S.C., ..., & Treviño, A.J. (2005). RENASICA II Registro Mexicano de Síndromes Coronarios Agudos. *Arch Cardiol Mex*; 75 (S1)

Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K.B. (2001). C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implication for systemic autoimmunity. *J Exp Med*, 193(12), 1439. PubMed PMID: 11067883

Gonzalez-Barderas, M., Gallego-Delgado, J., Mas, S., Duran, M.C., Lázaro, A., Hernandez-Merida, S., Egido, J., Vivanco, F.(2004). Isolation of circulating human monocytes with high purity for proteomic analysis. *Proteomics*, 4(2):432-7. PubMed PMID: 14760713.

Greenland P, Knoll MD, Stamler J, et al. Major Risk Factors as Antecedents of Fatal and Nonfatal Coronary Heart Disease Events. *JAMA*. 2003;290(7):891–897. doi:10.1001/jama.290.7.891

Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Taylor, K.M., Sohail, M., Krausz, T., Pepys, M.B. (1999). C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*, 190(12):1733-40. PubMed PMID: 10601349.

- Hage, F.G., Szalai, A.J. (2007). C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol*, 50(12):1115-22. Review. PubMed PMID: 17868801.
- Hansson, G.K., Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology*, 6(7), 508-519. Review. PubMed PMID: 16778830
- Harrison, D. (1997). Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997; 20 (Suppl. II): II11-II17.
- Hingorani, A.D., Shah, T., Casas, J.P. (2006). Linking observational and genetic approaches to determine the role of C-reactive protein in heart disease risk. *Eur Heart J*, 27(11), 1261–3. doi.org/10.1093/eurheartj/ehi852.
- Hoekstra, T., Geleijnse, J.M., Schouten, E.G., Kluft, C. (2004). Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb Haemost*, 91(5):861-72. Review. PubMed PMID: 15116245.
- INEGI. Estadísticas de mortalidad, 2011. 23. Secretaria de Salud. Boletín de información estadística.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. (2005). Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gac Sanit*, 19: 333-41. DOI: 10.1157/13078029
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. (2004). C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension*, 44(1), 6–11. Brief Reviews. PubMed PMID: 15148294.

- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., Hansson, G.K. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, 6(2):131-8. PubMed PMID: 2937395.
- Kathiresan, S., Larson, M.G., Vasani, R.S., Guo CY, Gona P, Keaney JF Jr., et al. (2006). Contribution of clinical correlates and C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation*, 113, 1415–23.
- Kathiresan, S., Larson, M.G., Vasani, R.S., Guo, C.Y., Gona, P., Keaney, J.F.,... Benjamin E.J. (2006). Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation*, 113(11):1415-23. PubMed PMID: 16534007.
- Kettunen, T., Eklund, C., Kähönen, M., Jula, A., Päivä, H., Lyytikäinen, L.P., ...Lehtimäki, T. (2011). Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. *Scand J Clin Lab Invest*, 71(5), 353-61. doi:10.3109/00365513.2011.568123.
- Kettunen, T., Eklund, C., Kähönen, M., Jula, A., Päivä, H., Lyytikäinen, L.P., Hurme, M., Lehtimäki, T. (2011). Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. *Scand J Clin Lab Invest*. 71(5), 353-61. doi: 10.3109/00365513.2011.568123.
- Kluft C, de Maat MP. (2003). Genetics of C-reactive protein: new possibilities and complications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1956–9.
- Koenig W. (2013). High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy. *Int J Cardiol*, 168(6), 5126-34. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.113.

- Kolz, M., Koenig, W., Müller, M., Andreani, M, Greven, S., Illig, T., ...Peters, A. (2008). DNA variants, plasma levels and variability of C-reactive protein in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study, *European Heart Journal*, 29(10), 1250–1258, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm442>
- Kramer, F., Torzewski, J., Kamenz, J., Veit, K., Hombach, V., Dedio, J., Ivashchenko, Y. (2008). Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop. *Mol Immunol.*;45(9):2678-89. doi: 10.1016/j.molimm.2007.12.017.
- Kushner, I., Rzewnicki, D., Samols, D. (2006). What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med*, 119(2):166.e17-28. Review. PubMed PMID: 16443421.
- Lagrand, W.K., Niessen, H.W., Wolbink, G.J., Jaspars, L.H., Visser, C.A., Verheugt, F.W., Meijer, C.J., Hack, C.E. (1997). C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*, 95(1), 97-103. PubMed PMID: 8994423.
- Lange, L.A., Carlson, C.S., Hindorff, L.A., Lange, E.M., Walston, J., Durda, J.P., ...Reiner A.P.(2006). Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA*, 296, 2703–11.
- Ledue, T.B., Rifai, N. (2003). Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clin Chem*. 49(8):1258-71. Review. PubMed PMID: 12881440
- Li, A.C., Glass, C.K. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*, 8(11):1235-42. Review. PubMed PMID: 12411950.

- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917):868-74. Review. PubMed PMID: 12490960.
- Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105:1135-43
- Liu, Z.Z., Lv, H., Gao, F., Liu, G., Zheng, H.G., Zhou, Y.L., Wang, Y.J., Kang, X.X. (2008). Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, serum concentrations of CRP, and the difference between intracranial and extracranial atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 389(1-2):40-4. Epub 2007 Nov 29. PubMed PMID: 18083122
- López-Jaramillo, P., López-López, J. (2010). Lessons learned from two large epidemiological studies of Cardiovascular and cerebrovascular diseases in which Colombia took part. *Rev Colom Cardiol* ;17:195-200.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, 14(7):455-63. Review. PubMed PMID: 1445287.
- Miller, D.T., Zee, R.Y., Suk, D. J., Kozlowski, P., Chasman, D.I., Lazarus, R., ...Kwiatkowski, D.J. (2005) Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet*; 69, 623–38.
- Montero, H.E., Rodríguez, L.B., Blanco, G.V., Vidal, S.M., Mata, M. (2010). Enfoque diagnóstico y terapéutico del síndrome coronario agudo, *Medisan* 14 (1). 79–89.
- Mori, T., Sasaki, J., Kawaguchi, H., Handa, K., Takada, Y., Matsunaga, A.,...Arakawa, K. (1995). Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis. *Am Heart J*, 129(2), 234-8.

Nordestgaard, B.G., Zacho, J. (2009). Lipids, atherosclerosis and CVD risk: is CRP an innocent bystander?. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19(8), 521-4. doi:10.1016/j.numecd.2009.07.005.

Organización Mundial de la Salud, 2015

Pagano, M., Gauvreau, K. (2018). Principles of Biostatistics. New York: Chapman and Hall/CRC.

Pai, J.K., Mukamal, K.J., Rexrode, K.M., Rimm, E.B. (2008). C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms, CRP levels, and risk of incident coronary heart disease in two nested case-control studies. *PLoS One*, 3(1), e1395. doi: 10.1371/journal.pone.0001395.

Pankow, J.S., Folsom, A.R., Cushman, M, et al. (2001). Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*, 154, 681–9.

Pankow, J.S., Folsom, A.R., Cushman, M., Borecki, I.B., Hopkins, P.N., Eckfeldt, J.H., Tracy, R.P. (2001). Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis*. 154(3):681-9. PubMed PMID: 11257270.

Parnet, S., Glass, T.J., y Glass, R.M. (2004). JAMA patient page. Coronary artery disease. *JAMA*; 292, 2540.

Pereira-Rodríguez, J., Peñaranda-Florez, D., Reyes-Saenz, A., Caceres-Arevalo, K., & Cañizarez-Pérez, Y. (2015). Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en América Latina: una revisión de la evidencia publicada de 2010 a 2015. *Revista mexicana de cardiología*, 26(3), 125-139. 18.

- Perry, T. E., Muehlschlegel, J. D., Liu, K.-Y., Fox, A. A., Collard, C. D., Body, S. C., ... the CABG Genomics Investigators. (2009). C-Reactive protein gene variants are associated with postoperative C-reactive protein levels after coronary artery bypass surgery. *BMC Medical Genetics*, *10*, 38. <http://doi.org/10.1186/1471-2350-10-38>.
- Reynoso-Villalpando, G.L., Padilla-Gutiérrez, J.R., Valdez-Haro, A., Casillas-Muñoz, F., Muñoz-Valle, J.F., Castellanos-Nuñez, E., Chávez-Herrera, J.C., Valle, Y. (2017). Relationship Between C-Reactive Protein Serum Concentration and the 1846 C>T (rs1205) Polymorphism in Patients with Acute Coronary Syndrome from Western Mexico. *Genet Test Mol Biomarkers*, *21*(5):334-340. doi: 10.1089/gtmb.2016.0312.
- Ridker, P.M. (2003). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, *107*(3), 363-9. Review. PubMed PMID: 12551853.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*, *340*, 115-26.
- Sandoval-Pinto, E., Padilla-Gutierrez, J.R., Valdes-Alvarado, E., Garcia-Gonzalez, I.J., Valdez-Haro, A., Munoz-Valle, J.F. *et al.* (2016). Association of the -1031 T>C polymorphism and soluble TNF-alpha levels with Acute Coronary Syndrome. *Cytokine*; *78*, 37-43.
- Shen, C., Sun, X., Wang, H., Wang, B., Xue, Y., Li, Y., Chen, J., Jiang, Y. (2013). Association study of CRP gene and ischemic stroke in a Chinese Han population. *J Mol Neurosci*, *49*(3):559-66. doi: 10.1007/s12031-012-9856-8.
- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., et al.(2002) Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, *417*, 750-4.

- Skåléen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hultén, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., Borén, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417(6890):750-4. PubMed PMID: 12066187.
- Stroes, E., Rabelink, T. (1997). Hyperlipidemia and endothelial function. In: Born, G.V.R., Schwartz, C.J. (Eds.). *Vascular endothelium: Physiology, pathology and therapeutics opportunities*. Stuttgart- New York: Schattauer, p. 311-28.
- Thompson, D., Pepys, M.B., Wood, S.P. (1999). The physiological structure of human C reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure*. 7(2), 169- 77. PubMed PMID: 10368284.
- Tjörvi, E. P., Jochen, D. M., Kuang-Yu, L, Amanda, A. F., Charles, D.C., Simon, C. B., Stanton K.S. (2009). C-Reactive protein gene variants are associated with postoperative C-reactive protein levels after coronary artery bypass surgery. *BMC Medical Genetics*, 10(38). sp
- Torzewski, J. (2005). C-Reactive Protein and Atherogenesis: New Insights from established Animal Models. *The American Journal of Pathology*, 167(4), 923–925.
- Tremoli, E., Camera, M., Maderna, P., Sironi, L., Prati, L., Colli., S.,... Mussoni, L. (1993). Increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured human endothelial cells exposed to native and modified LDLs. An LDL receptor-independent phenomenon. *Arterioscler Thromb*, 13, 338-46.
- Vargas-Alarcón, G., Fragoso, J.M., Delgadillo, H. (2011). Acute coronary syndrome. Physiopathology and genetics. *Rev. Invest. Clín*, 63 (1), 64–74.
- Velázquez Monroy, O., Barinagarrementeria Aldatz, F. S., Rubio-Guerra, A. F., Verdejo, J., Méndez-Bello, M. A., Violante, R., ... Lara-Esqueda, A. (2007). Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. 2005. *Archivos de cardiología de México*, 77(1), 31-39

- Vilariño, J.O., Esper, R.J., y Badimon, J.J. (2004). Fisopatología de los Síndromes Coronarios Agudos. Tres paradigmas para un solo dogma. *Rev Española Cardiol*, 4 (suppl G), 13G–24G
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., McGeer, P.L. (2001). Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 158(3), 1039-51. PubMed PMID: 11238052.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F.,... Lisheng, L. (2004). INTERHEART Study Investigators. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*;364(9438):937-52. PubMed PMID: 15364185.
- Zakynthinos, E., Pappa, N. (2009). Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol*, 53(3):317-33. doi: 10.1016/j.jjcc.2008.12.007.
- Zhao, Y., Wang, H., Liu, S, Zhao, X., Chen, Y., Yang, Y *et al.* (2013). Association study of CRP gene polymorphism and hypertension in Han Chinese population. *Gene*, 512(1), 41–46.
- Zimmermann, O., Li, K., Zaczekiewicz, M., Graf, M., Liu, Z., & Torzewski, J. (2014). C-Reactive Protein in Human Atherogenesis: Facts and Fiction. *Mediators of Inflammation*, 561428. <http://doi.org/10.1155/2014/561428>

XII. ANEXOS



Hospital Regional de Alta Especialidad "Ciudad Salud"
Cardiología y Laboratorio de investigación



PERFIL GENÓMICO DEL PROCESO INFLAMATORIO DE LAS ENFERMEDADES CORONARIAS CARDIOVASCULARES EN EL SURESTE DE MÉXICO.

Clave del paciente: _____
Fecha: _____

Nombre del paciente: _____
Cedula: _____ Sexo: (M) (F).
Edad (Años): _____ Peso (Kg.): _____ Talla (m): _____
Dirección: _____ Teléfono: _____
Localidad: _____ Municipio: _____
Teléfono de amigo: _____

MOTIVO DE INGRESO:

Angina inestable: _____
IAM previo: _____
Sano: _____
Lugar de envió y tratamiento: _____

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES

Antecedentes de SICA: (SI) (NO) Quién: _____
Diabetes: (SI) (NO) Quién: _____
Obesidad: (SI) (NO) Quién: _____
Hipertensión: (SI) (NO) Quién: _____





DIAGNOSTICO

SCA desnivel neg del segmento ST: _____

SCA con elevación del segmento ST: _____

Infarto anterior: _____

Infarto inferior: _____

Ventriculo derecho: _____

Kill y Kimball: _____

CUADRO CLINICO

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: _____

ECOCARDIOGRAFIA

DDVI: _____ DSVI: _____ FE: _____

DISF/DIAST: _____ OTROS: _____

Se ha hecho pruebas bioquímicas:(SI) (NO)

Hace cuanto tiempo: _____



CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL PROYECTO

Perfil genómico del proceso inflamatorio de las enfermedades coronarias cardiovasculares en el sureste mexicano

Se me ha invitado a participar en el estudio anteriormente mencionado como paciente (o sujeto control). Estoy informado (a) que se me aplicará un cuestionario con preguntas a cerca de sus antecedentes médicos y hábitos de vida, que extraerán una muestra de sangre que se utilizará para investigar la presencia de algunos de los polimorfismos de marcadores inflamatorios.

Los datos y resultados obtenidos serán totalmente confidenciales y en ningún momento se violará mi privacidad. Los estudios realizados de mi sangre son totalmente gratuitos. La participación en esta investigación no implica ningún riesgo para mi salud y que los beneficios obtenidos contribuirán en el conocimiento y la prevención de enfermedades cardiovasculares a través de la implementación de nuevas medidas preventivas, diagnósticas y de tratamiento.

Estoy enterado(a) que tengo el derecho de solicitar cualquier aclaración sobre alguna duda o resultado de la investigación en cualquier momento del desarrollo de la misma. Además estoy en la libertad de retirarme del estudio en el momento que yo desee. En caso de que tenga alguna duda o pregunta me puedo dirigir con el Dr. Luis Miguel Canseco Ávila, responsable del proyecto.

_____ Nombre y firma (huella) PARTICIPANTE DIRECCIÓN: _____ _____	_____ Nombre y firma (huella) TESTIGO DIRECCIÓN: _____ Parentesco con el paciente: _____
---	--

_____ Nombre y firma (huella) TESTIGO DIRECCIÓN: _____ Parentesco con el paciente: _____	_____ Nombre y firma RESPONSABLE DE LA INVESTIGACIÓN
--	---

Material de consumo

Para la toma de muestras sanguíneas se utilizaron tubos Vacutainer de 5 ml de capacidad; sin anticoagulante con gel separador de suero (tubos con tapa amarilla), y con coagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (tubos con tapa morada).

Para la extracción de ADN genómico se empleó el Kit comercial QIAmp DNA Mini Kit de la marca QIAGEN (Austin, Texas, USA) y etanol absoluto de la marca Meyer.

La genotipificación se llevó a cabo mediante las reacciones de qPCR y se utilizó el estuche comercial TaqMan® Genotyping Master Mix de la marca applied Biosystems (Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.). El ensayo de genotipificación, las mezclas preformuladas que contienen un conjunto de sondas y cebadores, fueron TaqMan® predesigned SNP Genotyping (Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA).

El material de plástico desechable empleado fue MicroAmp® Optical 8 Cap Strip, y MicroAmp® Fast 8-Tube Strip (Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.), se emplearon guantes de látex sin polvo de nitrilo de la marca Ambiderm Nitrilo Soft (Álvaro Obregón, México, DF).

Equipo

Se empleó una microcentrífuga refrigerada Prism R de la marca Labnet modelo C2500-R (Woodbridge, New Jersey 08837, USA); un vortex Genie 2 de la marca Scientific Industries, Inc. (70 Orville Drive, Bohemia, New York 11716 USA); un fotómetro para la cuantificación de las muestras de ADN de la marca eppendorf bio-photometer (Westbury, New York, USA). Las reacciones de RCP se prepararon en una campana de RCP y se emplearon micropipetas de volumen variable de la marca Accumax modelo Pro (Gandhinagar, Gujarat - India). La genotipificación de las muestras se realizó en el termociclador StepOne™ Real-Time PCR System de la marca Applied Biosystems (Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA).

Extracción del ADN genómico

El proceso de extracción de ADN genómico se realizó mediante la técnica del Kit Comercial QIAamp DNA Mini Kit con el siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf se colocó 20 µl de proteinasa K, 200 µl de muestra y 200 µl de buffer AL
2. Agitar en el vortex por 15 segundos
3. Incubar 10 minutos a 56°C
4. Si en la tapa quedan residuos centrifugar a 8000 rpm por 1 min
5. Agregar 200 µl de etanol al 100%
6. Agitar en el vortex por 15 segundos
7. Centrifugar 1minuto a 8000 rpm
8. Pasar la fase acuosa a la columna
9. Centrifugar 1minuto a 8000 rpm
10. Cambiar la columna a otro tubo y desechar el filtrado
11. Agregar 500 µl de AW1
12. Centrifugar 1minuto a 8000 rpm
13. Cambiar la columna a otro tubo y desechar el filtrado
14. Agregar 500 µl de AW2
15. Centrifugar a 14000 rpm por 3minutos
16. Cambiar la columna a otro tubo y desechar el filtrado
- 17.- Agregar 200 µl de AE, e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto
- 18.- Centrifugar 1minuto a 8000 rpm de 15 a 25°C
- 19.- Guardar la columna y utilizar el sobrenadante (ADN).

Preparación de geles de agarosa al 0.8%

1. Se pesó 0.8 gr de agarosa para la preparación de geles al 0.8%.
2. En un matraz se colocará 100 ml de solución amortiguadora de TAE al 0.5% (Tris-Acetato-EDTA).
3. Se mezcló la agarosa con la solución amortiguadora y se calentó en horno de microondas hasta disolverla.

4. Se colocó en los soportes especiales para la preparación de geles, una vez vertidos ahí se procedió a esperar que solidificaran.

Electroforesis y tinción

Se empleó esta técnica para la separación de los ácidos nucleicos en base a su peso molecular por medio de la técnica de electroforesis. Para esta separación se utilizó un gel de agarosa a una concentración al 0.8%, donde las moléculas migran a través de los poros del gel. Este corrimiento se realizó a un voltaje de 80 Volts durante aproximadamente 90 min. Al terminar el corrimiento electroforético, el gel fue teñido en una solución reveladora de Bromuro de Etidio colocándolo de 3 a 5 min. Para la visualización de las bandas de los ácidos nucleicos se colocó el gel en un foto-documentador de luz UV (UVISAVE gel documentation system Modelo GAS9200 Versión 12).

Cuantificación

Una vez realizada la observación en el foto-documentador de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras de las poblaciones en estudio, se procedió a cuantificarlas por medio del equipo eppendorf bio-photometer, esto para conocer la concentración de DNA en cada una de ellas y así tenerlas todas a una concentración homogénea y requerida en el protocolo estandarizado por el proveedor de Applied Biosystems, esto con el fin de realizar la genotipificación de los polimorfismos a estudiar.

Procesamiento y genotipificación de los polimorfismos del gen de la proteína C reactiva.

A partir del ADN de cada uno de los participantes se procedió a realizar los ensayos de genotipificación por qPCR en su modalidad de discriminación alélica, siguiendo el protocolo estándar descrito por el proveedor (compañía Applied Biosystems)..

Condiciones de amplificación para la genotipificación de los polimorfismos

La genotipificación de los polimorfismos se llevó a cabo a través de la técnica estandarizada por el proveedor (compañía Applied Biosystems).

Preparación para la reacción de qPCR de genotipado

A). Se utilizaron dos controles negativos (NTC) y por lo menos un control de ADN de genotipo conocido en cada placa para asegurarse de nombrar el genotipo exacto.

B) Se calculó el volumen de cada componente necesario para todos los pozos en cada ensayo, con base en el número de reacciones.

Cuadro No 1. Preparación de la mezcla de reacción

Volúmenes de mezcla para la reacción de RCP (μl /pocillo)						
Componente	Método ADN Húmedo			Método ADN Seco		
	5 μl	10 μl	25 μl	5 μl	10 μl	25 μl
TaqMan Genotyping Master Mix (2x)	2.5	5.0	12.5	2.5	5.0	12.5
TaqMan Genotyping Assay Mix (20x)	0.25	0.5	1.25	0.25	0.5	1.25
DNase-free, RNase-free water	(none)	(none)	(none)	2.25	4.5	11.25
Volumen Total	2.75	5.5	13.75	5.0	10.0	25.0

Preparar la placa de reacción

Para la reacción de genotipado se empleó el método seco, para el cual se transfirió en cada pozo 1 μl de muestra de ADN genómico purificado o control, previamente cuantificado. Posteriormente se colocarán 9 μl de la mezcla de reacción de RCP en cada pozo. Para obtener una reacción con volumen total de 10 μl .

Ejecutar la corrida de la placa de qPCR

A) Se establecieron las condiciones de ciclos térmicos de la siguiente manera:

Cuadro 2. Ciclos de reacción.

Pasos	Temperatura (°C)	Duración	Ciclos
Ampli Taq Gold®, hasta la activación de la enzima	95	10 min	En espera
Desnaturalizar	95	15 seg	40
Alineamiento/Extendido	60	1 min	

B) En el documento de la placa se debe de comprobar que el modo de ciclo rápido térmico no está seleccionada e introducir el volumen correcto de la muestra total (5µl, 10µl o 25µl).

Lectura y análisis de resultados

Se realizó una placa de punto final, leer y analizar los resultados utilizando el Software de sistema 7500 Fast Real Time. Exportar los resultados a un documento de Excel, para su análisis estadístico.