



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



CAMPUS IV

TESIS

Polimorfismo -148 C/T y niveles elevados de fibrinógeno como biomarcador de enfermedad coronaria cardiovascular.

Que para obtener el grado de
maestro en ciencias en bioquímica clínica

PRESENTA:

Amilcar López Ochoa PS287

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Luis Miguel Canseco Ávila

TAPACHULA, CHIAPAS ABRIL 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS, C. IV
DIRECCION



OFICIO No. DFCQ/088/2022
TAPACHULA, CHIS., A 02 DE
MARZO DEL 2022

C. QFB. AMILCAR LOPEZ OCHOA
PASANTE DE LA MAESTRIA EN
CIENCIAS EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T E.-

DE ACUERDO A LA RESPUESTA QUE EMITIERON LOS
SINODALES QUE REVISARON EL PROYECTO DE TESIS PROFESIONAL
TITULADO: **“POLIMORFISMO -/148 C/T Y NIVELES ELEVADOS DE
FIBRINOGENO COMO BIOMARCADOR DE ENFERMEDAD CORONARIA
CARDIOVASCULAR”**. ME ES GRATO INFORMARLE QUE SE LE AUTORIZA LA
IMPRESIÓN DE LA MISMA.

ASI COMO TAMBIEN, ME PERMITO INFORMAR A USTED QUE DE
ACUERDO AL ARTÍCULO 119 DEL REGLAMENTO GENERAL DE
INVESTIGACION Y POSGRADO DE ESTA UNIVERSIDAD EL JURADO
ASIGNADO PARA SU EXAMEN PROFESIONAL QUEDA INTEGRADO DE LA
SIGUIENTE MANERA:

DR. LUIS MIGUEL CANSECO	PRESIDENTE
M.C. ELEAZAR SERRANO GUZMAN	SECRETARIO
M.C. ROCIO STEPHANIA GUERRERO BAEZ	VOCAL
M.C. ALEXANDER LOPEZ ROBLERO	SUPLENTE
DR. JAVIER AGUILAR FUENTES	SUPLENTE

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”


DR. LUIS MIGUEL CANSECO AVILA
DIRECTOR
AUTONOMA
CAMPUS IV
Facultad de Ciencias Químicas
DIRECCION
Tapachula de Córdova
y Ordóñez, Chiapas.

c.c.p. Exp. alumno
Imca/ibf

INDICE

Índice de tablas	1
Índice de Figuras	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	5
Patofisiología de las ECC.....	5
Figura 1.- Esquema de la Patofisiología de la enfermedad coronaria	7
Factores De Riesgo De Los SCA.	7
Figura 2.- Factores de riesgo de enfermedad coronaria.....	9
Genética y Enfermedad Cardiovascular	9
Fibrinógeno: Estructura Y Fisiología	10
Figura 3.- Patofisiología del Fg en el SCA.....	12
Factores Que Modifican El Fibrinógeno	12
Factores Exógenos	12
Factores Endógenos	15
Figura 4.- Esquema del agrupamiento genético del Fg	15
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS.....	19
a) General	19
b) Específicos	19
METODOLOGÍA.....	20
a) Área de estudio	20
b) Tipo de estudio.....	20
c) Población de estudio.....	20
d) Tamaño de muestra y tipo de muestreo	20
e) Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	20
f) Técnicas de laboratorio utilizadas.....	21
Extracción de ADN en sangre	21
PCR punto final del polimorfismo -148C/T.....	23
Tabla 1.- Oligonucleótidos, secuencias y tamaño de amplificación.....	23
Condiciones De Amplificación	23

Tabla 2.- Condiciones De PCR.....	23
Tabla 3.- Programa De Amplificación Para Los Polimorfismos.....	24
Temperatura Tiempo	24
Polimorfismos de Longitud De Los Fragmentos De Restricción (Rflp's) para detección del polimorfismo.	24
Tabla 4.- Reacción De Digestión Para Los Polimorfismos.....	24
Tabla 5. Fragmentos obtenidos por los cortes enzimáticos con HIND III.	25
g) Variables de estudio y análisis estadístico	25
Tabla 6. Clasificación de las variables	25
Resultados.....	27
Figura 5. Lugares de procedencia de los sujetos controles.....	27
Figura 6. Lugares de procedencia de los pacientes	27
Características Demográficas Y Clínicas De Los Sujetos.....	28
Tabla 7.- Características Basales De La Población De Estudio.	28
Figura 7. Amplificación de la región del gen del fibrinógeno	29
Figura 8. Digestión enzimática del Polimorfismo -148 C/T con Hind III.....	29
Tabla 8. Asociación del polimorfismo -148 C/T con ECC.	30
Tabla 9. Comparación de los parámetros bioquímicos y hematológicos.	31
Discusión	32
Bibliografía.....	33

Índice de tablas

Tabla 1.- Oligonucleótidos, secuencias y tamaño de amplificación.

Tabla 2.- Condiciones De PCR.

Tabla 3.- Programa De Amplificación Para Los Polimorfismos.

Tabla 4.- Reacción De Digestión Para Los Polimorfismos.

Tabla 5. Fragmentos obtenidos por los cortes enzimáticos con HIND III.

Tabla 6. Clasificación de las variables.

Tabla 7.- Características Basales De La Población De Estudio.

Tabla 8. Asociación del polimorfismo -148 C/T con ECC.

Tabla 9. Comparación de los parámetros bioquímicos y hematológicos.

Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema de la Patofisiología de la enfermedad coronaria

Figura 2.- Factores de riesgo de enfermedad coronaria

Figura 3.- Patofisiología del Fg en el SCA

Figura 4.- Esquema del agrupamiento genético del Fg

Figura 5. Lugares de procedencia de los sujetos controles

Figura 6. Lugares de procedencia de los pacientes

Figura 7. Amplificación de la región del gen del fibrinógeno

Figura 8. Digestión enzimática del Polimorfismo -148 C/T con Hind III

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades coronarias cardiovasculares (ECC) son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Constituyen las principales causas de enfermedad prevenible, de discapacidad y de mortalidad, se espera que su incidencia se incremente durante las siguientes décadas. En 2015 ocurrieron cerca de 18 millones de defunciones por ECC a nivel mundial; lo que se considera que puede incrementarse a 25 millones para 2020. Aunque las defunciones por ECC aumentaron un 12,5 % entre 2005 y 2015, las tasas estandarizadas de mortalidad disminuyeron un 15,6 %. Se ha presentado además un desplazamiento de la carga de mortalidad de los países de ingresos altos a aquellos de ingresos medios y bajos debido a: una combinación de factores demográficos (como un rápido crecimiento poblacional y un proceso de envejecimiento); procesos de urbanización; la globalización de comportamientos de riesgo cardiovascular que ha traído como consecuencia tendencias epidemiológicas divergentes. Lo que se refleja en una disminución de factores de riesgo cardiovascular (como obesidad y sobrepeso, tabaquismo, dislipidemia, hipertensión arterial y diabetes) en países de altos ingresos, mientras que, en los países de ingresos medios y bajos, como México, se han incrementado. En México, las ECC son el principal grupo de causas de muerte desde 1990, la mayor mortalidad se ha observado en los hombres y son consideradas las principales causas de años de vida perdidos en el país. Se ha visto que más del 60 % de la población adulta en México presenta al menos algún factor de riesgo de ECC (tabaquismo, obesidad y sobrepeso, hipertensión, diabetes o dislipidemia), que junto al proceso de envejecimiento de la población genera, por sí solo, un incremento de enfermedades asociadas a la edad (como son las ECC). Por otra parte, es importante determinar el patrón de riesgo en el porcentaje restante que no presentan ningún factor de riesgo ambiental antes mencionado, por lo que es importante dar un

vistazo a los factores genéticos (polimorfismos de una sola base) como el principal actor en el desarrollo de esta patología y de este modo estratificar a los pacientes de riesgo a infarto. Esto provee un panorama futuro en que la mortalidad por estas causas tendrá una tendencia al aumento en los próximos años. Dado este contexto, el análisis de la mortalidad por ECC en México se vuelve prioritario, para lo que se debe medir su impacto en la salud de la población. Factores de riesgo como la genética ha sido ampliamente investigada en poblaciones norteamericanas, europeas y asiáticas como factor asociado al desarrollo de la ECC generando resultados de asociación en el desarrollo de la patología, en el presente trabajo se analizará la asociación del polimorfismo -148C/T y los niveles de fibrinógeno con la ECC para establecer su asociación como factor de riesgo de la ECC.

MARCO TEÓRICO

Las Enfermedades Coronarias Cardiovasculares (ECV) son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Constituyen las principales causas de enfermedad prevenible, de discapacidad y de mortalidad¹ se espera que su incidencia se incremente durante las siguientes décadas.¹ En 2015 ocurrieron cerca de 18 millones de defunciones por ECV a nivel mundial; lo que se considera que puede incrementarse a 25 millones para 2020.² Aunque las defunciones por ECV aumentaron un 12,5 % entre 2005 y 2015, las tasas estandarizadas de mortalidad disminuyeron un 15,6 %.

En México, las ECV son el principal grupo de causas de muerte desde 1990, la mayor mortalidad se ha observado en los hombres y son consideradas las principales causas de años de vida perdidos en el país.³ Se ha visto que más del 60 % de la población adulta en México presenta al menos algún factor de riesgo de ECV (tabaquismo, obesidad y sobrepeso, hipertensión, diabetes o dislipidemia),⁴ que junto al proceso de envejecimiento de la población genera, por sí solo, un incremento de enfermedades asociadas a la edad (como son las ECV).⁵ Esto provee un panorama futuro en que la mortalidad por estas causas tendrá una tendencia al aumento en los próximos años.

Patofisiología de las ECC

La patofisiología de las enfermedades coronarias se puede dividir en cinco etapas:

1) En presencia de un exceso de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL del inglés) en el torrente circulatorio, se estimula la entrada de estas a la íntima del endotelio y se oxidan. Entonces las LDL modificadas estimulan a las células endoteliales para que presenten moléculas de adhesión, las cuales atrapan a monocitos y células T. Además, las células endoteliales

también secretan quimiocinas que atraen a las moléculas atrapadas a la túnica de la íntima. **2)** En la túnica íntima, los monocitos maduran a macrófagos activos. Éstos y las células T producen mediadores inflamatorios quimiotácticos, incluyendo citocinas y factores de crecimiento celular. Los macrófagos también expresan receptores de LDL, que les ayudan a fagocitar a estas lipoproteínas. **3)** Los macrófagos las ingieren y se llenan de LDL oxidadas, lo cual les da un aspecto espumoso (por lo que se denominan células espumosas) y las células T forman las líneas de grasa de los conductos sanguíneos (la forma más temprana de la placa aterosclerótica). **4)** Las moléculas inflamatorias pueden promover el crecimiento de la placa y la formación de una capa fibrosa sobre el núcleo lipídico. Ésta se desarrolla cuando las moléculas inducen a que las células del músculo liso de la capa media, migren a la parte superior de la túnica íntima, se multipliquen y produzcan una matriz fibrosa firme que adhiere a las células entre sí. La capa fibrosa se añade al tamaño de la placa, pero las paredes la mantienen estable, segura y separada de la sangre. **5)** Más tarde, las sustancias inflamatorias secretadas por las células espumosas actúan debilitando peligrosamente la capa fibrosa mediante la digestión de las moléculas de la matriz y llegan a dañar a las células del músculo liso, las cuales, en determinadas circunstancias, fallan en la reparación de la placa. Mientras tanto, las células espumosas quizá expresen el factor tisular, un potente promotor de la formación de coágulos. Si la placa debilitada se rompe, el factor tisular interactuará con los elementos promotores de la formación de coágulos, presentes en la sangre, produciendo un trombo o coágulo. Para que estas lesiones produzcan síntomas debe de obstruirse más de la mitad del lumen de la placa que suele ocurrir sobre la 5ª o 6ª década de la vida en varones y unos 10 años más tarde en las mujeres. Si ésta es lo suficientemente grande, bloqueará el flujo sanguíneo, produciendo la muerte del tejido cardiaco (Figura 1).

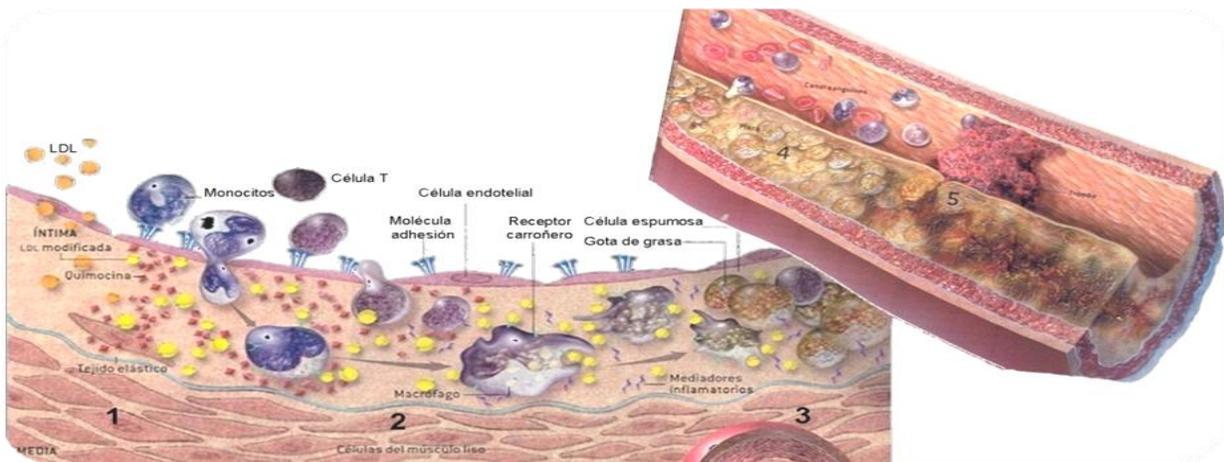


Figura 1.- Esquema de la Patofisiología de la enfermedad coronaria.

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

Factores De Riesgo De Los SCA.

La génesis de la trombosis intravascular depende de una compleja interrelación entre estímulos locales, factores sistémicos trombogénicos y de inflamación, los cuales pueden contribuir a la extensión y persistencia de la trombosis coronaria, a la presencia de eventos cardiovasculares adversos⁵ y a los fracasos del tratamiento en la fase aguda (la reperfusión aguda y terapia antitrombótica fallan en un 30% de los casos).⁶⁻¹⁰

Evidencias recientes sugieren que los factores hemostáticos y de inflamación pueden ser variables independientes, de eventos adversos, cuando se hacen seguimientos de hasta cuatro años¹¹⁻¹⁴.

De manera que se ha establecido que en la patogenia de la enfermedad coronaria están implicados cuatro procesos que conllevan al problema común, y estos son:

- a) la aterosclerosis
- b) la inflamación,
- c) la disfunción endotelial
- d) la trombosis (que implica la formación y lisis del coágulo).

Dentro de estos procesos, se han descrito múltiples factores, tanto ambientales como genéticos, que han sido implicados en la iniciación, progresión y perpetuación de la enfermedad coronaria (Figura 2).

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

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

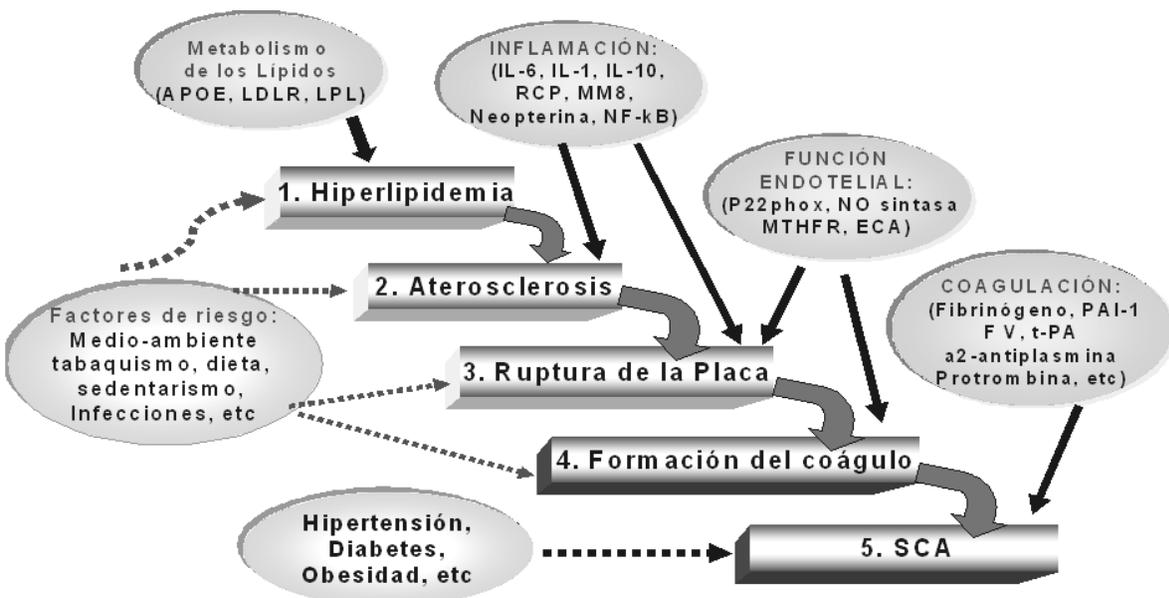


Figura 2.- Factores de riesgo de enfermedad coronaria.

Se pueden observar del lado izquierdo los factores de riesgo ambientales y como participan en el desarrollo de la enfermedad. Del lado derecho se representan los cuatro procesos metabólicos implicados y algunos genes asociados en la Patofisiología de los ECC.

Genética y Enfermedad Cardiovascular

El inicio de la enfermedad coronaria ha sido objeto de estudio durante las últimas décadas; debido a que los factores de riesgo clásicos explican la mitad de los casos, se han buscado nuevos factores en el ámbito de la genética molecular.¹⁷

El Proyecto del Genoma Humano permitió el desarrollo de un catálogo de las variaciones encontradas en el genoma humano. Las secuencias de ADN comparten aproximadamente 99.9% de información idéntica. Del cual el 1% restante del genoma, también denominado *POLIMORFISMO* podría explicar el riesgo individual para ciertas enfermedades.

Cuando los cambios en el ADN son de una sola base, a estos polimorfismos se les denomina SNPs (del inglés Single Nucleotide Polymorphism).

Los Polimorfismos pueden ser factores de riesgo genéticos que al conjugarse con factores ambientales ocasionarían un aumento en el inicio de Patologías. Los recientes avances en biología molecular han facilitado la detección de numerosos polimorfismos y mutaciones que pueden estar implicados en la fisiopatogenia de la enfermedad coronaria y sus complicaciones.

Lo que ha hecho pensar en la hipótesis de que la suma de polimorfismos en un marco ambiental propicio podría facilitar la aparición de la enfermedad coronaria.

La trombosis incluye principales factores o causas como: daño en la pared vascular, alteración en el flujo de sangre y activación de la coagulación. Hoy se conoce que los

mecanismos anticoagulantes regulatorios actúan para neutralizar los procesos procoagulantes en la vasculatura y que una excesiva activación de la coagulación o inhibición de los mecanismos anticoagulantes llevan a un estado de hipercoagulabilidad y trombosis. En los últimos años se han referido decenas de marcadores genéticos asociados con la presencia de daño cardiovascular. Estos marcadores genéticos se han clasificado dependiendo de las rutas metabólicas; debido a la complejidad de dichas rutas se hace muy complicado el estudio de todos los factores de la enfermedad coronaria.^{15,18} hasta la fecha se han reconocido como las principales causas de trombofilia hereditaria: las deficiencias de antitrombina, de proteína C y proteína S, la resistencia a la proteína C activada, el factor V Leiden, la mutación G20210 A del gen de la protrombina (PG20210A). Un factor adquirido que habitualmente se explora en el estudio de laboratorio, junto a los anteriores, es la presencia de anticoagulante lúpico. Las causas mencionadas corresponden aproximadamente a 40% - 60% de las causas de trombofilia. Varias de ellas han sido reconocidas sólo en los últimos años, por lo que se presume que nuevos factores hereditarios de riesgo se sumarán en el futuro. Dentro de los cuales se ha encontrado la participación del fibrinógeno en la enfermedad cardiovascular, ya que, al ser la proteína de la coagulación más abundante en la circulación y principal componente del trombo, las variantes genéticas SNP presentan repercusiones que impactan sobre el riesgo a enfermedades cardiovasculares.

Fibrinógeno: Estructura Y Fisiología

El fibrinógeno es una glicoproteína circulante con un peso molecular de 340 kDa.¹⁹ su vida media es de aproximadamente 100 hrs y es sintetizada principalmente en el hígado y que tiene como funciones biológicas fundamentales la hemostasia y la reacción inflamatoria.²⁰

Es reconocido como componente fundamental en el estadio final de la cascada de la coagulación en respuesta a un daño vascular o tisular, sirviendo como sustrato cuando por la acción de la trombina produce los fragmentos solubles de fibrina, principales componentes de trombo hemostático.

Es considerado un marcador sistémico de la fase aguda, pudiendo aumentar su síntesis hepática en 4 veces en presencia de inflamación e infección y, además, también ha sido fuertemente correlacionado con la enfermedad aterosclerótica.²¹

Además de su papel en la trombosis, el fibrinógeno tiene un número importante de otras funciones que establecen su posible participación en la génesis y progresión de la enfermedad vascular aterosclerótica (Figura 3)¹⁹, incluidos:

- a) Regulación de la proliferación, quimiotaxis y adhesión celular.²²⁻²⁵
- b) Incremento de la vasoconstricción en los sitios de injuria de la pared vascular.²⁶
- c) Estimulación de la agregación plaquetaria.²⁷
- d) Por ejercer una acción determinante en la viscosidad sanguínea.²⁸

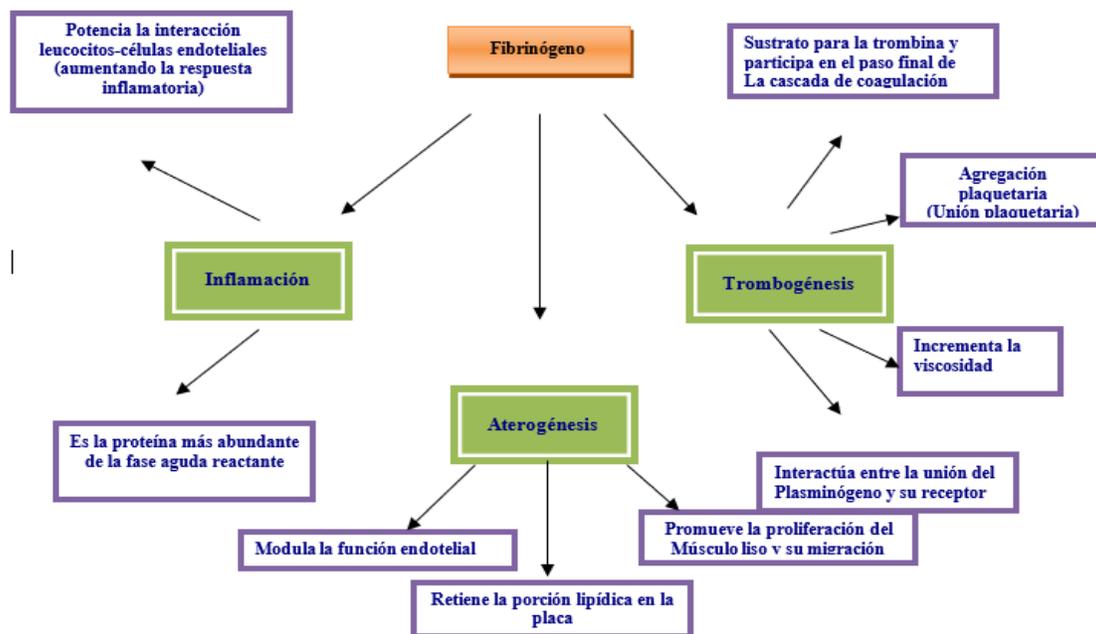


Figura 3.- Patofisiología del Fg en el SCA. Se esquematiza su participación en los tres mecanismos más importantes de la Patofisiología de la enfermedad cardiovascular: inflamación, aterogénesis y trombogénesis. Modificada de Kamath & Lip.²⁹

Factores Que Modifican El Fibrinógeno

Además de la relación que se ha demostrado entre los niveles de Fg y riesgo cardiovascular,^{30,31} algunos factores endógenos o exógenos pueden modificar su nivel:

Factores Exógenos

En un estudio que incluyó 6 075 hombres con edades superiores a los 45 años, se investigaron las posibles modificaciones que otras proteínas inflamatorias podrían ejercer sobre la asociación entre fibrinógeno y ECC durante un seguimiento medio de 16,5 años.

Elevaciones séricas de cualquiera de los otros marcadores inflamatorios estudiados en adición al cuartil superior del fibrinógeno, presentan una clara asociación y un aumento

significativo de la incidencia de eventos y muerte coronaria cuando se compara con la elevación aislada del fibrinógeno.

Entretanto esa incidencia fue similar en el cuartil superior del fibrinógeno aislado cuando fue comparado con el cuartil inferior combinado con elevaciones de otras proteínas inflamatorias dosificadas.³²

En esta misma cohorte de pacientes fue estudiada la interacción del fibrinógeno y otros marcadores de inflamación con los niveles de colesterol total y la incidencia de infarto agudo de miocardio (IAM) y accidente cerebrovascular (ACV).

En análisis multivariado, los niveles más elevados de colesterol (≥ 251 mg/dL) combinados con las concentraciones elevadas de proteínas inflamatorias, conferían el riesgo más alto para cualquiera de los eventos cardiovasculares principales; en tanto que el colesterol elevado en ausencia de aumento de los marcadores inflamatorios estaba solo asociado de forma moderada con el riesgo de eventos cardíacos, y no estaba asociado con ACV.³³

En el estudio cardiovascular de Québec, la interacción de Lp (a) y fibrinógeno fue investigada en 2 215 hombres con edades entre 46 y 76 años que fueron seguidos por 5 años.

Los individuos con valores por encima de los niveles medios de fibrinógeno ($\geq 4,05$ g/L) y con Lp (a) ≥ 300 mg/L presentaron el más alto nivel de riesgo de EAC con un riesgo relativo de 2,5 (intervalo de confianza de 95 %, 1,2-5,2).³⁴

Estos datos corroboran los conceptos de que la inflamación tiene participación capital en la aterotrombosis y en sus complicaciones, y que las determinaciones adicionales de fibrinógeno y de otros marcadores de la fase aguda pueden contribuir a la tentativa de predecir

el riesgo cardiovascular, más allá de la capacidad ya reconocida de los niveles de colesterol y los restantes factores de riesgo tradicionales.

En 1676 pacientes diabéticos, el fibrinógeno elevado ($\geq 3,64$ g/L) fue asociado con 75 % de incremento del riesgo de eventos coronarios.³⁵

En el estudio TIMI IIIB, el fibrinógeno fue medido en 1 473 pacientes en los que fueron computados los eventos de infarto de miocardio (IM), muerte e isquemia espontánea, separadamente, o para un evento combinado.

No hubo asociación entre el fibrinógeno pre tratamiento y el IM y muerte hospitalaria, pero para los eventos combinados en 10 d de internación, los pacientes con mayores concentraciones de fibrinógeno eran los más afectados.³⁶

El fibrinógeno aumentado fue claramente relacionado con la ocurrencia de angina inestable refractaria, con un incremento del riesgo en 3 veces para aquellos en el cuartil más elevado en comparación con el cuartil más bajo. Las asociaciones encontradas con la proteína C reactiva fueron discretamente menores que las relacionadas con el fibrinógeno en este estudio.³⁷

En el estudio PRIME, que incluyó 10 500 hombres saludables con edades entre 50 y 59 años, fueron demostradas las asociaciones positivas de fibrinógeno con la edad, el índice de masa corporal, la obesidad abdominal, el tabaquismo, la diabetes y el LDL-colesterol y las asociaciones negativas con consumo moderado de alcohol y el nivel educacional.³⁸

Factores Endógenos

Las variaciones plasmáticas del Fg parecen estar reguladas por polimorfismos (20% a 51%).^{39,40} Está compuesto por tres pares de polipéptidos alfa, beta y gamma; unidos por puentes disulfuro. Las tres cadenas polipeptídicas están codificadas por tres genes continuos localizados en el cromosoma 4 en el locus 4q23-q32 y su síntesis se regula por el polimorfismo de la cadena B (Figura 4).⁴¹

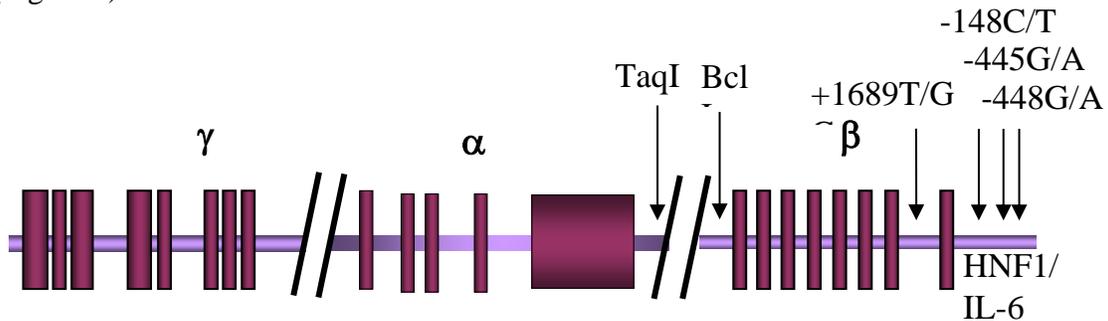


Figura 4.- Esquema del agrupamiento genético del Fg. Se observan los tres genes que dan lugar a las cadenas de la glicoproteína gamma alfa (α) y beta (β) y gamma (γ), así como los polimorfismos más frecuentes e importantes relacionados con los niveles del Fg y enfermedad cardiovascular. El dibujo no está a escala.^{25, 29}

Los estudios in Vitro sugieren que la síntesis de la cadena beta es el factor limitante de la producción de Fg y aparentemente algunos polimorfismos de este gen podrían estar asociados a niveles elevados de la proteína. Sin embargo, las asociaciones de algunos de estos polimorfismos con riesgo cardiovascular son en un subgrupo de poblaciones de poblaciones bien definidas.²⁶

ANTECEDENTES

En un meta análisis en el cual se evaluó la correlación entre los polimorfismos -148 C/T y -455 G/A de la cadena beta del gen del Fibrinógeno y su susceptibilidad para enfermedad coronaria en una población de China identificando 13 estudios de los que 7 son del polimorfismo -148 C/T y 9 para el polimorfismo -455 G/A. donde obtuvieron como resultado la ausencia de una asociación entre el polimorfismo -148 C/T y la susceptibilidad a la enfermedad de las arterias coronarias y así mismo la posibilidad de que el polimorfismo -455 G/A aumenta la posibilidad a esta enfermedad en la población china.⁴²

En la región de Han en Guangdong China, se llevó a cabo un estudio en el cual a 156 individuos se le analizaron los polimorfismos - 455 G/A, - 148 C/T, 448 G/A y su asociación con los niveles de fibrinógeno; encontrándose que los niveles plasmáticos de fibrinógeno de los tres polimorfismos del gen mutante son significativamente más altos que en el tipo normal.⁴³

En la población de Hainan Han se evaluaron nueve polimorfismos y su asociación con los niveles de fibrinógeno, en este estudio se hayo que los niveles de fibrinógeno fueron significativamente mayores en los grupos de genotipos -455GA y AA; -148 CT y TT; alfa TaqI T1T1, que en los otros grupos (P = 0,004, 0,015 y 0,043 respectivamente).⁴⁴

La mayor parte de los estudios se han enfocado a la asociación del polimorfismo en regiones asiáticas como se puede apreciar en los antecedentes, en México los análisis son escasos.

El único estudio reportado en México mostró que los niveles plasmáticos > 450 mg/dl y los polimorfismos -455 G/A y -148 C/T del Fg están asociados con eventos mayores cardiovasculares y enfermedad coronaria.³¹

JUSTIFICACIÓN

Las ECC ya no son reconocidas como enfermedades *Aterogénicas*, sino, como enfermedades *Inflamatorias*. Por lo que actualmente se reconoce que los marcadores bioquímicos de riesgo como el colesterol son insuficientes para determinar el riesgo cardiovascular, postulándose la necesidad de usar un marcador de inflamación para evaluar el riesgo de la enfermedad y la evolución de la misma.

Actualmente la Proteína C Reactiva (PCR) altamente sensible es el marcador de inflamación por excelencia de los norteamericanos y de muchos países del primer mundo; sin embargo, en México como en la mayoría de las naciones tercer mundistas no se cuenta con este marcador, como lo reporta el tercer registro mexicano de síndromes coronarios agudos en donde el 3% de los pacientes se les determino PCR pero cualitativa, este registro considera a investigadores en hospitales de segundo y tercer nivel de atención con conocimientos y experiencia en el diagnóstico, estratificación y el tratamiento de las ECC. Por lo que al tener este marcador en nuestra población es aún más complicado.

Por lo que el Fibrinógeno surge como un marcador inflamatorio reactante de fase aguda alterno, fácil, barato y accesible, el cual se realiza en la mayoría de todos los hospitales y laboratorios clínicos del país.

HIPÓTESIS

- ❖ El polimorfismo del gen del fibrinógeno -148 C/T inducen un aumento en los niveles plasmáticos de la proteína.
- ❖ Los niveles plasmáticos y polimorfismos del fibrinógeno son marcadores de riesgo para enfermedad coronaria cardiovascular.

OBJETIVOS

a) General

- ❖ Analizar los niveles de fibrinógeno y la asociación del polimorfismo -148 C/T como marcador de riesgo en la enfermedad coronaria.

b) Específicos

- ❖ Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismos -148 C/T en la población analizada.
- ❖ Determinar los niveles plasmáticos del fibrinógeno y determinar el riesgo de sufrir una enfermedad coronaria cardiovascular.
- ❖ Establecer la correlación entre el polimorfismos -148 C/T y los niveles plasmáticos de fibrinógeno.
- ❖ Establecer las correlaciones estadísticas entre las variables dependientes (Enfermedad coronaria cardiovascular) y las variables independientes (antecedentes clínicos, niveles plasmáticos de fibrinógeno) y el polimorfismo -148 C/T.

METODOLOGÍA

a) Área de estudio

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Diagnóstico y Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas Campus IV, UNACH

b) Tipo de estudio

El presente estudio es de casos y controles, transversal, de tipo finito.

c) Población de estudio

En el estudio se incluyeron Pacientes con ECC y sujetos controles admitidos en el Hospital Regional de Alta Especialidad “Ciudad Salud” en Tapachula, Chiapas, México.

d) Tamaño de muestra y tipo de muestreo

El tamaño de la muestra fue calculado estadísticamente basados en el número del universo con una heterogeneidad del 50%, margen de error del 5% y con un nivel de confianza del 95%, lo que dio como resultado la inclusión de 81 controles y 68 casos de ECC.

e) Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Grupo ECC:

Criterios de inclusión:

- a) Edad entre 35 a 75 años.
- b) ECI definido por depresión o elevación del segmento ST, con o sin necrosis secundaria a aterotrombosis.
- c) Estabilidad clínica.

- d) Pacientes con diagnóstico establecido de ECE a través de angiografía coronaria y/o infarto previo de más de seis meses.

Criterios de exclusión:

- a) Mayor de 75 años.
- b) Fracción de expulsión < 35%
- c) Enfermedad hematológica, hepática o neoplásica.
- d) Actividad inflamatoria aguda o crónica.
- e) Consumo excesivo de alcohol.
- f) Pacientes que no deseen participar en el estudio.

Criterios de Eliminación:

- a. Muestras inadecuadas
- b. ADN de mala calidad
- c. Expedientes incompletos

Grupo Control. Se seleccionaron sujetos aparentemente sanos, sin historia de enfermedad cardiovascular, apareados por edad y sexo, además de ser proveniente de la región del estado de Chiapas.

f) Técnicas de laboratorio utilizadas

Extracción de ADN en sangre

Se realizó la extracción de ADN mediante la técnica de FENOL-CLOROFORMO mediante el siguiente procedimiento:

1. Colocar 300-500 μ l de sangre con EDTA, en un tubo eppendorf de 2ml, centrifugar por 5 minutos a 10,000 RPM, para separar el paquete globular del plasma. Con una micropipeta, descartar todo el plasma.
2. Adicionar al paquete globular 200 μ l de buffer de lisis TSNT. Mezclar perfectamente por inmersión.
3. Añadir 500 μ l de Fenol saturado.
4. Agregar 100 μ l de reactivo SEVAG.
5. agregar 200 μ l de TE1X Mezclar perfectamente por inmersión y posteriormente Agitar en el vortex por 5 minutos.
6. Centrifugar a 10,000 RPM durante 12 minutos. Decantar el sobrenadante (Fase Acuosa), y pasar a otro tubo eppendorf de 2 ml.
7. Adicionar Etanol merck al 100 %, hasta llenar el tubo. Mezclar por inmersión hasta observar las hebras.
8. Incubar 1 hora a -20°C . Posteriormente centrifugar 12 minutos a 10,000 RPM, decantar el sobrenadante sin llevar la pastilla.
9. Lavar con Etanol al 70 %, hasta llenar el tubo.
10. Decantar sin llevar la pastilla y secar a temperatura ambiente.

11. Resuspender con un volumen entre 20 a 50 μl de TE 1X (agitando con la puntilla).

PCR punto final del polimorfismo -148C/T

Tabla 1.- Oligonucleótidos, secuencias y tamaño de amplificación

Polimorfismo	Secuencia de los Oligonucleótidos	Pares de bases
-148C/T	F 5'-AAG AAT TTG GGA ATG CAA TCT CTG CTA-3' R 5'-CCT CTC CTC ATT GTC GTT GAC ACC TTG GGA C-3'	1300 Pb.

Condiciones De Amplificación

Para iniciar la estandarización las reacciones de PCR se usan los siguientes parámetros (Tabla 2), con ciclos de temperatura que se observan en la tabla 3 y un tiempo promedio de reacción de tres hrs.

Tabla 2.- Condiciones De PCR.

Componentes	Vol. por reacción
Buffer 10X	2.5 μl (1X)
dNTP's 10 mM	0.5 μl (0.2 mM)
<i>Taq</i> DNA polimerasa 5U/ μl	0.5 μl (0.1 U/ μl)
MgCl ₂ 25 mM	1.5 μl (1.5 mM)
Primer 1 5 μM	2.5 μl (0.5 μM)
Primer 2 5 μM	2.5 μl (0.5 μM)
DNA	1.0 μl (50 ng)
H ₂ O miliQ	15.0 μl

Tabla 3.- Programa De Amplificación Para Los Polimorfismos.

Temperatura	Tiempo
1. 94°C	5 min
2. 94°C	30 seg
3. 53°C	30 seg
4. 72°C	30 seg
5. 72°C	15 min

Los pasos 2 al 4 se repiten por 40 ciclos.

Polimorfismos de Longitud De Los Fragmentos De Restricción (Rflp's) para detección del polimorfismo.

Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de DNA de diferentes tamaños, tras su digestión con enzimas de restricción. Los Productos Amplificados (PA) se digieren de acuerdo con las condiciones de reacción señaladas por la casa comercial New England Biolabs, Gibco-BRL Life, y Fermentas (Tabla 4).

Tabla 4.- Reacción De Digestión Para Los Polimorfismos.

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

Las reacciones se incuban en un rango de temperatura de 37 a 65°C (12 hrs).

Después del tiempo de incubación, las reacciones de digestión se verifican por electroforesis (110 V por 4 hrs) en geles de agarosa al 4%.

Tabla 5. Fragmentos obtenidos por los cortes enzimáticos con HIND III.

POLIMORFISMO -148 C/T OBTENIDOS POR ENZIMA DE RESTRICCIÓN HIND III	
HOMOCIGOTO C/C	835, 272, 194 pb.
HOMOCIGOTO T/T	835, 466 pb.
HETEROCIGOTO C/T	835, 466, 272, 194 pb.

Para asegurar la calidad de las genotipificaciones, los resultados se validan tamizando nuevamente el 10% de muestras seleccionadas al azar y todas aquellas con patrón homocigoto para los alelos mutantes.

g) Variables de estudio y análisis estadístico

Tabla 6. Clasificación de las variables

Variable	Clasificación
EDAD	cuantitativa, numérica, independiente.
SEXO	cualitativa, nominal, independiente
DIABETES	cualitativa, nominal, independiente
HIPERTENSION	cualitativa, nominal, independiente
IMC	cuantitativa, continuas, independiente
OBESIDAD	cualitativa, ordinal, independiente
TABAQUISMO	cualitativa, nominal, independiente
ALCOHOLISMO	cualitativa, nominal, independiente
POLIMORFISMO	cualitativa, nominal, dependiente
FIBRINOGENO	cuantitativa, continuas, independiente

PLAQUETAS	cuantitativa, continuas, independiente
LEUCOCITOS	cuantitativa, continuas, independiente
GLUCOSA	cuantitativa, continuas, independiente
COLESTEROL	cuantitativa, continuas, independiente
TRIGLICERIDOS	cuantitativa, continuas, independiente

Para el análisis estadístico se utilizó la hoja de cálculo Microsoft Excel XP, La diferencia entre las medias de los grupos y las variables se evaluaron usando la t-student de dos colas, evaluándose el resultado por la prueba de Wilcoxon.

Las variables discretas se analizaron mediante Chi-cuadrada usando la corrección de Yates ó la prueba exacta de Fisher, según fuera necesario. Se usó la Razón de Momios (RM) con intervalos de confianza (IC) del 95% para determinar la probabilidad. del riesgo de la enfermedad.

Además, se realizaron modelos univariados, y Regresiones Multivariada y Logística para determinar las variables más significativas. La significancia estadística se establece para valores de $p < 0.05$. Los datos se reportarán en porcentajes, medias, desviaciones estándar, IC y RM. Todo el análisis usando un paquete estadístico comercial SPSS V21.

Características Demográficas Y Clínicas De Los Sujetos.

Las características demográficas y clínicas de los pacientes con ECE y del grupo control se observan en la tabla 7. No se encontró diferencia significativa en ninguna de las variables analizadas.

Tabla 7.- Características Basales De La Población De Estudio.

Variables	CONTROLES n=81	ECC n=68	P
Hombres	44(54.3%)	43(63.2%)	0.41
Mujeres	37(45.7%)	26(38.2%)	
Edad (\pm DS)	57.4 \pm 9.0;	59.3 \pm 9.8	0.21
Diabetes	16(19.7%)	24(35.3%)	0.52
Hipertensión	27(33.3%)	32(47.05%)	0.12
IMC	28 \pm 5.0	27 \pm 3.9	0.40
Obesidad	34(42%)	25(36.8%)	0.63
Tabaquismo	28(34.6%)	35(51.5%)	0.06
Alcoholismo	45(55.5%)	40 (58.8%)	0.81

Los productos de amplificación de PCR del gen fibrinógeno -148C/T se muestran en la figura 7, todas las muestras amplificaron adecuadamente a esta región. El tamaño del gen amplificado correspondió a 1301 pares de bases visualizados en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

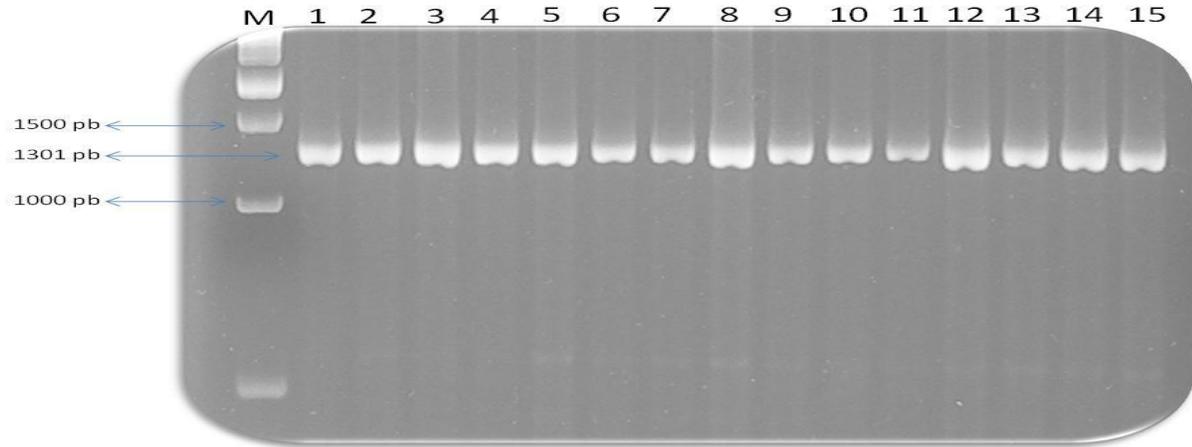


Figura 7. Amplificación de la región del gen del fibrinógeno. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el carril M se observa el marcador de peso molecular en escalera de 500 pb; y en los carriles del 1 al 15 se observa la amplificación del producto que corresponde a una región del gen fibrinógeno para las primeras muestras analizadas con un tamaño de 1301 pares de bases.

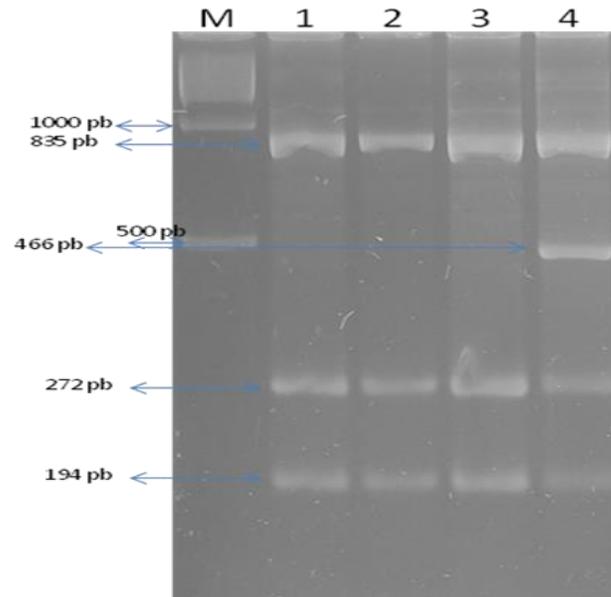


Figura 8. Digestión enzimática del Polimorfismo -148 C/T con Hind III. Gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio. En el carril M se observa el marcador de peso molecular en escalera de 500 pb; en los carriles 1 al 3 se observa el corte enzimático del polimorfismo -148 C/T representando un homocigoto C/C; en el carril 4 se observa un heterocigoto C/T

Determinación de la carga genotípica

Las determinaciones de cargas genéticas de un alelo particular entre los posibles genotipos estudiados, demostró razones de momios (RM) incrementadas para enfermedad coronaria

Tabla 8. Asociación del polimorfismo -148 C/T con ECC.

Carga genotípica	Controles N=81	ECC N=68	OR (95% CI), p
-148 Fg C/C C/T+T/T	81 0	60 8	10.7 (1.3-44.1), 0.002

Comparación De Los Parámetros Bioquímicos Y Hematológicos.

La comparación entre los grupos para las variables bioquímicas se realizó utilizando la t-students; las variables analizadas fueron el fibrinógeno, leucocitos, plaquetas, glucosa, colesterol y triglicéridos (tabla 9), únicamente se observó diferencia significativa en la variable colesterol ($p < 0.05$)

Tabla 9. Comparación de los parámetros bioquímicos y hematológicos.

FACTORES	CONTROLES n=81	ECC n=68	P
Fibrinógeno (mg/dl)	464.6±131.9	522.8±211.8	0.07
Plaquetas (cel/mm ³)	235182.4±75669.9	237181.8±98382	0.9
Leucocitos (cel/mm ³)	6592.2±1457.7	6972.9±2596.2	0.3
Glucosa (mg/dl)	124.7±46.4	134.3±59.8	0.3
Colesterol (mg/dl)	220.3±48.7	178.1±64.3	0.0001
Triglicéridos (mg/dl)	235.4±139.7	209.6±117.4	0.3

Discusión

En nuestro estudio las variables bioquímicas estudiadas no fueron significativas, a excepción del colesterol, el cual no podemos tomar en cuenta como marcador de riesgo cardiovascular debido a que los que presentaron los valores más altos fueron los sujetos controles, ya que los pacientes se encuentran en tratamiento para dicho lípido.

Al comparar los niveles de fibrinógeno no se encontró diferencias entre los grupos. Sin embargo, los niveles que presentaron los pacientes, como los controles están por arriba de los valores de referencia (>460 mg/dL), estos niveles son parecidos a los reportados en poblaciones japonesa–americana³, estadounidense⁴ y española⁵, en los cuales la media obtenida para la proteína fue 468.3 ± 185.8 mg/dL. Por el contrario, presentan una gran diferencia a valores encontrados en los estudios de Gothenburg, United Kingdom, PROCAM y GRIPS⁶, en la cual la media obtenida en estos fue aproximadamente ≥ 300 mg/dL.

En nuestro estudio ninguno el polimorfismo estudiado -148C/T es un marcador de riesgo cardiovascular, se encontraron resultados similares a lo reportado en otros trabajos en los cuales el polimorfismo -148T demuestran asociación con la enfermedad coronaria.⁷

El polimorfismo -148T como determinante de riesgo cardiovascular no ha sido muy estudiado, pero recientemente se ha asociado en una población asiática con Infarto al Miocardio⁸ y con la predicción de aterosclerosis en carótidas.⁹

En nuestro estudio la presencia del polimorfismo -148 C/T nos da un 10.7 veces más probabilidad de sufrir ECC, esto corrobora al estudio en la población Asiática⁸ y china¹⁰, a

diferencia de nuestro estudio en el de Chen X et al, reportaron una probabilidad de 1.31 veces a sufrir ECC.

Por lo que nuestro trabajo apoya a los pocos estudios hechos afirmando que el polimorfismo -148C/T es un factor de riesgo cardiovascular en la población del sur de México.

Bibliografía

1. Chen Y, Copeland W, Vedanthan R, Grant E, Lee J, Gu D, et al. Association between body mass index and cardiovascular disease mortality in east Asians and south Asians: pooled analysis of prospective data from the Asia Cohort Consortium. *BMJ* 2013;347:f5446.
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013; 380(9859):2095-128
3. Gómez-Dantés H, Fullman N, Lamadrid-Figueroa H, Cahuana-Hurtado L, Darney B, Avila-Burgos L, et al. Dissonant health transition in the states of Mexico, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;388(10058):2386-2402.
4. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, Shamah T, Aguilar C, Cravioto P, et al. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca: INSP; 2003.
5. Hormigo Sánchez AI, González J, Jiménez Díaz G, Martín Sánchez FJ. Enfermedades cardiovasculares, respiratorias y renales. *Medicine*. 2014;11(62):3677-3690.
6. Cannon CP, McCabe CH, Diver DJ, Herson S, Greene RM, Shah PK, et al: Comparison of front-loaded recombinant tissue-type plasminogen activator, anistreplase and combination thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 4 trial. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24(7):1602-1610.
7. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. the GUSTO angiographic investigators. *N Engl J Med* 1993; 329(22):1615-1622.

8. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients with Unstable Angina).: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000; 51(4): 505-521.
9. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3): 970-1062.
10. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al: ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: Executive summary and recommendations. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000; 102(10): 1193-1209.
11. Kennon S, Price CP, Mills PG, Ranjadayalan K, Cooper J, Clarke H, et al: The effect of aspirin on C-reactive protein as a marker of risk in unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(5): 1266-1270.
12. Moss AJ, Goldstein RE, Marder VJ, Sparks CE, Oakes D, Greenberg H, et al: Thrombogenic factors and recurrent coronary events. *Circulation* 1999; 99(19): 2517-2522.
13. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M: Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(4): 1210-1216.
14. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L: Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. *fragmin during instability in coronary artery disease. N Engl J Med* 2000; 343(16): 1139-1147.

15. Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, Topper JN, Annex BH, Rundback JH, Fabunmi RP, Robertson RM, Loscalzo J; American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*. 2004;109:2617-2625.
16. Stephens JW, Humphries SE. The molecular genetics of cardiovascular disease: clinical implications. *J Intern Med*. 2003;253:120-127.
17. Navarro-Lopez F. [Genes and coronary heart disease] *Rev Esp Cardiol* 2002. 55:413-31.
18. Jerjes-Sánchez, Díaz C, Comparan-Núñez A, Ibarra-Flores M, Decanini-Arcaute H, Archondo T. Marcadores Hemostáticos y de Inflamación en Síndromes Coronarios Agudos y su relación con eventos cardiovasculares adversos. *Chest* 2002. 122:177S.
19. Cantin B, Despres JP, Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ, Bogaty P, et al. Association of fibrinogen and lipoprotein (a) as a coronary heart disease risk factor in men (The Quebec Cardiovascular Study). *Am J Cardiol* 2002; 89:662-6.
20. Saito I, Folsom AR, Brancati FL, Duncan BB, Chambless LE, McGovern PG. Nontraditional risk factors for coronary heart disease incidence among persons with diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Ann Intern Med* 2000;133:81-91.
21. Becker RC, Cannon CP, Bovill EG, Tracy RP, Thompson B, Knatterud GL, et al. Prognostic value of plasma fibrinogen concentration in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction (TIMI IIIB Trial). *Am J Cardiol* 1996;78:142-7.
22. Verheggen PW, de Maat MP, Cats VM, Haverkate F, Zwinderman AH, Kluit C, et al. Inflammatory status as a main determinant of outcome in patients with unstable angina, independent of coagulation activation and endothelial cell function. *Eur Heart J* 1999;20:567-74.
23. Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, Evans A, Luc G, Ferrieres J, et al. Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10500 male participants in a prospective study of myocardial infarction. The PRIME Study. *Thromb Haemost* 1998;80:749-56.

24. Haines AP, Howarth D, North WR, Goldenberg E, Stirling Y, Meade TW, Raftery EB, Millar Craig MW. Haemostatic variables and the outcome of myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1983;50:800–803.
25. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a metaanalysis and review of literature. *Ann Intern Med.* 1993;118:956–963.
26. Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1368–1377.
27. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA.* 1998;279: 1477–1482.
28. Folsom AR, Wu KK, Shahar E, Davis CE. Association of hemostatic variables with prevalent cardiovascular disease and asymptomatic carotid artery atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1829–1836.
29. Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, et al. Beta fibrinogen gen polymorphism are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Circulation* 1996;93:440.
30. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. Genetics of atherosclerosis. En: Topol EJ, editor. *Textbook of cardiovascular medicine.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998; p. 2389-496.
31. Canseco-Avila LM, Lopez-Roblero A, Serrano-Guzman E, Aguilar-Fuentes J, Jerjes-Sanchez C, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R. Polymorphisms -455G/A and -148C/T and Fibrinogen Plasmatic Level as Risk Markers of Coronary Disease and Major Adverse Cardiovascular Events. *Dis Markers.* 2019 Jul 1;2019:5769514. doi: 10.1155/2019/5769514. PMID: 31354890; PMCID: PMC6636499.
32. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol.* 1957; 17: 237-246.
33. Lamlum T A, et al. Linkage disequilibrium cross the fibrinogen locus as shown by five genetic polymorphisms, G/A-455 (HaeIII), C/T-148 (HindIII/AluI), T/G+1689 (Avall), and BclI (beta

- fibrinogen) and Taql (alpha-fibrinogen), and their detection by PCR. *Hum Mutat.* 1994 ; 3 : 79-81.
34. Bladbjerg EM, et al. Internal quality control of PCR-based genotyping methods: practical experiences. *Vascul Pharmacol.* 2002; 39: 127-129.
 35. McRitchie DI, et al. Effect of systemic fibrinogen depletion on intraabdominal abscess formation. *J Lab Clin Med* 1991; 118: 48-55.
 36. Altieri DC, et al. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol* 1988; 107: 1893-1900.
 37. Colman RW, Interactions between the contact system, neutrophils and fibrinogen. *Adv Exp Med Biol.* 1990; 281: 105-120.
 38. Rubel C, et al. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. *J Immunol.* 2001; 166: 2002-2010.
 39. Smith EB. Fibrinogen, fibrin degradation products in relation to atherosclerosis. *Clin Haematol* 1986; 15: 355-370.
 40. Levenson J, et al. Fibrinogen and silent atherosclerosis in subjects with cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1263-1268.
 41. Hicks RC, et al. Vasoactive effects of fibrinogen on saphenous vein. *Nature* 1996; 379: 818-820.
 42. Chen X, Xu M, Jin L, Chen J, Chen W. Association of beta-fibrinogen gene -148C/T and -455G/A polymorphisms and coronary artery disease in Chinese population: a meta-analysis. *Sci China C Life Sci.* 2008 Sep;51(9):814-20.
 43. Yang Z, Li F, Liu G, Cai W, Ling G. The study of beta-fibrinogen gene - 455 G/A, - 148 C/T, 448 G/A polymorphisms and their association with plasma fibrinogen levels. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2000 Sep;21(9):463-5.
 44. Liang L, et al. Nine polymorphisms of fibrinogen gene and their association with plasma fibrinogen levels in Hainan Han population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2005 Aug;22(4):457-61.
 45. Ernest E, et al. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med.* 1993; 118: 956-963.