



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

FACULTAD DE MEDICINA.

*“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS DE
LAS CITOCINAS IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 Y TGF- β EN
PACIENTES CON SINDROME ISQUÉMICO CORONARIO
AGUDO (SICA)”*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. JOSE MANUEL FRAGOSO LONA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GILBERTO VARGAS ALARCON.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **FRAGOSO LONA JOSÉ MANUEL**, con número de cuenta **504008278** con la tesis titulada: **"ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS CITOCINAS IL-1, IL-6, TNF- α INF- γ Y TGF- β EN PACIENTES CON SÍNDROME ISQUÉMICO CORONARIO AGUDO (SICA)"**.

Realizada bajo la dirección del **DR. GILBERTO VARGAS ALARCON**:

Presidente:	DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANACIBIA
Vocal:	DR. LUIS LLORENTE PETERS
Vocal:	DR. MIGUEL CRUZ LÓPEZ
Vocal:	DR. RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN
Secretario:	DR. GILBERTO VARGAS ALARCON
Suplente:	DRA. MARTHA PÉREZ RODRÍGUEZ
Suplente:	DR. ANNIE PARDO SEMO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 05 de enero de 2010.


Dr. Juan Muñoz Farfán
Coordinador del Programa

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO ACABO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL LABORATORIO DE GENOMICA, EN COLABORACION CON EL GRUPO DE ESTUDIO EN GENOMICA Y PROTEOMICA EN ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ".

GRACIAS AL:

TUTOR: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN.

COTUTORES: DR. LUIS LLORENTE PETERS.

DRA. ANNIE PARDO SEMO.

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS, DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO. POR BRIDARME EL APOYO Y CONOCIMIENTO QUE ADQUIRI EN SUS INSTALACIONES PARA PODER OBTENER EL GRADO COMO DOCTOR EN CIENCIAS.

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA CON NUMERO DE CVU 49158 DURANTE EL ESTUDIO Y DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS. ASI MISMO AGRADEZCO AL CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO DE ESTE PROYECTO

Quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas que siempre me apoyaron incondicionalmente durante mi formación tanto personal como académica.

A mis padres:

Dedicada a mi madre † y a mi padre † que Dios los tenga en su gloria. Gracias por el apoyo que me brindaron en vida, así como la educación que me inculcaron para ser mejor cada día.

A mi familia:

Con mucho amor y cariño a mi esposa Marycarmen Espinosa R. por todo su apoyo y comprensión que me brindo durante este difícil pero satisfactorio camino del conocimiento, que recompensare toda la vida.

A mi hijos Guillermo Fragoso E. y Fernanda Fragoso E. por ser la felicidad de mi hogar y la razón de mi vida y quienes son mi inspiración para salir adelante a cada paso que doy.

A mis suegros:

Guillermo Granados V. y M^a de Jesús Reyes. Que siempre me brindan su apoyo incondicionalmente.

A mi maestro y amigo:

Gracias, al Doctor Gilberto Vargas Alarcón por todo su apoyo, confianza y comprensión que me brinda a cada paso que doy, algo que siempre agradeceré durante toda la vida. También doy gracias por dejarme trabajar en su laboratorio y brindarme el apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Gracias, a mi amigo Julián Ramírez B, que siempre me apoya en todo incondicionalmente, Así mismo doy gracias a todos los compañeros del laboratorio de Biología Molecular que de una o otra manera me brindaron su apoyo.

INDICE GENERAL.

RESUMEN -----	5
ABSTRACT -----	8
I. INTRODUCCIÓN -----	11
1.1 Descripción del síndrome isquémico coronario agudo -	11
1.2 Epidemiología. -----	20
1.3 Fisiopatogenia del síndrome isquémico coronario agudo -	
-----	21
1.3.1 Migración de LDL -----	21
1.3.2 La matriz extracelular y el proceso oxidativo	
(oxidación y retención de LDL's). -----	24
1.3.3 El Proceso inflamatorio -----	30
1.3.3.1 La interleucina-1 (IL-1) -----	35
1.3.3.2 El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α) -----	37

1.3.3.3 La interleucina-6 (IL-6)	38
1.3.3.4 La interleucina-10 (IL-10)	40
1.3.3.5 El factor de crecimiento transformante-β (TGF-β)	41
1.3.3.6 Interferón-gamma (INF-γ)	43
1.3.4 Trombosis, Ruptura y/o Erosion de la placa	44
1.4. Estudios de susceptibilidad genética.	47
II. JUSTIFICACION	50
III. HIPOTESIS	50
IV. OBJETIVOS	51
a) Objetivo General	51
b) Objetivos particulares	51
V. MÉTODOS	53
A) Tamaño de la muestra	55
B) Extracción del DNA genómico	56
C) Sitios polimorficos a estudiar	56

<i>D) La determinación de los sitios polimórficos</i>	<i>57</i>
<i>E) Análisis Estadístico</i>	<i>58</i>
VI. RESULTADOS	60
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES	75
VIII. REFERENCIAS BIBILOGRAFICAS	88
IX. ANEXOS	114

ABREVIATURAS.

SICA	Síndrome isquémico coronario agudo.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NO	Óxido nítrico
VCAM-1	Molecula de adhesión vascular-1
ICAM-1	Molecula de adhesion intracelular-1
Selectina P	Molecula quimioatrayente
Selectina E	Molecula quimioatrayente
MCP-1	Proteina quimioatrayente de monocitos-1
O₂⁻	Superóxido
SOD	Superóxido dismutasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ONOO⁻	Peroxi-nitrito
MCFS	Factor estimulador de colonias de macrofagos.
GAGs	Glicosilaminglicanos
CS	Condritin sulfato
DS	Dermatan sulfato
HS	heparan sulfato
NADPH	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido hidrogenasa
SNP'S	Polimorfismos de un solo nucleótido
VNTR's	Repetidos en tandem de numero variable
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
AT1	Angiotensina-1
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta
INF-γ	Interferon-gamma
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa

RESUMEN.

Antecedentes: El síndrome isquémico coronario agudo es causado por la ruptura o erosión de la placa ateromatosa con la subsecuente formación de trombos. Se tiene evidencia de que el proceso inflamatorio junto con la dislipidemia tiene un papel fundamental en la progresión de la placa aterosclerótica. Varios estudios han demostrado que las citocinas pro-inflamatorias tienen un papel clave en la formación de la placa aterosclerótica y el desarrollo de algún evento isquémico coronario agudo. Por otro lado, las citocinas anti-inflamatorias producidas por varios tipos celulares, especialmente por macrófagos tienen un papel fundamental en la inhibición de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias e inhibición de la formación de la placa ateromatosa.

Objetivo: Determinar el papel que tienen los sitios polimórficos de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias más importantes (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 y TGF- β) en la susceptibilidad genética al desarrollo y/o resistencia al síndrome isquémico coronario agudo en la población mexicana.

Material y Métodos: Se estudiaron 336 individuos con síndrome isquémico coronario agudo y 248 individuos control. Los polimorfismos (IL-1B-511T>C, IL-1F10.3T>C, IL-1RN.4T>C, IL-1RN.6/1C>T, IL-1RN.6/2C>G, IL-1RN VNTR, TNF- α -238A>G y TNF- α -308T2>T1, IL-10-592C>A, IL-10-819C>T, IL10-1082 A>G, TGF- β -509T>C, TGF- β T29C, IL-6-1426 G>T, IL-6-572 C>G, INF- γ -155

G>A, INF- γ -179 T>G) se determinaron usando ensayos TaqMan 5' exonucleasa y se analizaron en un equipo de PCR en tiempo real. Se estableció que los genotipos estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada. La distribución de los genotipos en los dos grupos de estudio se evaluó por medio de la prueba de chi-cuadrada y exacta de Fishers. El riesgo relativo se evaluó como razón de momios (RM) por el método de Woolf. La construcción y análisis de haplotipos se realizó con el programa Haploview versión 4.1.

Resultados: El grupo de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo presentó incremento en las frecuencias del alelo "T" y genotipo "TT" del polimorfismo IL-1RN4T>C al comparar con el grupo control (pC=0.002, RM=1.58 Y pC=0.002, RM=1.79, respectivamente). Así mismo, el polimorfismo IL-1RN6/1C>T mostró incremento del alelo "T" y genotipo "TC" al comparar con los controles (pC=0.002, RM=1.65) y (pC=0.00024, RM=2.22) respectivamente. Por otro lado, en el polimorfismo IL-1RN6/2C>G se observa incremento del alelo "C" y genotipo "CC" en pacientes al comparar con controles (pC=10⁻⁶, RM=1.99) y (pC=10⁻⁶, MR=2.21) respectivamente. El análisis del polimorfismo IL-1RN-VNTR presentó incremento del alelo "1" y del genotipo "1, 1" en pacientes al comparar con los controles (pC=0.003, RM=1.47) y (pC=0.001, RM=1.74) respectivamente. La distribución de los sitios polimorficos del gen *IL-10* (-592C>A, -819T>C y -1082 A>G) fue muy similar en los pacientes y controles.

Sin embargo, al analizar los haplotipos del gen *IL-10* se observa incremento del haplotipo "ACA" compuesto por los alelos -592 A, -819 C y -1082 A en pacientes al compararse con los controles ($p=2 \times 10^{-4}$, RM=1.66). El análisis del polimorfismo TGF- β -509T/C mostró incremento del alelo "T" ($pC=0.04$, RM=1.23) en pacientes. Por otro lado, el polimorfismo TGF- β T29C mostró incremento del alelo "T" ($pC=10^{-7}$, RM=1.79) y genotipo TT ($pC=10^{-7}$, RM=3.27) en pacientes al comparar con el grupo control. El grupo de pacientes mostró incremento en de los haplotipos "TC" y "TT" ($pC=0.009$, RM=1.30 y $pC=4 \times 10^{-12}$, OR=5.66, respectivamente) al compararse con los individuos control. La distribución de los polimorfismos *INF- γ -155A>G*, *INF- γ -179T>G*, *TNF- α -238A>G* y *TNF α -308T2>T1* fue similar en pacientes y controles. Sin embargo, cuando se analizan el polimorfismo de la IL-6 se observa incremento en el genotipo "CG" del polimorfismos IL-6 -572 ($pC=0.03$, RM=1.53) cuando se compararon con los individuos control.

Conclusiones: Los datos obtenidos sugieren que los polimorfismos del antagonista del receptor de IL-1, la IL-10, TGF- β e IL-6 se asociación con la susceptibilidad a desarrollar el síndrome isquémico coronario agudo en la población mexicana.

ABSTRACT

Background. The acute coronary syndrome (ACS) is caused by rupture or erosion of the plaque atherosclerotic with the subsequent formation of thrombus. There is evidence that the inflammatory process together dyslipidemia plays an important role in the progression of plaque atherosclerotic. Several studies showed that pro-inflammatory cytokines plays a key role in the formation of the plaque atherosclerotic and development of acute coronary syndrome. On the other hand, the anti-inflammatory cytokines produced by several cells types, especially by macrophages plays an important role in inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines and inhibition of the plaque atherosclerotic.

Objective. The aim of the present study was to evaluate the role of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 y TGF- β) gene polymorphisms as susceptibility markers for coronary acute syndromes in Mexican population.

Methods: The study included 336 Mexican Mestizo patients with acute coronary syndrome and 248 healthy controls. The (IL-1B-511T>C, IL-1F10.3T>C, IL-1RN.4T>C, IL-1RN.6/1C>T, IL-1RN.6/2C>G, IL-1RN VNTR, TNF- α -238A>G y TNF- α -308T2>T1, IL-10-592C>A, IL-10-819C>T, IL10-1082 A>G, TGF- β -509T>C, TGF- β T29C, IL-6-1426 G>T IL-6-572 C>G, INF- γ -155 G>A, INF- γ -179 T>G) polymorphisms were genotyped using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays in a PCR real-time system according to the

manufacturer's instructions. The Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by chi-square test. Differences in genotyping distribution were assessed by X^2 analysis of the relevant 2x2 contingency table or Fisher's exact test as appropriate. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were estimated by method Woolf. Pairwise linkage disequilibrium estimations between polymorphisms and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4.1.

Results: Patients with acute coronary syndrome presented increased frequencies of "T" allele and "TT" genotype of the IL-1RN4T/C polymorphism ($pC=0.002$, $OR=1.58$ and $pC=0.002$, $OR=1.79$, respectively) when compared healthy controls. The IL-1RN6/1C>T polymorphism showed increased of "C" allele and "TC" genotype ($pC=0.002$, $OR=1.65$ and $pC=0.00024$, $OR=2.22$, respectively) when compared healthy controls. The IL-1RN6/2C>G polymorphism showed increased of "C" allele and "CC" genotype in ACS patients when compared controls ($pC=10^{-6}$, $OR=1.99$ and $pC=10^{-6}$, $OR=2.21$, respectively). In addition, the IL-1 RN VNTR polymorphisms presented increased "1" allele and "1, 1" genotype in ACS patients when compared healthy controls ($p=0.003$, $OR=1.47$ and $p=0.001$, $OR=1.74$, respectively). On the other hand, the "T1TC" haplotype (includes the four *IL-1RN* gene polymorphisms) was increased in patients with ACS when compared to healthy controls ($p=8 \times 10^{-5}$, $OR=1.69$). The distribution of the IL-10 (IL-10-592C>A, IL-10-819C>T and IL-10-1082 A>G) polymorphisms showed similar

distribution of the frequencies in patients and healthy controls. However, the analysis of haplotypes of the IL-10 polymorphisms showed one haplotype "ACA" composed of alleles (-592 A, -819 C y -1082 A) with highest risk in patients when compared controls (OR=1.66, $p=2 \times 10^{-4}$). The analysis of TGF- β -509T>C polymorphism showed increased of "T" allele ($pC=0.04$, OR=1.23) in ACS patients. On the other hand, the analysis of TGF- β T29C showed increased of "T" allele ($pC=10^{-7}$, OR=1.79) and "TT" genotype ($pC=10^{-7}$, OR=3.27) in patients when compared healthy controls. Also, the patients showed increased of the "TC" and "TT" haplotypes ($pC=0.009$, OR=1.30 and $pC=4 \times 10^{-12}$, OR=5.66, respectively) when compared healthy controls. Distribution of *INF- γ -155A>G*, *INF- γ -179T>G*, TNF- α -238A>G and TNF- α -308T2>T1 polymorphism's was similar in patients and healthy controls. However, important differences were observed when the IL-6 polymorphisms were analyzed. Patients with ACS presented increased frequencies of *IL-6 -572 "GC"* genotype ($pC=0.033$, OR=1.53) when compared healthy controls.

Conclusions: The dates obtained suggest that the IL-10, TGF- β , IL-6 and antagonist receptor of the IL-1 polymorphisms are associated with development acute coronary syndrome in the Mexican population.

1. INTRODUCCION.

1.1 Descripción del síndrome isquémico coronario agudo.

El síndrome isquémico coronario agudo se caracteriza por un espectro de enfermedades arteriales, que incluyen la angina inestable y el infarto agudo del miocardio con y sin elevación del segmento ST en un electrocardiograma. La sintomatología del síndrome isquémico coronario agudo es muy característica y no empata con algún otro tipo de afección cardiaca, se presenta con dolor de pecho náuseas, vómito, disnea, diaforesis y ligero dolor de cabeza. Una característica importante del síndrome isquémico coronario agudo es la presencia de marcadores bioquímicos elevados en suero como la creatinina fosfoquinasa y la troponina I y II ¹⁻³.

El infarto agudo del miocardio es un síndrome isquémico coronario agudo, en el cual invariablemente existe una interrupción abrupta y súbita del flujo arterial coronario, generalmente relacionada con fenómenos trombóticos agudos asociados con lesiones coronarias por placas de aterosclerosis. De acuerdo al 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 cardiaca con desarreglos hemodinámicos e interacciones compensadoras a nivel neurohormonal ^{4,5}. La situación en que se presenta la angina inestable no parece

relacionada con un mayor trabajo cardiaco. 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^{6,7}. (Figura 1a y 1b).

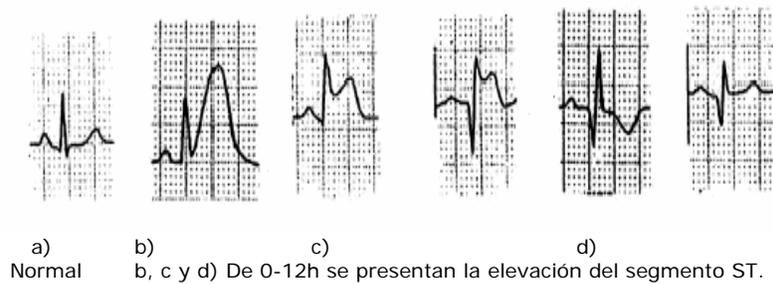


Figura 1a. Representación de un electrocardiograma y sus fases en el síndrome isquémico coronario agudo. Tomado de Wang K. Atlas of electrocardiography.

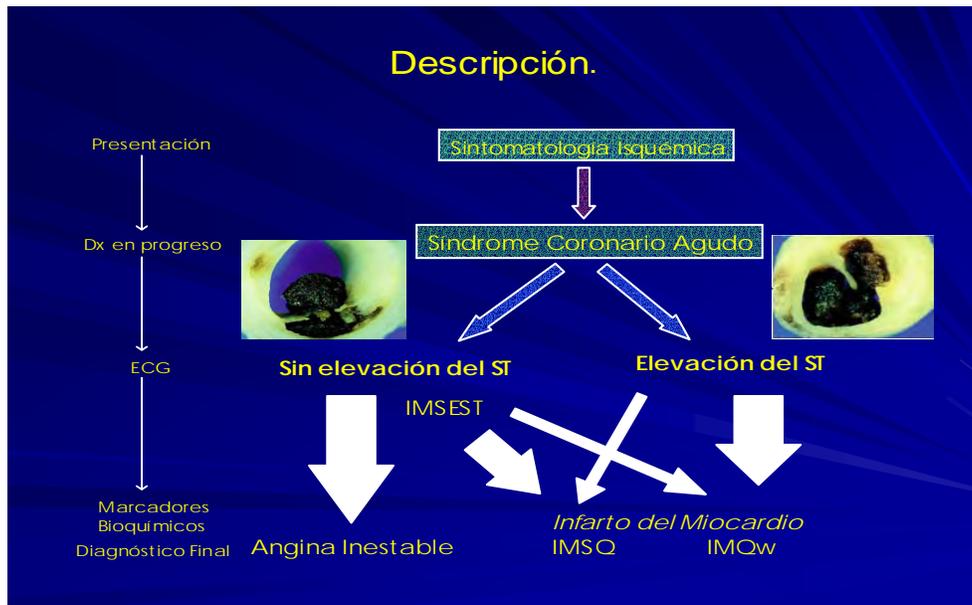


Figura 1b. Representa el diagnóstico por etapas y sintomatología del síndrome isquémico coronario agudo.

La angiografía coronaria permite reconocer las lesiones responsables de la isquemia miocárdica pero es necesario visualizar la pared arterial más que la luz vascular para poder reconocer las lesiones

precoces y las placas vulnerables no estenosantes. De este modo, técnicas disponibles como la ecocardiografía intravascular y la angioscopia pueden revelar aspectos de la placa que no son valorables por coronariografía. Así mismo, la resonancia magnética nuclear permitirá en un futuro no lejano un estudio fisiológico *in vivo* de las lesiones coronarias. Incluso una simple muestra de sangre permite determinar la existencia de signos de inflamación sistémica y activación de células endoteliales, leucocitos, plaquetas, coagulación y fibrinólisis que pueden resultar útiles para diferenciar entre aterosclerosis estable y progresiva^{8,9}.

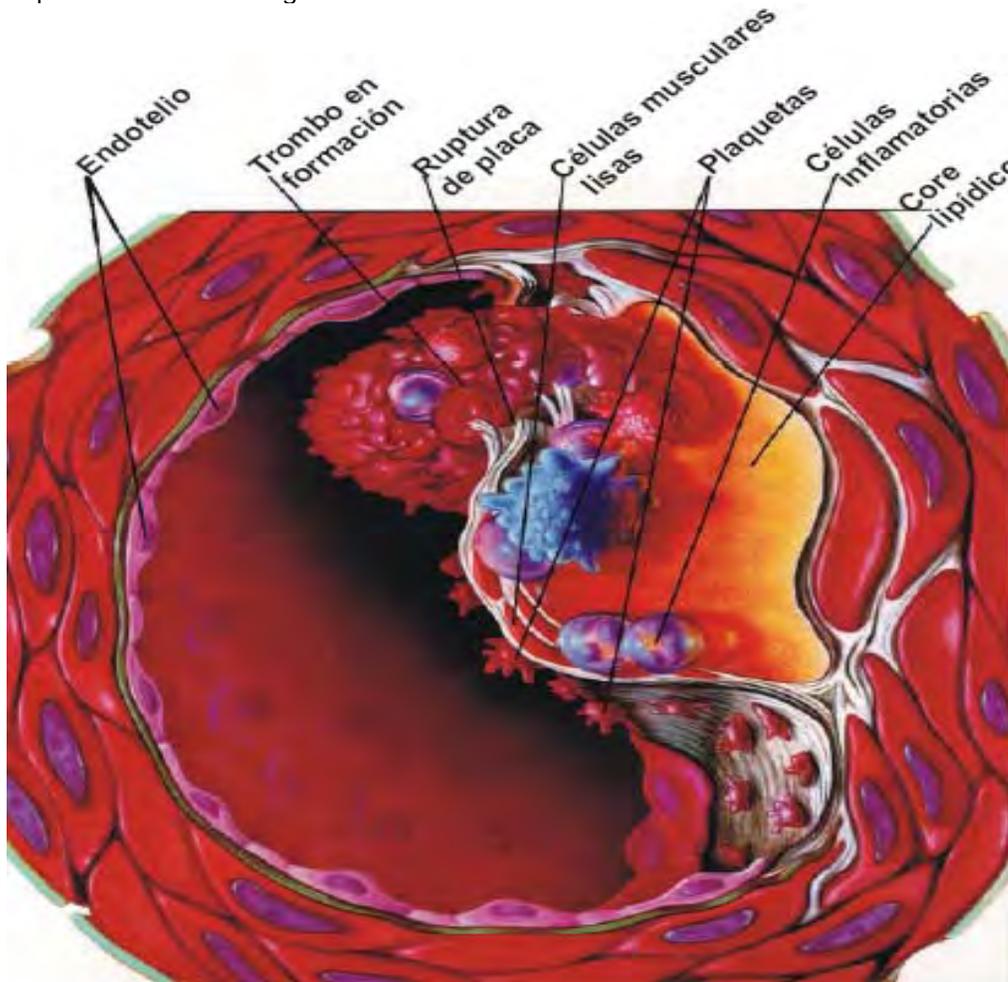
La rotura de la placa va seguida de una hemorragia intralesional a través de su superficie rota y una trombosis intraluminal que da lugar a un crecimiento rápido de ésta, lo que da lugar a la progresión brusca de la lesión coronaria¹⁰. Otro mecanismo que podría contribuir a esta progresión aguda podría 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^{11,12}.

La presencia clínica y el resultado depende de la intensidad y la duración de la isquemia. Así, un trombo no oclusivo u oclusivo da forma generalmente a la angina inestable y al infarto agudo del miocardio³⁰. La lesión responsable del paro cardíaco extrahospitalario

y de la muerte súbita es a menudo similar a la de la angina inestable^{13,14}.

El síndrome isquémico coronario agudo es por tanto consecuencia de un desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno a nivel del miocardio y se suele producir por una reducción aguda o subaguda de dicho aporte debido a la disrupción de una placa arteriosclerótica asociada a fenómenos inflamatorios, trombosis, vasoconstricción y microembolización^{15,16}. No obstante existen otras causas como la hipertensión arterial sistémica, hipertensión pulmonar primaria, arteritis, endocarditis, trombocitosis, anomalías congénitas, alteración de la relación aporte-demanda de oxígeno, sexo masculino, tabaquismo, hipercolesterolemia (niveles elevados de LDL), diabetes mellitus, obesidad, entre otras, capaces de desencadenar un evento isquémico coronario (Figura 2).

Figura 2. Representa los eventos importantes que se dan durante un síndrome isquémico coronario agudo.



La teoría de la formación de la placa aterosclerótica que conlleva al proceso coronario agudo propone que éste inicia en las células endoteliales por parte de una serie de factores que conducen a la pérdida de su función homeostática, desencadenando los fenómenos inflamatorios característicos del síndrome isquémico coronario agudo. En aquellos segmentos arteriales coronarios sometidos a flujo turbulento se producen fenómenos que desencadenan la formación de la placa aterosclerótica. Esta teoría se enfoca en la existencia de una

mayor permeabilidad al paso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas (mediante fenómenos de oxidación, glicosilación y unión a proteoglicanos). Además, como respuesta al aumento del estrés parietal, se modifica la actividad de los promotores de diversos genes en las células de la pared endotelial, dando lugar a un incremento de la producción de proteínas como la molécula de interacción celular 1¹⁷, moléculas de adhesión celular, la cadena B del factor de crecimiento plaquetario¹⁸, el factor tisular, las selectinas y las integrinas, que facilitan los fenómenos de adhesión celular (linfocitos T, monocitos) al endotelio^{19,20-22} (Figura 3).

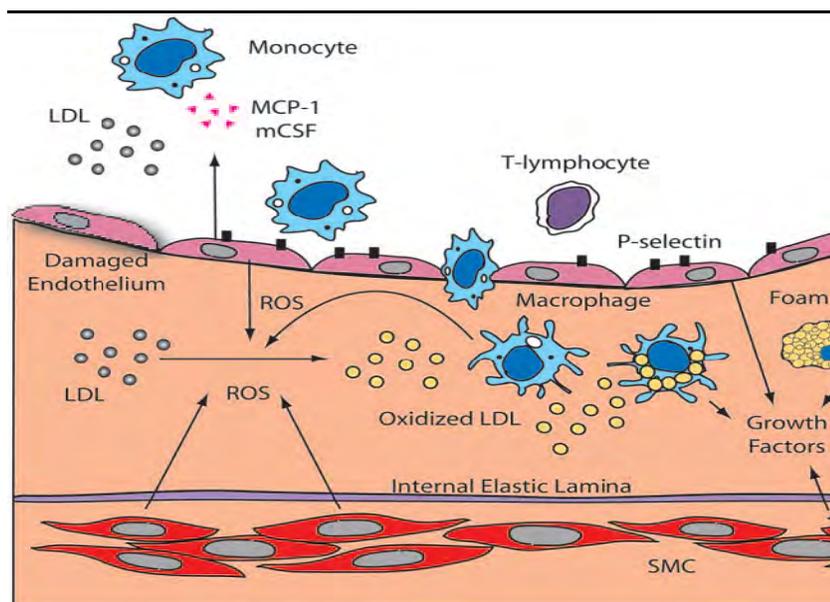


Figura 3. Representa el inicio de la formación de placa aterosclerótica que conlleva al desarrollo del SICA. Tomada de Nagewara R et al. 2005 Arter Thromb Vasc Biol.

Una vez que los monocitos se instalan en el espacio subendotelial se transforman en macrófagos y comienza la fagocitosis de lípidos (principalmente LDL oxidadas) a través de unos receptores de

superficie denominados "scavengers", convirtiéndose en célula espumosa^{23,24}. El sustrato histológico de este proceso es la formación de la estría grasa (constituida por células espumosas, linfocitos T y células musculares lisas). La captación de lípidos por el macrófago (en un intento de minimizar el daño de la LDL oxidada sobre las células endoteliales y musculares lisas), constituye el paso inicial del proceso inflamatorio. Los macrófagos actúan como células presentadoras de antígeno y secretan citocinas, quimiocinas y moléculas estimulantes del crecimiento como el TGF-beta, metaloproteasas y otras hidrolasas, pero también LDL oxidada y aniones superóxido que pueden lesionar las células endoteliales vecinas, perpetuando la lesión endotelial.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la angiotensina II estimulan la mitosis de las células musculares lisas, favoreciendo la formación de tejido fibroso, dando lugar a la formación de una lesión fibromuscular proliferativa a nivel del espacio subendotelial^{25,26}. Como consecuencia de este proceso la estría grasa evoluciona a placa aterosclerótica constituida por una cubierta de tejido fibromuscular y el núcleo de material necrótico (Figura 4).

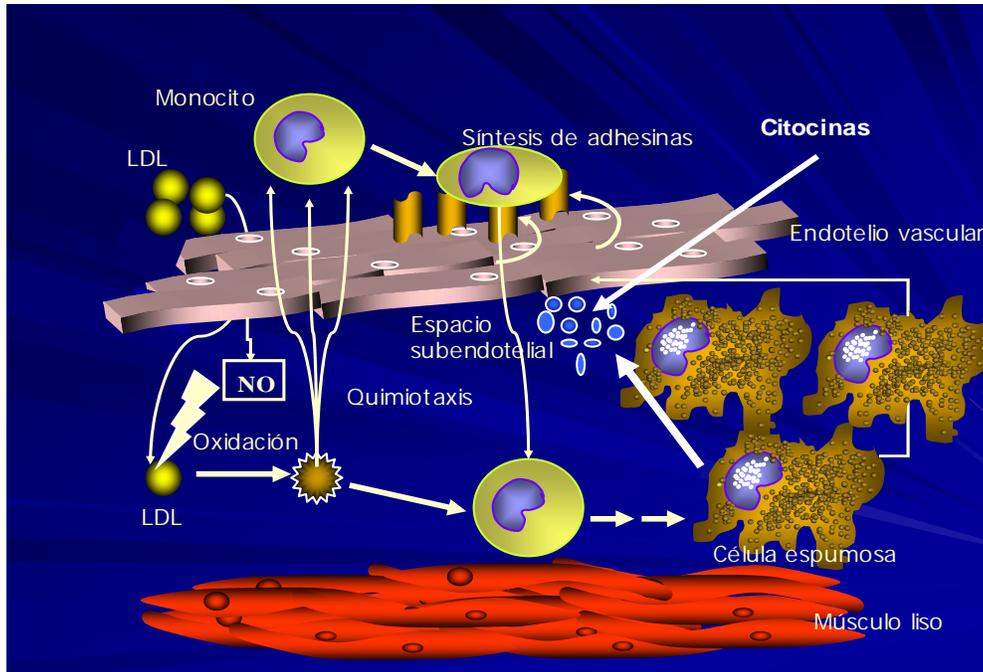


Figura 4. Representación grafica de los eventos (migración, adhesión y rodamiento del monocito al espacio subendotelial) que anteceden en el proceso de la formación de la placa aterosclerótica.

La placa aterosclerótica, constituida por células espumosas, recubiertas por células de músculo liso, fibrinogeno, colágeno, entre otras moléculas, conduce a la agregación de plaquetas, y produce un trombo mural; así mismo se sintetiza tromboxano A₂ (con gran actividad vasoconstrictora y proagregante) y leucotrienos, amplificando la respuesta inflamatoria de la placa que trae como resultado el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo²⁷⁻²⁹. Por otro lado, la acción de las metaloproteasas y otras enzimas hidrolíticas da lugar a que se produzcan fenómenos hemorrágicos y adelgazamiento de la capa fibrosa. Como consecuencia la placa puede fracturarse, dando lugar a la formación de un trombo, lo cual se relaciona con eventos tempranos de una isquemia coronaria^{30,31}.

(Fig 4)

En conclusión la placa ateromatosa se inicia por la aparición de disfunción endotelial en parte relacionada con la adhesión de LDL modificadas. La alteración endotelial da lugar a un desequilibrio entre sustancias procoagulantes y anticoagulantes, así como un incremento de la síntesis de sustancias vasoactivas, citocinas y factores de crecimiento que desencadenan una respuesta inflamatoria que trata de evitar la acción nociva de los iniciadores sobre la pared arterial^{3, 4}. Si los factores iniciadores no son neutralizados, la reacción inflamatoria persiste de forma indefinida, estimulando la migración y proliferación de células musculares lisas, conduciendo a un engrosamiento de la pared arterial. La activación de estas células conduce a la liberación de enzimas hidrolíticas, citocinas y factores de crecimiento que conllevan a un mayor daño sobre la pared vascular^{6, 7}. Se suceden ciclos de acumulación de células mononucleares, migración y proliferación de células musculares lisas y formación de tejido fibroso, que conduce al crecimiento y reestructuración de la lesión, apareciendo un acúmulo de lípidos y células necróticas. El resultado de este proceso da lugar, como consecuencia del acumulo de lípidos, a una placa más vulnerable, con tendencia a la ruptura y al desarrollo de trombosis intraluminal, que conlleva a la isquemia arterial aguda. Por otro lado, como resultado del crecimiento de la placa, se agota la capacidad de remodelación arterial, apareciendo obstrucción al flujo sanguíneo de forma progresiva, lo que provoca un infarto agudo del miocardio y una angina inestable^{6,7,9,10}.

1.2. Epidemiología.

En los últimos diez años el síndrome isquémico coronario agudo ha constituido la causa de hasta el 29% de los fallecimientos en los países industrializados³², lo que la convierte en la principal causa de muerte y probablemente en el año 2020 seguirá siéndolo^{33,34}. Es responsable de más del 45% de los fallecimientos en mayores de 65 años y del 70% en mayores de 75 años³⁵. El SICA es la primera causa de muerte en varones mayores de 45 años y en mujeres mayores de 65 años³⁶. En Estados Unidos la tercera parte de los varones desarrollan algún tipo de enfermedad cardiovascular antes de alcanzar los 60 años, siendo el SICA el más frecuente. El estudio Frammingham proporcionó datos que permitieron estimaciones fiables de la morbimortalidad cardiovascular tras el seguimiento durante 36 años de una muestra poblacional de 5209 individuos de 35 a 94 años. Sus resultados indican que la incidencia media anual de las enfermedades cardiovasculares van desde el 0.5% en hombres entre los 35 y 44 años hasta el 5.9% en los de edades comprendidas entre 85 y 94 años³⁷. Datos obtenidos del INEGI³⁸ en México posicionan a las enfermedades cardiovasculares como la primera causa de mortalidad con un 17% de prevalencia, siendo mas frecuentes en los hombres de edades comprendidas entre 30 y 55 años de edad en comparación con las mujeres que presentan un 14% de prevalencia, con una edad que oscila entre los 40 a 60 años de edad. Por otro lado, estudios en países como España que se encuentra en el continente europeo, también ha mostrado un elevado número de

pacientes que ingresan a centros hospitalarios con algún padecimiento isquémico coronario agudo, con una prevalencia de 55%, tal vez la más alta en el mundo convirtiéndose en la primera causa de muerte en ese país³⁹. Considerando la información proporcionada la enfermedad arterial coronaria, así como el síndrome isquémico coronario agudo en un futuro no muy lejano se convertirán ya en enfermedades que serán la primera causa de muerte en el mundo, aunado a los factores de riesgo como la dieta, los ambientales, los genéticos, y los bioquímicos que pudieran desencadenar algún evento coronario agudo.

1.3. Fisiopatogenia del síndrome isquémico coronario agudo.

1.3.1. Migración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Estudios en animales y humanos ha demostrado que la hipercolesterolemia compuesta en su mayoría por LDL, causa una activación focal en el endotelio y espacio subendotelial de las arterias coronarias. Esta provoca la infiltración y retención de LDLs en la íntima arterial que inicia una respuesta inflamatoria en la pared arterial^{40,48}. Es conocido que pacientes con valores < de 200 mg/dl desarrollan eventos coronarios agudos, y que otros con colesterol total > 300 mg/dl no presentan evidencia de enfermedad coronaria hasta edades avanzadas. Así mismo, se sabe que la LDL tiene una íntima relación en el desarrollo de la placa ateromatosa. También se ha visto que en pacientes con igual grado de concentración de

hipercolesterolemia y valores de LDL, presentan diferente evolución clínica, convirtiéndose la hipercolesterolemia en el punto clave en un evento coronario agudo. La internalización y acumulación intravascular del colesterol, LDLs y ésteres de colesterol depende probablemente de dos mecanismos, uno activo dependiente de receptores específicos en el endotelio y otro pasivo de receptores independientes, presumiblemente cuando el daño endotelial es más avanzado^{41-43,48}. El endotelio juega un papel crítico en el proceso de oxidación de LDL, así como las células de músculo liso y la matriz extracelular. En este proceso pueden oxidarse tanto proteínas como lípidos y existen distintos grados de oxidación de LDL, por lo que no se constituye una única partícula de LDL oxidada (LDLox), sino que existe un amplio espectro de LDL oxidadas, en distintas etapas de oxidación^{41,48}. Básicamente primero se oxidan los lípidos con pocos cambios en la apo-B y luego comienzan a oxidarse las proteínas en forma gradual, paso necesario para que las LDLox puedan ser reconocidas por los receptores del monocito/macrófago. Los diferentes grados de oxidación de LDL conllevan diferentes actividades biológicas, por ejemplo la LDL mínimamente oxidada estimula la producción de factor tisular; en cambio la LDLox es citotóxica. Por lo tanto a medida que aumenta el grado de oxidación de LDL, disminuye su capacidad para inducir mediadores de inflamación y aumenta su capacidad tóxica sobre la célula^{42,43}.

La LDLox altera la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS), por lo tanto provoca una disminución de la producción de óxido nítrico (NO) un importante vasodilatador que disminuye la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1, además de mantener el tono vascular adecuado⁴⁴; por otro lado, el anión superóxido (O₂⁻) aumentado en la hipercolesterolemia, produce una inactivación oxidativa del ON produciendo un potente peroxi-nitrito (ONOO⁻), que a bajas concentraciones puede tener igual efecto que el NO; pero en elevadas concentraciones es tóxico para las células endoteliales, provocando una disfunción endotelial⁴⁵⁻⁴⁸. Así mismo, la LDLox puede activar también al factor nuclear de transcripción NFκB estimulando la producción de la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) y al factor estimulador de colonias de macrófagos (MCSF). La lisofosfatídil colina que se encuentra en las LDL induce la expresión de moléculas de adhesión vascular-1 (-VCAM-1), moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y E- y P- selectinas entre otras que se exponen en el endotelio, que participan en la adhesión, rodamiento y migración del monocito hacia el espacio subendotelial^{48,49}.

1.3.2 La matriz extracelular y el proceso oxidativo.

(Retención y Oxidación de LDL's).

Retención. La teoría de que las lipoproteínas entran y se acumulan en la arteria se ha estudiado por décadas^{50,51}. El fenómeno de la infiltración comprende dos factores que confieren acumulación y

retención de las lipoproteínas en la matriz extracelular, el primero es la hiperlipidemia, es decir elevadas concentraciones de lipoproteínas en plasma conllevan a una mayor infiltración hacia la pared arterial. El segundo y tal vez más importante involucra a la matriz extracelular, y sugiere que anomalías en la matriz permiten una gran retención de partículas que contienen lípidos. Es decir, la teoría sugiere que los lípidos son convertidos a formas inflamatorias que conducen a las células blancas a reaccionar con éstas en la pared arterial. Page⁵² y colaboradores sugieren que el fenómeno consiste en la infiltración de lipoproteínas en la pared arterial, que son alteradas a formas tóxicas que promueven una respuesta inflamatoria⁵³. La matriz extracelular está compuesta por colágeno, elastina, proteoglicanos, y proteínas como la fibronectina, laminina y tenascina. La matriz extracelular se extiende de la membrana basal de las células del endotelio a la intima media interna del vaso, formando un continuo contacto con la región pericelular de las células de músculo liso^{50,51}. Dentro de la matriz extracelular los proteoglicanos se distribuyen en dos formas: los proteoglicanos que se encuentran en el ambiente pericelular que están anclados a la membrana plasmática de las células, mientras que otros son secretados por células que son parte del espacio extracelular que usualmente no se conectan físicamente con otras células de la matriz. Los proteoglicanos son macromoléculas compuestas por un grupo complejo de proteínas lineales y de largas cadenas de carbohidratos, llamados glicosaminoglicanos (GAGs).

Éstos son de distintos tipos: el condroitin sulfato (CS), dermatán sulfato (DS), heparán sulfato (HS), keratan sulfato y la hialurona. Varias clases de CS y DS son fundamentales en la arteria, e incluyen también al versican y decorin, dos pequeños proteoglicanos ricos en leucina contenidos en DS y CS respectivamente⁵⁴⁻⁶⁰. El HS contiene proteoglicanos como el sindican y glipican, que son asociados con la membrana celular de las células de músculo liso y células endoteliales, componentes importantes de la pared arterial^{50,51,54,55}. Las células que regulan la producción de los proteoglicanos dentro de la arteria son las células de músculo liso, células endoteliales y los macrófagos responsables de la síntesis de los proteoglicanos en la pared arterial⁵⁶⁻⁶⁰. La asociación de la LDL con los proteoglicanos fue estudiada por Ghero y Bihara-Varga^{61,62} en los años sesenta, demostraron que los mucopolisacáridos de las arterias se unen a la beta lipoproteína formando una asociación compleja donde también participan otras macromoléculas como el fibrinógeno⁶³. Estudios más recientes han demostrado que las VLDL y las LDL interaccionan con los proteoglicanos DS, HS y CS, a diferencia de las HDL's^{63,64}. Las interacciones observadas fueron interpretadas como una unión iónica de grupos amino cargados positivamente en la apoB y grupos de GAGs cargados negativamente⁶⁵⁻⁶⁸. La región responsable de esta interacción entre los proteoglicanos y la LDL es la subunidad apoB100, en la cual se identificaron 8 aminoácidos agrupados cargados positivamente⁶⁹⁻⁷¹. Estos 8 aminoácidos (arginina y lisina)

se identificaron en el sitio B (residuo 3359 a 3369) de la subunidad apoB100 y se observó que interaccionan con proteoglicanos (CS/DS). Por otro lado, Flood y colaboradores;⁶⁵⁻⁶⁸ mostraron que los proteoglicanos también interaccionan con la subunidad apoB48 (B-Ib en el residuo 84 a 94) localizado en el amino terminal de la apo B contenida en la LDL⁶⁷. Otros estudios hacen referencia a interacciones con otros elementos de la matriz extracelular que participan en la retención y acúmulo de las LDLs (colágeno, elastina). Se ha demostrado in vitro que la colágena I y III interaccionan con LDL nativas; también se observó que la LDLox presenta una mayor afinidad por la colágena que la LDL nativa^{62,63}. Por su parte, estudios in vitro de arterias ateroscleróticas versus arterias normales demostraron que la elastina tiene una alta afinidad por la LDLox y/o nativa⁶³. Dadas estas observaciones, la elevada concentración de LDL en plasma y las interacciones de la LDL con la matriz extracelular, conllevan a la retención y acumulación de LDLs y al desarrollo temprano de la placa ateromatosa.

Proceso oxidativo. Las células endoteliales, células de músculo liso y macrófagos, entre otras fuentes importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido (O_2^-) juegan un papel importante en la modificación oxidativa de la LDL a LDLox.

Un evento importante para que se inicie la formación de la placa ateromatosa es el transporte de las LDLox a través del endotelio hacia la pared arterial⁷². Como en párrafos anteriores se mencionó la

LDLox desencadena una inflamación aguda en la cual hay activación de moléculas pro- y antiinflamatorias que conllevan a un evento isquémico coronario agudo. El oxígeno es una molécula abundante en los organismos biológicos, que a pesar de ser un radical, reacciona con moderación por los dos electrones desapareados que presenta. El oxígeno molecular dentro del organismo sufre una reducción univalente a forma (O_2^-) por medio de enzimas como la NADPH, NADH y xantina oxidasa. No enzimáticamente, el oxígeno también puede convertirse a superóxido por la reacción con compuestos de actividad redox semejantes a la semiquinona en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria⁷²⁻⁷⁶. Por otro lado, la superóxido dismutasa (SOD) a partir del anión O_2^- produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede reaccionar con otros radicales como la transición del metal Fe^{2+} a Fe^{3+} que produce grupos hidroxilo (OH^-) altamente reactivos; esto es conocido como la reacción de Fenton. Además, durante el proceso de fagocitosis es secretada una hemo proteína que amplifica el potencial oxidativo del H_2O_2 , ya que interacciona con el Cl^- en condiciones fisiológicas formando hipoclorito ($HOCl$), que interacciona con la molécula de O_2^- produciendo radicales (OH^-)⁷⁶⁻⁷⁹. Así mismo, el complejo NADPH oxidasa, tal vez la mayor fuente de O_2^- , después del transporte de electrones en la mitocondria, tiene un papel importante en la vasculatura de las arterias. El complejo NADPH oxidasa está compuesto por subunidades que se encuentran en la membrana de las células endoteliales,

fibroblastos y células de músculo liso vascular. Este compuesto por enzimas de la familia Nox (1, 2 y 4), así mismo también por p47phox, p67phox y proteínas G rac1 y rac2⁸⁰⁻⁸². Estudios de cultivo celular y en modelos animales provén evidencia del papel crítico de la NADPH oxidasa en el proceso aterosclerótico debido a que este complejo aumenta la concentración de O_2^- . Durante la formación de la placa ateromatosa, el complejo NADPH oxidasa y la producción de O_2^- son incrementados en células vasculares y endoteliales por un número de agonistas (la angiotensina II, trombina, PDGF y el factor de necrosis tumoral-alfa) asociados con la patogenia. Además, estudios en conejos con hipercolesterolemia propensos a desarrollar un evento isquémico coronario agudo, mostraron que el receptor de la angiotensina-1 (AT1) se expresa más en el endotelio e incrementa la producción de O_2^- que se asocia con la disfunción endotelial. Otro estudio mostró que inhibiendo el receptor AT1 con un antagonista, se inhibe el complejo oxidasa y se reduce la aparición temprana de la placa ateromatosa, sugiriendo que el estrés oxidativo juega un papel importante en algún evento isquémico coronario agudo⁸³⁻⁸⁵. Recientemente, Azzumí y colaboradores⁸⁶ reportaron que en placas ateromatosas de humano, la producción de ROS y LDLox son especialmente asociadas con la subunidad p22phox del complejo NADPH oxidasa, lo que sugiere que las ROS catalizan la formación de LDLox, que son reconocidas por macrófagos en el espacio subendotelial dando como resultado la activación y formación de

células espumosas⁸⁷. Otro sistema no menos importante es la activación de xantina oxidasa, que genera O_2^- por la catalización de hipoxantina y xantina a ácido úrico. Bajo condiciones fisiopatológicas esta es otra fuente de estrés oxidativo vascular, ya que la xantina oxidasa existe en plasma, en células endoteliales y células de músculo liso vascular⁷⁵. En conejos hipercolesterolemicos se ha observado incremento en la actividad vascular de la xantina oxidasa⁸⁸. El desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa (NOS), en especial la NOS endotelial también son fuente importante de O_2^- en la patología⁸⁹. Es claro observar que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la transformación de la LDL nativa a LDLox. (Figura 5)

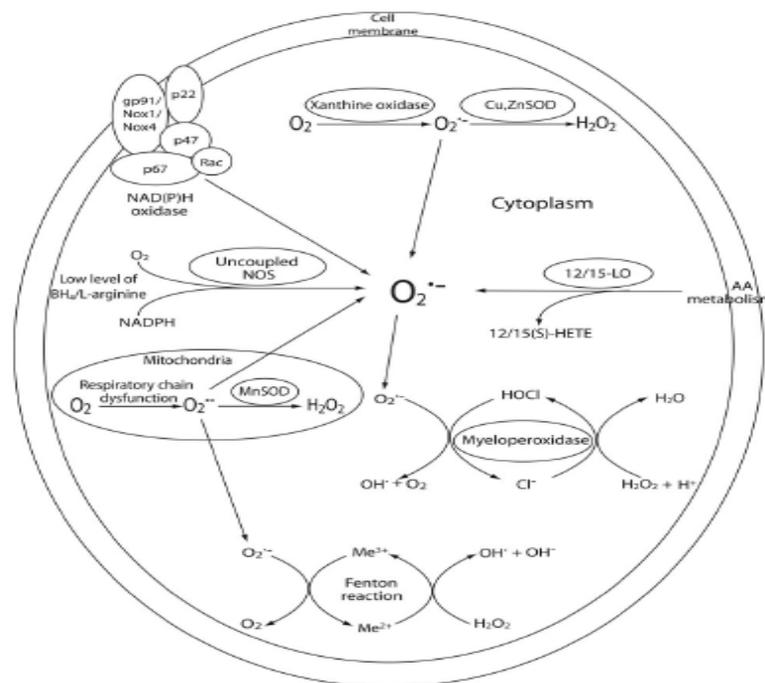


Figura 5. Reacciones químicas más importantes en la producción de superóxido. Tomada de Nagewara R et al. 2005 Arter Thromb Vasc Biol.

1.3.3. Proceso inflamatorio.

La inflamación juega un papel importante en el desarrollo del SICA. En los últimos años, un número creciente de observaciones ha demostrado que la inflamación juega un papel muy importante en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, hasta el punto de que, actualmente, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria ^{6,7,14,90}.

El fenómeno inflamatorio se inicia cuando las lipoproteínas circulantes quedan atrapadas en la matriz extracelular subendotelial y se oxidan, adquiriendo así propiedades pro-inflamatorias que dan lugar a una cadena de eventos que van desde el depósito de monocitos circulantes que exacerbaban la respuesta inflamatoria al fagocitar los lípidos, la producción excesiva de elementos de la matriz extracelular y reclutamiento de nuevas células.

Todos estos eventos van provocando un aumento en el volumen del ateroma o placa ateromatosa y la consecuente disminución de la luz arterial llegando incluso a ocluirla por completo, lo que generará isquemia del tejido irrigado por tal vaso. Sin embargo, otro evento frecuente es que ocurra la ruptura de la placa, con lo que se exponen componentes subendoteliales altamente trombogénicos que generan trombosis arterial y por lo tanto isquemia, que dependiendo del vaso sanguíneo que se trate, será la menor o mayor lesión al tejido, en especial cardíaco.

Sin lugar a dudas el fenómeno inflamatorio desempeña un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria y probablemente constituye el factor de transformación de un síndrome coronario estable a inestable⁹¹⁻⁹³. La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento del ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos^{6,90,94}.

Los datos acumulados demuestran que la concentración elevada de marcadores circulantes de inflamación predice una respuesta cardiovascular desfavorable en individuos asintomáticos, en pacientes con cardiopatía isquémica estable y en pacientes con síndromes coronarios agudos⁹⁵⁻⁹⁷. Varios estudios "in vitro" y en animales experimentales son apoyados por hallazgos clínicos de incremento de marcadores inflamatorios en pacientes con angina estable crónica⁹⁸, angina inestable, e infarto agudo del miocardio^{99,100}.

De las moléculas inflamatorias que participan en esta serie de eventos destacan la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-10 (IL-10), así como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) y el interferón-gamma (INF- γ)¹⁰¹⁻¹¹⁰. Estas citocinas juegan un papel fundamental ya que están involucradas en la regulación de la hematopoyesis, linfopoyesis y afectan la función de todos los tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio. Sus principales efectos en el sistema cardiovascular incluyen el incremento en la

expresión de moléculas de adhesión, la producción de citocinas endoteliales y óxido nítrico, aumento de la permeabilidad vascular, reducción de la actividad de lipoproteína lipasa, incremento de la síntesis de ácidos grasos hepáticos, y efecto protrombótico¹⁴. (Figura 4).

1.3.3.1. Las Citocinas.

Son moléculas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 KDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Aunque en general las producen los leucocitos, también pueden ser secretadas por otros tipos celulares como macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso entre otras. Muchas interacciones críticas entre las células del sistema inmune se controlan a través de mediadores solubles como las citocinas. En la actualidad se han identificado varios cientos de citocinas. Cada citocina es secretada por tipos celulares específicos como respuesta a una gran variedad de estímulos y, por tanto, cada citocina produce efectos característicos sobre el crecimiento, la movilidad, la diferenciación o la función de las células blanco. De manera colectiva, las citocinas regulan no sólo las respuestas inmunes e inflamatorias, sino también la curación de heridas, hematopoyesis, angiogénesis y muchos otros procesos biológicos. Las citocinas actúan mediante su unión a receptores de superficie específicos localizados en las células blanco y se producen localmente en una gran variedad de tejidos y células. Cuadro 1.

Citocina	Acción	Lugar de síntesis	Inductor	Acciones más importantes
IL-1	Proinflamatoria	Células mononucleares	Microbiana o activación cascada inflamatoria (CI)	Pirógeno
IL-2	Antiinflamatoria	linfocitos Th colaboradores	Sustancias microbianas o activación de CI	Factores de crecimiento de células T induce la proliferación de todos los tipos de subpoblaciones linfocitarias. Estimula síntesis de interferón liberación de IL-1, TNF-alfa y beta
IL-4	Antiinflamatorio	Linfocitos Th, mastocitos y basófilos	Linfocitos B (Diferenciación de Linfocitos B)	Bloquea síntesis de citoquinas, inhibe la síntesis de NOVO
IL-6	Proinflamatoria	Monocitos, macrófagos, célula endotelial y fibroblastos	Il-1 y endotoxinas	Pirógeno, síntesis de Ig's. Activación de la síntesis de de proteínas de fase aguda
IL-8	Proinflamatoria	Monocitos, macrófagos, célula endotelias y fibroblastos	IL-1, TNF-alfa y endotoxinas	Factor quimiotáctico y activador de neutrófilos
IL-3	Proinflamatoria	Linfocitos T activados, mastocitos	La hematopoyesis en situaciones de estrés.	Regulador de la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyeticos.
IL-5		linfocitos CD4+ activados del tipo Th2.	Responsable de la eosinofilia en infecciones parasitarias	Regulador de la proliferación de los eosinofilos, actúa sobre los linfocitos B estimulando la producción de IgA
TNF (α y β)	Proinflamatorio	Monocitos, macrófagos y células mononucleares.	Inducen moléculas de adhesión y una respuesta inflamatoria.	Respuesta a antígenos bacterianos, responsable del shock séptico.

IL-10	Antiinflamatoria	Monocitos, macrófagos, célula endotelial y fibroblastos, también por linfocitos del tipo Th2	Inhibe la síntesis de muchas citocinas de tipo Th1	Efecto antiproliferativo, inmunomodulador, regula la angiogénesis.
INF-gamma	Modulador	Monocitos, macrófagos, célula endotelial y fibroblastos	Elevan la producción de TNF, MHC I y II	Favorece la respuesta inflamatoria, induciendo la diferenciación de los linfocitos T hacia células efectoras Th1.
TGF-beta	Modulador	Linfocitos T, Monocitos, macrófagos, plaquetas entre otras células mononucleares	Induce la proliferación de fibroblastos, osteoblastos y células musculares lisas e incrementa la síntesis de matriz extracelular.	Inhibe la síntesis de INF-gamma, TNF-alfa, IL-1, así como la citotoxicidad natural.

Cuadro 1. Representa algunas citocinas de interés biológico importante: el cuadro describe la nomenclatura, función, síntesis, inducción y efecto que esta tiene. Tomado y Modificado de las referencias ^{116,117}.

Por lo tanto, las citocinas como grupo funcionan como moléculas esenciales para la señalización intercelular y son responsables de la comunicación multidireccional entre las células involucradas en la defensa del huésped, reparación de tejidos y otras funciones trascendentes. Las citocinas regulan la producción y actividad de otras citocinas a través de mecanismos como competencia, sinergismo e inducción mutua, lo cual es en una red compleja de cascadas de citocinas y circuitos reguladores con efectos de retroalimentación positiva y negativa^{111, 112}.

1.3.3.2. IL-1

La IL-1 es una de las primeras citocinas pro-inflamatorias en producirse durante el proceso aterogénico. Esta citocina presenta dos formas biológicamente activas, la IL-1 α y la IL-1 β .¹¹³ En humanos, la IL-1 β se encuentra predominantemente en circulación y la IL-1 α es un regulador de eventos intracelulares y mediador de inflamación local.^{113,114} La IL-1 α y la IL-1 β se pueden unir a los mismos receptores en la superficie de las células blanco.¹¹⁵ Existen dos tipos de receptores de IL-1 (IL-1R), el tipo I (IL-1RI) y el tipo II (IL-1RII).¹¹³ La IL-1 se puede unir a el IL-1RI y transducir señales, además puede formar un complejo de baja afinidad con proteínas accesorias, pero cuando se une a el IL-1RII, no transduce señales.¹¹³ Los principales tipos celulares que sintetizan IL-1 son los monocitos, macrófagos y los macrófagos derivados de células espumosas, sin embargo hay otras células como las endoteliales que también pueden producirla^{113, 114}.

La IL-1 está involucrada en la inflamación que ocurre en la pared vascular durante la aterogénesis mediante la activación de monocitos y la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, además de otras citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación de células del músculo liso^{113, 114}.

De esta manera, la IL-1 puede participar en la aterogénesis a través de la proliferación de células de músculo liso¹¹⁶, y la actividad procoagulante de las células endoteliales¹¹⁷, también se ha observado que puede afectar el metabolismo de lípidos¹¹⁸. Finalmente, se ha

demostrado que la IL-1 tiene un papel importante en la patogénesis de la enfermedad arterial coronaria debido a que hay un aumento en la síntesis de esta citocina en las placas ateromatosas, además de concentraciones elevadas de IL-1 β en suero de pacientes con EAC¹¹⁹. Aunque el papel de la IL-1 parece ser muy importante en la aterogénesis, no se sabe con claridad si es un marcador independiente o asociado a eventos cardiovasculares o solo es una molécula que se produce por otros estímulos inmunológicos de la enfermedad. De hecho un estudio epidemiológico con marcadores genéticos, VNTRs (repetidos en tandem de número variable) en el gen del antagonista del receptor de IL-1 (*IL-1Ra*) y un SNP (polimorfismos de un sólo nucleótido) en el gen de *IL-1B*, no reporto evidencia de asociación entre estos polimorfismos y la enfermedad arterial coronaria¹¹⁰. De tal forma, se requieren más estudios para determinar si niveles elevados de IL-1 en plasma están asociados con EAC y SICA e incursionar en el estudio genético de esta citocina para tratar de conocer si, además, existe susceptibilidad genética en el desarrollo de esta enfermedad al analizar el gen y sus polimorfismos en diferentes poblaciones humanas.

1.3.3.3. TNF- α

El TNF- α es una citocina pro-inflamatoria con múltiples actividades biológicas y con un potente efecto inotrópico negativo¹²⁰. Entre las funciones biológicas descritas para el TNF- α se encuentran la producción de citocinas, proteínas de fase aguda, aumento en la expresión de moléculas de adhesión, activación de neutrófilos y co-estimulador de

activación de células T. El TNF- α transduce señales a través de dos distintas vías debido a dos tipos de receptores transmembranales, el receptor TNF- α tipo I (TNFR-I) y el receptor tipo II (TNFR-II)^{121, 122}. Se ha identificado la expresión de estos receptores en todos los tipos celulares excepto en eritrocitos^{120,121}. Además de estos receptores, hay formas solubles que se pueden unir a TNF- α . Estos receptores solubles son formas truncadas de TNF- α , que pueden unirse a esta molécula y regular su actividad biológica¹²³. Las principales células que sintetizan TNF- α son los monocitos y macrófagos, aunque otras células que también lo sintetizan son los linfocitos T, las células NK (asesinas naturales), las células de músculo liso, las células endoteliales y algunas células tumorales¹²⁴. Tanto el TNF- α como la IL-1 β se han asociado directamente con inflamación local y generalizada debido a que tienen un efecto biológico similar¹²⁰.

Se ha documentado que el TNF- α influye en la patogénesis de la aterosclerosis debido a que está involucrado en la síntesis de proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva y de otras citocinas como la IL-1 e IL-6 que actúan como factores de riesgo en enfermedades cardiovasculares¹²⁰. Niveles elevados de TNF- α y de sus receptores solubles en plasma se han asociado con la insuficiencia cardíaca, el infarto agudo al miocardio y la enfermedad arterial coronaria¹²⁵. Algunos autores han reportado que la forma soluble de los receptores podría tener un papel protector contra el efecto pro-inflamatorio del TNF- α ¹²⁶⁻¹²⁸. Sin embargo, ahora se sabe que tanto el TNF- α como sus

receptores solubles (TNFR-1 y TNFR-II) participan como factores independientes de mortalidad en insuficiencia cardiaca¹²⁹. Un estudio sugirió que la forma soluble del TNFR-I es el principal predictor a corto y largo plazo de mortalidad y eventos cardiovasculares en pacientes que presentaron IAM¹³⁰.

1.3.3.4. IL-6

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria secundaria, con múltiples funciones biológicas como la regulación de la respuesta inmune, inflamación, hematopoyesis y regulación de la síntesis de proteínas de fase aguda en el hígado¹³¹⁻¹³³.

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares como las células del endotelio, del músculo liso, los linfocitos y los macrófagos y uno de sus principales papeles es la regulación de la respuesta inmune humoral, afectando la producción de inmunoglobulinas en las células B, y de tipo celular al regular la actividad citotóxica de la célula T¹³⁴. Evidencias experimentales indican que esta molécula tiene un papel medular en muchas enfermedades crónicas inflamatorias y en el daño tisular¹³⁵.

El efecto biológico de la IL-6 depende de su interacción con su receptor (IL-6R). El complejo entre la IL-6/IL-6R se asocia a una proteína de membrana celular que transduce señales, denominada gp130. Este evento permite la dimerización de gp130 para iniciar la cascada de señalización intracelular^{132, 136}.

El IL-6R se presenta en dos formas: 1) unida a la membrana celular y 2) en su forma soluble (sIL-6R). Ésta última, de manera interesante, no

tiene un efecto antagonista en la función biológica de IL-6 sino un efecto agonista. Estudios *in vivo* han demostrado que el complejo IL-6/sIL-6R asociado con gp130 puede activar varios tipos celulares; sin embargo, se ha observado que la IL-6 por sí sola no puede ejercer este efecto biológico^{136, 137}. La forma soluble que se produce de la gp130 puede inhibir la actividad de la IL-6 mediante su unión con el complejo IL-6/sIL-R6^{132, 136-138}. Varios estudios muestran que la IL-6 no sólo actúa como una de las principales citocinas inductoras de proteínas de fase aguda, sino también de citocinas y factores de crecimiento, activación de plaquetas, regulación de procesos procoagulantes y de la actividad mitogénica de las células de músculo liso¹²⁰.

Como ya se ha dicho, en la enfermedad arterial coronaria, así como en el síndrome isquémico coronario agudo, la inflamación tiene un papel central y se ha observado que proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, se encuentran drásticamente aumentadas en el plasma de los pacientes, por lo que se ha sugerido que la IL-6 tiene un efecto directo en ambas enfermedades. De hecho, en las placas ateroscleróticas humanas se han encontrado niveles elevados de la IL-6 y varios estudios han reportado una asociación directa entre la IL-6 y el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo^{120, 139}. Actualmente se sabe que la IL-6 es un factor de riesgo independiente a futuros eventos de IAM¹⁴⁰. Lindmark y colaboradores demostraron que los niveles elevados de la IL-6 en circulación es un marcador predictor que incrementa la mortalidad en

individuos con enfermedad arterial coronaria y que es independiente de otros como la troponina T y la proteína C reactiva¹⁴². Thomas y colaboradores también encuentran una asociación entre los niveles elevados de la IL-6 y la presencia de infarto agudo del miocardio confirmando los estudios en donde se establece que la IL-6 es un marcador independiente de otras proteínas como la proteína C reactiva para futuros eventos de infarto agudo del miocardio¹⁴².

1.3.3.5. IL-10

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria que tiene varios efectos biológicos incluyendo la inhibición del TNF- α , de la IL-18 y de la metaloproteasa 9^{143, 144}. Entre sus principales funciones biológicas están la limitación y el “apagado” final de la reacción inflamatoria de un huésped en respuesta a un patógeno¹⁴⁵. Su efecto sobre los macrófagos no está limitada sólo a la regulación de citocinas, sino también a su papel en la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, de antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase II, a la presentación de antígenos y activación de linfocitos¹⁴⁵. De hecho, en suero de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo se han encontrado niveles bajos de IL-10.¹⁴⁶ Estas evidencias experimentales sugieren que niveles reducidos de IL-10 en plasma pueden favorecer la inestabilidad de la placa y el desarrollo de algún evento coronario agudo. Por otro lado, niveles altos de IL-10 en plasma se han asociado a mejoría vasorreactiva endotelial sistémica, en pacientes con elevadas cantidades de proteína C reactiva¹⁴⁷. Esto concuerda con lo reportado en algunos

estudios en donde se ha observado que niveles elevados de IL-10, en suero en pacientes con enfermedades cardiovasculares, no sólo predicen un mejor resultado clínico después de un evento coronario agudo, sino que también eliminan el riesgo asociado con niveles elevados de proteína C reactiva en suero^{148, 149}.

De hecho, la IL-10 ha mostrado tener un efecto protector en la función endotelial después de un estímulo inflamatorio agudo, ya que limita la generación de superóxido dentro de la pared vascular¹⁵⁰. Estudios *in vitro* sugieren que la IL-10 tiene un efecto anti-aterogénico, debido a que inhibe la adhesión de monocitos a células endoteliales, el cual es el primer paso para la invasión a la pared celular^{151, 152}. Otra función de la IL-10 consiste en inhibir la síntesis de la metaloproteasa 9, mediante la producción de inhibidores fisiológicos e inhibidores de las metaloproteasas¹⁵².

A pesar de estas evidencias experimentales, se requieren de más estudios clínicos acerca de la IL-10 en plasma durante enfermedad aterosclerótica estable e inestable, ya que hasta el momento los datos obtenidos en humanos son escasos y controversiales.

1.3.3.6. TGF- β

El TGF- β es una citocina pleiotrópica que es secretada por muchos tipos celulares como los macrófagos, los linfocitos, las células de músculo liso y las plaquetas. Es secretado en forma inactiva pero es activado cuando es degradado proteolíticamente¹⁵³. Se ha descrito que el TGF- β tiene acción anti-inflamatoria¹⁴⁶. Ensayos *in vitro* sugieren que

el TGF- β puede regular la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares en humanos, inducidas por citocinas pro-inflamatorias¹⁵⁴. En los últimos años, se ha propuesto que el TGF- β puede tener un papel protector en la aterogénesis a través de la inhibición de la migración y proliferación de células del músculo liso y macrófagos ejerciendo un efecto protector en la función endotelial^{155, 156}. Se ha observado que el TGF- β disminuye la adhesividad de las células endoteliales a los leucocitos y linfocitos. Este efecto protector se debe a la inhibición en la expresión de VCAM-1, la cual es regulada por el TGF- β ¹⁵⁴.

Algunos estudios han reportado niveles bajos de la forma activa del TGF- β en estadios avanzados de aterosclerosis¹⁵⁷. Otros, han explorado la asociación entre el TGF- β y la enfermedad arterial coronaria y han observado niveles altos en suero de la forma activa del TGF- β y se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad, por lo cual éste es reportado como un factor de riesgo independiente de otros marcadores estándar¹⁵⁸. Así mismo, se sabe que el TGF- β tiene un efecto pro-inflamatorio y que participa en la excesiva acumulación de matriz extracelular en las paredes de los vasos dañados, lo cual es muy desfavorable para éstos^{154,159}. Esto último contradice a lo que clásicamente sabemos acerca del TGF- β ; sin embargo, cada vez se acepta más la teoría de que el TGF- β tiene un papel anti-aterogénico y estabilizador de las placas¹⁵⁹. Finalmente y de la misma forma que en el conocimiento de otras moléculas pro y anti-inflamatorias, es necesario realizar más estudios para determinar el papel de esta molécula en la

aterosclerosis, la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo.

1.3.3.7. *INF- γ* .

Los interferones (INFs) consisten en una familia de citocinas que no sólo comparten actividad antiviral, sino también poseen la capacidad para inhibir la proliferación celular modulando la respuesta inmunitaria. Se clasifican en tipo I y tipo II, de acuerdo al receptor y homología que estos presentan¹⁶⁰. Los interferones tipo I comprenden los subtipos INF- α , INF- β , INF- ω y INF- τ , los cuales se relacionan estructuralmente. En general los INFs tipo I son secretados en bajos niveles por muchas células dentro de las cuales destacan las células hematopoyéticas, fibroblastos, macrófagos, entre otras¹⁶⁰⁻¹⁶².

El INF- γ es del tipo II. No se relaciona estructuralmente con el tipo I y se une a un diferente receptor, y es codificado por un locus cromosomal diferente. En algún tiempo se creía que sólo los linfocitos CD4+, CD8+ y las células asesinas naturales (NK) producían INF- γ ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Sin embargo, hay evidencia que muchas otras células producen INF- γ (células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, entre otras)^{164,165}. La producción del INF- γ es controlada por citocinas como la IL-12 e IL-18 que son secretadas por las células presentadoras de antígeno en la respuesta inmune innata¹⁶⁶. Por otro lado, la regulación negativa también es por citocinas como la IL-4 e IL-10, TGF- β y glucocorticoides^{167,168}. Se ha demostrado que durante un evento coronario agudo se desarrolla un evento inflamatorio agudo y una

elevación de INF- γ por la activación de linfocitos T y macrófagos^{169,170}. Estudios in vivo en modelos animales han demostrado que hay una activación de las células Th1 en respuesta a un daño aterogénico. Además, se sabe que el INF- γ juega un papel de riesgo en el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo, debido a que induce una desregulación de la producción de óxido nítrico e inhibe la producción de matriz extracelular promoviendo el proceso apoptótico haciendo la placa más vulnerable¹⁷¹⁻¹⁷³. Diversos estudios han demostrado que niveles elevados de INF- γ en suero promueven la activación de citocinas pro-inflamatorias y el desarrollo temprano de la placa ateromatosa.

1.3.4. Trombosis, rotura y erosión de la placa ateromatosa.

La trombosis es inducida por la ruptura o erosión de la placa. Puede dar lugar a cambios rápidos en la severidad de la estenosis y dar lugar a oclusión vascular total. El conjunto de lípidos, que es expuesto tras la ruptura es altamente trombogénico y tiene una alta concentración de factor tisular^{174-176,14}. Se ha encontrado que la actividad procoagulante sistémica de los monocitos esta elevada en pacientes con AI.

También se implican factores relacionados con la hipercoagulabilidad sistémica, la hipercolesterolemia, el fibrinógeno y la infección en la génesis del trombo. El trombo que se observa en el síndrome isquémico coronario agudo es rico en plaquetas. La obstrucción inicial del flujo coronario se debe a agregación plaquetaria pero la fibrina es importante para la posterior estabilización del trombo. La respuesta

trombótica de la placa es dinámica, es decir, se producen de manera simultánea los fenómenos trombóticos y los trombolíticos, dando lugar a interrupción intermitente del flujo coronario que explican episodios transitorios de oclusión y sub-oclusión que se asocia con cambios en el electrocardiograma y en la clínica de los pacientes¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Las placas vulnerables (con tendencia a la rotura) tienen una gran acumulación de lípidos, baja densidad de células lisas, alta densidad de macrófagos, una delgada capa fibrosa con colágeno desorganizado y una alta concentración de factor tisular y constituyen el sustrato de entre $\frac{2}{3}$ y $\frac{3}{4}$ de los trombos coronarios^{14,30,180}. El núcleo lipídico de las placas con tendencia a la ruptura tiene un gran contenido de ésteres de colesterol con una gran proporción de ácidos grasos polinsaturados, sobre todo en los niveles mas superficiales. La proporción relativa de los diferentes ácidos grasos contribuye a la agregación y activación plaquetaria local, así como a la formación del trombo. (Figura 6)

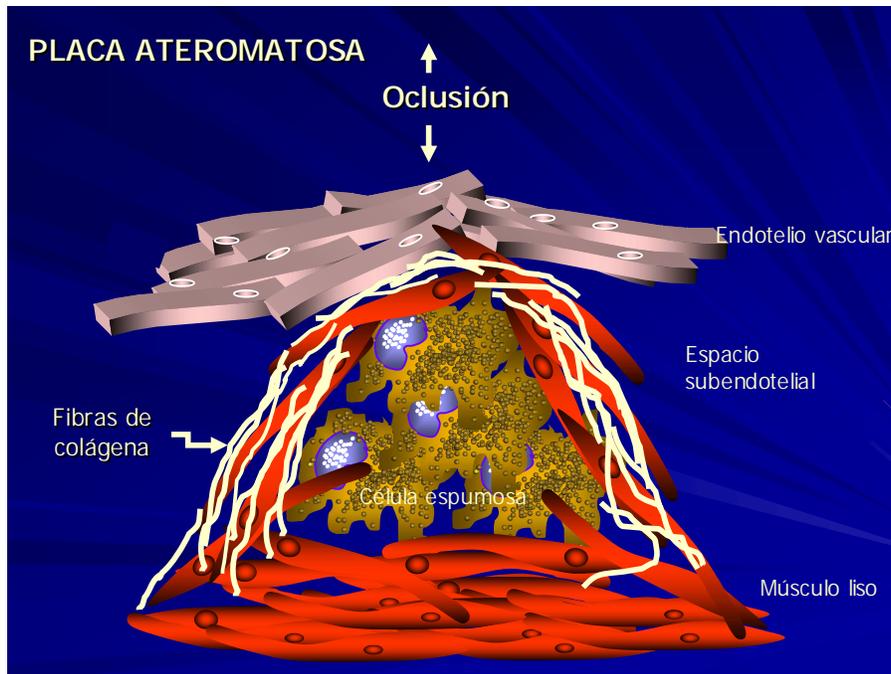


Figura 6. Formación del trombo.

La ruptura de la placa aterosclerótica se produce como consecuencia de la conjunción de varios mecanismos:

Mecanismo activo: Se debe a la secreción de enzimas proteolíticas por los macrófagos, que pueden debilitar la capa fibrosa.

Mecanismo pasivo: Se relaciona con fuerzas físicas aplicadas sobre la zona más débil de la capa fibrosa, que corresponde con la zona más delgada de ésta, a nivel de la unión con la pared arterial normal.

La vulnerabilidad de la placa puede relacionarse con localización, tamaño y composición del núcleo lipídico, y también con el impacto del flujo en la superficie luminal de la placa^{14,30}. Junto a la rotura de la placa, los fenómenos erosivos de la misma también se han descrito como mecanismos subyacentes en el síndrome isquémico coronario agudo¹⁸¹⁻¹⁸⁵. Parece ser más frecuente en hombres, diabéticos e hipertensos; así mismo existen datos que indican que se producirá

con mayor frecuencia en individuos que desarrollen estenosis de alto grado y en estenosis localizada en la arteria coronaria¹⁸³⁻¹⁸⁶.

1.4. Estudios de susceptibilidad genética.

En las últimas 2 décadas varios estudios han demostrado que el proceso inflamatorio juega un papel importante en el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo y/o algún evento inflamatorio, en especial las citocinas pro- y antiinflamatorias como la IL-1, la IL-6, la IL-10, el TNF- α , el INF- γ y el TGF- β que regulan y/o activan el proceso inflamatorio^{2,14,139,187-189}. Estudios de susceptibilidad genética indican que un grupo de genes localizados en la región 2q13 del cromosoma 2 se asocian con la susceptibilidad a desarrollar eventos inflamatorios¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Uno en la región promotora (IL-1B -511T>C) que se relaciona con una mayor producción de IL-1 β en pacientes con espondilitis anquilosante, sepsis, diabetes, cáncer de útero¹⁹⁰⁻¹⁹³. Así mismo, cuatro sitios polimórficos en el gen del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RN4T>C, IL-1RN6/1C>T, IL-1RN6/2G>C y IL-1RN-VNTR's) que se relacionan con un defecto de reconocimiento del antagonista: el antagonista tiene una función antiinflamatoria debido a que inhibe la activación de la IL-1 β ¹⁹⁰⁻¹⁹³. El TNF- α presenta varios sitios polimórficos en la región promotora del gen, los más estudiados en la literatura son el TNF- α -238 A>G y el TNF- α -308 T1>T2, que se ubican en la región 6p21 del cromosoma 6. Se ha demostrado que ambos sitios polimórficos elevan la expresión de la citocina¹⁹⁴⁻¹⁹⁸. Al igual que el TNF- α , la IL-6 es una citocina pro-inflamatoria muy importante en el proceso

ateromatoso. El gen de la IL-6 presenta varios sitios polimórficos en la región promotora de los cuales el IL-6 -572 C>G y el IL-6 -1426 G>T se relacionan con una elevada expresión y producción a nivel local y sistémico en pacientes con enfermedad arterial coronaria, hipertensión, aterosclerosis, diabetes e infarto agudo del miocardio ¹⁹⁹⁻²⁰². Por otro lado, el gen que codifica para el INF- γ , se localiza en el cromosoma 12 en la región 12q24.1. Presenta varios polimorfismos de los cuales el INF- γ -155 G>A y el INF- γ -179T>G presentes en la región promotora, se han asociado con la elevada producción y expresión del INF- γ en pacientes con cáncer cervical, hepatitis C, hepatitis B y síndrome respiratorio agudo ²⁰³⁻²⁰⁷. Por otro lado, las citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β tienen un papel importante como inhibidores de la respuesta Th1 durante un proceso inflamatorio y la formación de la placa ateromatosa. Estas citocinas juegan un papel muy importante en la susceptibilidad a desarrollar SICA, así como otras enfermedades cardiovasculares ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. El gen de la IL-10 presenta varios sitios polimórficos en la región promotora que están relacionados con una baja expresión de la IL-10. En la literatura los más estudiados son tres sitios polimórficos en la región promotora (IL-10-592C>A, IL-10-819T>C, IL-10-1082G>A) localizados en la región 1q31-32 del cromosoma 1, que se tienen bien relacionados con infarto agudo del miocardio, enfermedad arterial coronaria y tuberculosis ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Se ha observado que estos sitios polimórficos tienen el efecto de disminuir la expresión de la IL-10 ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

El gen del TGF- β presenta varios sitios polimorficos que se han relacionado con una baja expresion de la molécula en diferentes enfermedades. Los sitios polimórficos mas estudiados son la región promotora el TGF- β -509C>T y el TGF- β T29C en el exón 1, localizados en la región 19q13.2 del cromosoma 19, que elevan su expresión y producción en pacientes que padecen enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer y obstrucción pulmonar²⁰⁸⁻²¹⁴.

II. JUSTIFICACION

Justificación

El síndrome isquémico coronario agudo es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) definen a las enfermedades cardiovasculares como la primera causa de muerte en México²¹⁵. Este padecimiento es de origen multifactorial, es decir en su desencadenamiento participan tanto factores genéticos como ambientales. El estudio de los genes que codifican para proteínas relevantes en la patogénesis del padecimiento será muy importante para definir marcadores de susceptibilidad o resistencia al desarrollo de esta enfermedad y que en un futuro permitirán tratamientos mejores y más dirigidos.

III. HIPOTESIS.

Si las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 y TGF- β regulan el proceso inflamatorio que conlleva al desarrollo de la placa ateromatosa y por tanto al síndrome isquémico coronario agudo, y los genes de las citocinas presentan sitios polimórficos que regulan su producción, algunos de sus alelos podrían diferenciar a los pacientes de los individuos control y ser por tanto marcadores de susceptibilidad para este padecimiento en la población mexicana.

IV. OBJETIVOS.

a) Objetivo General

Determinar el papel que tienen los sitios polimorficos de los genes de las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias más importantes (IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 y TGF- β) en la susceptibilidad genética al desarrollo y/o resistencia al síndrome isquémico coronario agudo en la población mexicana.

b) Objetivos específicos

I). Generar una genoteca de muestras de pacientes con diagnóstico de síndrome isquémico coronario agudo e individuos control.

II) Determinar la frecuencia alélica y genotípica de los sitios polimórficos presentes en los genes que codifican para las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-10 y TGF- β en un grupo de pacientes mexicanos con síndrome isquémico coronario agudo.

III). Determinar estas mismas variantes en un grupo control sin antecedentes familiares ni clínicos de algún evento cardiovascular y/o sistémico pareados por edad, sexo y origen étnico.

IV). Una vez definidas estas frecuencias, compararlas entre los dos grupos de estudio con el fin de definir si algún polimorfismo de las citocinas en estudio pudiera estar confiriendo susceptibilidad y/o resistencia para el desarrollo de este padecimiento en la población mexicana.

V). Analizar el desequilibrio de ligamiento entre los diferentes polimorfismos y construir distintos haplotipos.

VI). Definir si alguno de los haplotipos pudiera estar confiriendo susceptibilidad y/o resistencia al desarrollo del padecimiento.

V. METODOLOGÍA

Tipo de Estudio: El diseño experimental fue de tipo prospectivo, transversal y comparativo.

Criterios de Inclusión:

1. Consentimiento informado firmado
2. Edad mayor de 40 años menores de 70 años
3. Que al momento del ingreso tengan:
 - A. Síntomas de infarto agudo del miocardio de localización inferior (IAM-INF) caracterizado por dolor de tipo anginoso (localizado en el precordio, el cual se puede irradiar hacia la base del cuello, la mandíbula o hacia las extremidades superiores) de más de 30 minutos de duración, el cual haya sucedido en las últimas seis horas, que puede estar acompañado de síntomas neurovegetativos (diaforesis, sensación de náuseas y/o vómito, sensación y/o acción de micción o defecación).
 - B. Cambios electrocardiográficos: Elevación del segmento ST de ≥ 0.1 mV en dos o más de las derivaciones estándar electrocardiográficas. Así mismo se puede considerar: a un nuevo hallazgo o nueva presunción de bloqueo completo de la rama izquierda del haz de His asociado a los síntomas previamente referidos.

Criterios de exclusión

1. Que se encuentre en periodo de embarazo o lactancia.
2. Síntomas sugestivos de disección aórtica.
3. Inclusión previa al presente estudio.
4. Cualquier condición médica por la cual el enfermo este impedido de complementar el presente estudio o que le produzca un riesgo significativo.
5. Sujetos con incremento elevado de sangrado severo.
6. Cualquier historia de accidentes cerebro vasculares, isquemia cerebral transitoria o cualquier indicio de daño estructural del sistema nervioso central v.g. neoplasia intracraneal o intraespinal, aneurisma o malformación arteriovenosa.
7. Retinopatía diabética hemorrágica u otra condición hemorrágica oftálmica.

Pacientes.

El estudio incluyó 336 pacientes mestizos mexicanos con síndrome isquémico coronario agudo de los cuales 270 fueron hombres y 66 mujeres, con un rango de edad 59.05 años +/- 11.58, que fueron referidos al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. De estos pacientes 218 presentaron infarto agudo del miocardio y 118 presentaron angina inestable.

El diagnóstico del síndrome isquémico coronario agudo fue basado en la historia clínica, el examen físico, el electrocardiograma, los marcadores bioquímicos (Troponina I, II y Creatinin fosfoquinasa) y

la angiografía coronaria, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud y al Colegio Americano de Cardiología de la Asociación Americana de Corazón.

Controles.

El grupo control incluyó 248 individuos no relacionados entre sí (196 hombres y 52 mujeres con un rango de edad 56.04 +/- 4.12, sin ninguna enfermedad vascular y/o sistémica previa. Ninguno de los sujetos control presentó diabetes, hipertensión, dislipidemia o algún otro tipo de enfermedad crónica. Todos los sujetos (pacientes y controles) fueron pareados de acuerdo a su origen étnico, edad y género. Nosotros consideramos mestizos mexicanos solo a los individuos que por tres generaciones incluyendo la presente hayan nacido en México.

A) Tamaño de la muestra:

El tamaño aproximado de la muestra se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula, utilizando un paquete estadístico para el cálculo de la misma.

a) Fórmula para un estudio de prevalencia de proporciones.

$$n = \frac{N Z^2 p (1-P)}{D^2 (N-1) + Zc^2 P (1-P)}$$

n= Efecto de diseño (Tamaño de la muestra)

N= Población total

Z= Valor de Z (corresponde al valor de confianza)

D= Precisión absoluta (valor de confianza deseado, 5%)

P= Proporción esperada en la población (10%)

Para lo cual los datos necesarios son:

- Precisión deseada %
- Prevalencia esperada
- Efecto de diseño
- Nivel de confianza

B) Extracción de ADN.

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el DNA genómico por medio de la técnica de expulsión salina²¹⁶. (Anexos IX)

C) Sitios polimórficos analizados.

De acuerdo a los reportes previamente publicados de asociación entre los polimorfismos de las citocinas y enfermedades cardiovasculares en otras poblaciones, se decidió estudiar los siguientes polimorfismos que se muestran en la tabla 1: cabe destacar que algunos de los sitios polimórficos los escogimos nosotros por su efecto que tiene en otro tipo de enfermedades inflamatorias.

IL-1	En la región promotora IL-1B-511 (rs16944). De la familia de homólogos el IL-1F10.3 (rs3811058). De los antagonistas del receptor de IL-1: R/N.4T>C(rs419598), RN.6/1C>T(rs315952), RN.6/2C>G(rs315951), IL-1RN VNTR's(rs2234663).
IL-6	En la región promotora el -572G/C (rs1800796), -1426G/T (rs2069827).
TNF-α	En la región promotora, el TNF-238(rs361525) y el TNF-308(rs1800629).
INF-γ	En la región promotora el -179G>T (rs2069709) y -155 A>G (rs2069710).
IL-10	En la región promotora (-1082G/A(rs1800896), -819C/T(rs1800871), y -592 C/A (rs1800872).
TGF-β	En el exón 1 T29C (rs1982073, también marcado como rs1800470), en la región promotora -509C/T (rs1800469).

Tabla 1. Se muestra la citocina, región donde se encuentra el SNP en el gen e identificación del SNP (**rs**) que es el número que se le da de acuerdo a la base de datos del GenBank.

D) La determinación de los sitios polimórficos.

Los genotipos de los diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) se determinaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando ensayos TaqMan de la casa comercial Applied Biosystems México en un equipo de PCR en tiempo-real (7900HT Fast Real-Time PCR system) de acuerdo a las instrucciones de Applied Biosystems, Foster City, USA. **(Anexo IX).**

E) Análisis Estadístico.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los genes en estudio se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de Chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron por la prueba de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO. La prueba Exacta de Fisher se utilizó cuando algún número en la tabla de contingencia fue menor de 5. El valor de $P \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. La p corregida se calculó por medio del método de Bonferroni. El riesgo relativo con 95% de intervalo de confiabilidad se estimó como la razón de momios (RM) por el método de Woolf ²¹⁷.

Así mismo, para construir y analizar los haplotipos se utilizó el programa Haploview 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

VI. RESULTADOS

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos genéticos de los genes de las citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, INF- γ , TGF- β e IL-10 en los pacientes con síndrome isquémico coronario agudo e individuos control se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes de IL-1 (*IL-1B-511T>C*, *IL-1F10.3T>C*) y del antagonista del receptor de IL-1 (*IL-1RN.4T>C*, *IL-1RN.6/1C>T*, *IL-1RN.6/2C>G*, y *IL-1RN VNTR*), en el grupo de pacientes e individuos control se muestran en las Tablas 2 y 3. La distribución de los polimorfismos del gen IL-1 (*IL-1-511T>C* e *IL-1F10.3T>C*) es muy similar entre pacientes y controles. Sin embargo, al analizar los polimorfismos del antagonista del receptor, se observan importantes diferencias significativas entre los grupos en estudio. El sitio polimorfo IL-1RN.4T>C muestra un incremento del alelo "T" y del genotipo "TT" en pacientes con SICA (pC=0.002, RM=1.53 e IC95%=1.17-2.01 y pC=0.002, RM=1.79 e IC95%=1.26-2.56, respectivamente). El análisis del polimorfismo IL-1RN6/1C>T muestra un incremento del alelo "C" y genotipo "TC" en pacientes cuando se compara con los individuos control (pC=0.002, RM=1.65 e IC95%=1.19-2.29 y pC=0.00024, RM=2.22 e IC95%=1.46-3.39, respectivamente). Además, el análisis del sitio IL-1RN6/2C>G muestra un incremento del alelo "C" y genotipo "CC" en pacientes cuando se compara con los individuos control (pC=10⁻

⁶, RM=1.99 e IC95%=1.51-2.64 y $pC=10^{-6}$, RM=2.21 e IC95%=1.34-3.16, respectivamente). El análisis del polimorfismo IL-1 RN VNTR muestra un incremento del alelo "1" y del genotipo "1,1" en pacientes cuando se compara con los controles ($p=0.003$, RM=1.47 e IC95%=1.13-1.91 y $p=0.001$, RM=1.74 e IC95%=1.22-2.48, respectivamente). Por otro lado, se analizó el desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del antagonista del receptor de IL-1 que se muestra en la Tabla 4. El análisis mostró cuatro de diez posibles combinaciones haplotípicas (*T1TC*, *T1TG*, *C2TG* y *T2TG*) con importantes diferencias significativas entre los grupos de estudio. Los pacientes muestran incremento en la frecuencia de haplotipo "T1TC" cuando se compara con el grupo control ($pC=8 \times 10^{-5}$, RM=1.69 e IC95%=1.30-2.19). Además, el análisis de los otros tres haplotipos (*T1TG*, *C2TG* y *T2TG*) mostraron un disminución en la frecuencia haplotípica en los pacientes con síndrome isquémico coronario agudo cuando se comparan con los individuos control ($pC=10^{-7}$, RM=0.22, CI95%=0.12-0.039, $pC=6 \times 10^{-7}$, RM=0.018, CI95%=0.08-0.39 y $pC=0.001$, RM=0.021, CI95%=0.07-0.61, respectivamente), así como la evidencia de desequilibrio de ligamiento con una $D'=0.58$ y $D'=0.68$, entre los sitios polimórficos IL-1RN.4 con IL-1 RN VNTR e IL-1RN.4 con IL-1RN6/2, respectivamente. Por otro lado, también se observó desequilibrio de ligamiento entre los sitios polimórficos IL-1RN VNTR y IL-1RN6/2 con una $D'=0.67$.

Tabla 2. Frecuencia (%) alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos del gen IL-1 (IL-1 -511T>C e IL-1B F10.3T>C) en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo (SICA) e individuos control.

	SICA (n=300)		Controles (n=248)		pC	RM	IC95%
IL-1B-511							
Alelo	n	fa	n	fa			
T	386	0.643	348	0.701			
C	214	0.356	148	0.298	NS	-----	-----
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	127	0.423	131	0.528			
TC	132	0.44	86	0.346	NS	-----	-----
CC	41	0.136	31	0.125			
IL-1F10.3							
Alelo	n	fa	n	fa			
T	475	0.791	395	0.796			
C	125	0.208	101	0.203	NS	-----	-----
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	189	0.63	158	0.637			
TC	97	0.323	79	0.318	NS	-----	-----
CC	14	0.046	11	0.044			

Abreviaturas: NS: no significativa. fa: frecuencia alélica. fg: frecuencia génica. IC95%: Intervalos de confianza al 95%.

*Nota: El análisis de los sitios polimórficos de IL-1B y antagonista del receptor de IL-1 se realizó en 300 pacientes, que eran los que hasta el momento se tenían contemplados para el proyecto de investigación.

Tabla 3. Frecuencia (%) alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos genéticos del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RN4T>C, IL-1RN6/1C>T, IL-1RN6/2C>G e IL-1RN-VNTR) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=300)		Controles (n=248)		pC	RM	IC95%
IL-1RN4T>C							
Alelo	n	fa	n	fa			
T	472	0.786 ^a	335	0.675	0.002	1.53	1.17-2.01
C	148	0.246	161	0.324			
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	180	0.600 ^b	113	0.455	0.002	1.79	1.26-2.56
TC	92	0.306	109	0.439			
CC	28	0.093	26	0.104			
IL-1RN6/1C>T							
Alelo	n	fa	n	fa			
T	467	0.778	423	0.852			
C	133	0.221 ^c	73	0.147	0.002	1.65	1.19-2.29
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	184	0.613	189	0.762			
TC	99	0.33 ^d	45	0.181	0.00024	2.22	1.46-3.39
CC	17	0.056	14	0.056			
IL-1RN6/2C>G							
Alelo	n	fa	n	fa			
G	127	0.211	173	0.348			
C	473	0.788 ^e	323	0.651	10 ⁻⁶	1.99	1.51-2.64
Genotipo	n	fg	n	fg			
GG	16	0.053	33	0.133			
GC	95	0.316	107	0.431			
CC	189	0.63 ^f	108	0.435	10 ⁻⁶	2.21	1.34-3.16

Abreviaturas: pC: valor de p corregido. RM: Razón de momios. fa: frecuencia alélica. fg: frecuencia génica. IC95%: Intervalos de confianza al 95%.

a y b) Se observa un incremento del alelo "T" y genotipo "TT" en pacientes cuando se compara con los controles a pC<0.05

c y d) Se observa un incremento del alelo "C" y genotipo "TC" en pacientes cuando se copara con los controles a pC<0.05

e y f) se observa un incremento del alelo "C" y genotipo "CC" en pacientes cuando se copara con los controles a pC<0.05

Table 3. Continuation.

	SICA (n=300)		Controless (n=248)		p	RM	95%CI
Alelo	n	fa	n	fa			
1	428	0.713 ^a	312	0.629	0.003	1.47	1.13-1.91
2	156	0.26 ^b	173	0.348	10 ⁻⁴	0.47	0.32-0.68
3	7	0.011	6	0.012			
4	6	0.01	5	0.010			
5	3	0.005	0	0.000			
Genótipo	n	fg	n	fa			
1, 1	167	0.556 ^c	104	0.419	0.001	1.74	1.22-2.48
2, 2	33	0.11	38	0.153			
1, 2	87	0.29 ^d	96	0.387	0.01	0.65	0.45-0.94
1, 4	4	0.013	2	0.008			
1, 3	1	0.003	6	0.024			
4, 4	1	0.003	1	0.004			
1, 5	2	0.006	0	0.000			
4, 2	0	0.000	1	0.004			
2, 3	2	0.006	0	0.000			
2, 5	1	0.003	0	0.000			
3, 3	2	0.006	0	0.000			

a y c) Se observa un incremento del alelo " 1" y genotipo "1,1" en pacientes con SICA vs controles a p<0.05

b) Se observa un incremento del alelo "2" en pacientes con SICA vs controles a p<0.05

d) Se observa un incremento del genotipo "1,2" en pacientes con SICA vs controles a p<0.05

Tabla 4. Frecuencia (%) de los haplotipos del antagonista del receptor *IL-1* (*IL-1RN* VNTR, *IL-1RN.4T>C*, *IL-1RN 6/1C>T* e *IL-1RN 6/2C>G*) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=287)	Controles (n=238)	p	RM	IC95%
Haplotipo	fH	fH			
<i>T1TC</i>	0.444 ^a	0.321	8×10^{-5}	1.69	1.30-2.19
<i>T1TG</i>	0.028	0.118 ^b	10^{-7}	0.22	0.12-0.39
<i>C2TG</i>	0.015	0.083 ^c	6×10^{-7}	0.018	0.08-0.39
<i>T2TG</i>	0.009	0.040 ^d	0.001	0.021	0.07-0.61

Nota: *La tabla solo muestra los haplotipos con asociación significativa. El orden de los polimorfismos en los haplotipos es de acuerdo a la posición en el cromosoma (rs419598, rs2234663, rs315952 y rs315951). Abreviaturas: fH. Frecuencia del haplotipo. SICA: Síndrome isquémico Coronario Agudo. RM: Razón de momios. IC: Intervalo de confianza.

- a) Se observa un incremento del haplotipo "T1TC" en pacientes vs controles a $p < 0.05$.
- b) Se observa una disminución del haplotipo "T1TG" en pacientes vs controles a $p < 0.05$.
- c) Se observa una disminución del haplotipo "C2TG" en pacientes vs controles a $p < 0.05$.
- d) Se observa una disminución del haplotipo "T2TG" en pacientes vs controles a $p < 0.05$.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos en la región promotora del gen TNF- α (TNF- α -238A>G y TNF- α -308T2>T1) son muy similares en pacientes con SICA e individuos controles (Tabla 5). El análisis del desequilibrio de ligamiento de estos polimorfismos no mostró resultado significativo.

Tabla 5. Frecuencia alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos TNF- α -238 A>G y TNF- α -308 T1>T2 en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo (SICA) e individuos control.

	SICA		Controles		p	RM	IC 95%
TNF -238	(n=301)		(n=248)				
Alelos	n	fa	n	fa			
A	25	0.041	19	0.038			
G	577	0.958	477	0.961	NS	-----	-----
Genotipos	n	fg	n	fg			
AA	1	0.003	0	0.0			
AG	23	0.076	19	0.076			
GG	277	0.920	229	0.923	NS	-----	-----
TNF -308	(n=301)		(n=248)				
Alelos	n	fa	n	fa			
T2	55	0.091	36	0.072			
T1	549	0.911	460	0.927	NS	-----	-----
Genotipos	n	fg	n	fg			
T2T2	5	0.016	2	0.008			
T1T2	45	0.149	32	0.129			
T1T1	252	0.837	214	0.862	NS	-----	-----

Abreviaturas: NS: no significativa. fa: frecuencia alélica. fg: frecuencia génica. IC95%: Intervalos de confianza al 95%.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes de INF- γ e IL-6 en pacientes e individuos control se muestran en la Tabla 6. La distribución de los polimorfismos del INF- γ (INF- γ -155 G>A e INF- γ -179 T>G) fue muy similar en pacientes y controles.

Sin embargo, el análisis del sitio polimórfico IL-6-572 C>G en la región promotora del gen de la IL-6 muestra importantes diferencias entre los grupos de estudio. Pacientes con SICA presentaron incremento en el genotipo "CG" ($pC=0.03$, $RM=1.53$, con $IC95\%=1.08-2.16$) y disminución significativa de la frecuencia del genotipo "CC" ($pC=0.015$, $RM=0.47$, con $IC95\%=0.27-0.84$) cuando se compararon con los individuos control.

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos de los genes del INF- γ e IL-6 muestra fuerte evidencia de desequilibrio de ligamiento con una $D'=0.89$ entre los sitios polimórficos IL-6-572 e IL-6-1426 y $D'=1$ entre los sitios INF- γ -155 e INF- γ -179. Sin embargo, la distribución de estos haplotipos fue similar en pacientes y controles. (Tabla 7)

Tabla 6. Frecuencia (%) alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos genéticos de los genes IL-6 e INF- γ en pacientes con SICA e individuos control.

		SICA		Controles		pC	RM	IC95%
INF- γ -155		(n=336)		(n=248)				
Alelo	n	fa	n	fa				
A	672	1.0	493	0.993	NS	-----	-----	
G	0	0.0	3	0.006	NS	-----	-----	
Genotipo	n	fg	n	fg				
AA	336	1.0	245	0.987	NS	-----	-----	
AG	0	0.0	3	0.012	NS	-----	-----	
GG	0	0.0	0	0.0	NS	-----	-----	
INF- γ -179		(n=336)		(n=248)				
Alelo	n	fa	n	fa				
G	672	1.0	494	0.995	NS	-----	-----	
T	0	0.0	2	0.004	NS	-----	-----	
Genotipo	n	fg	n	fg				
GG	336	1.0	246	0.991	NS	-----	-----	
GT	0	0.0	2	0.008	NS	-----	-----	
TT	0	0.0	0	0.0	NS	-----	-----	
IL-6 -572		(n=336)		(n=248)				
Alelo	n	fa	n	fa				
G	447	0.665	321	0.647	NS	-----	-----	
C	225	0.334	175	0.352	NS	-----	-----	
Genotipo	n	fg	n	fg				
CC	25	0.074 ^a	36	0.145	0.015	0.47	0.27-0.84	
GC	175	0.52 ^b	103	0.415	0.033	1.53	1.08-2.16	
GG	136	0.404	109	0.439				
IL-6 -1426		(n=336)		(n=248)				
Alelo	n	fa	n	fa				
G	654	0.973	487	0.981	NS	-----	-----	
T	18	0.026	9	0.018	NS	-----	-----	
Genotipo	n	fg	n	fg				
GG	318	0.946	239	0.963	NS	-----	-----	
GT	18	0.053	9	0.036	NS	-----	-----	
TT	0	0.0	0	0.0	NS	-----	-----	

Abreviaturas: RM=Razon de momios; NS= no significativo; pC= P corregida.

- Se observa una disminución del genotipo "CC" en pacientes vs controles a $p < 0.05$
- Se observa un incremento del genotipo "GC" en pacientes vs controles a $p < 0.05$

*Nota: el análisis de estos polimorfismos se hace en 336 pacientes que hasta el momento se tenían ya recopilados. Esto con la finalidad de aumentar el número de muestra.

Tabla 7. Frecuencia (%) de los haplotipos del gen IL-6 (IL-6-572G>C e IL-6 -1426T>G) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=336)	Controles (n=248)	p
Haplotipo	fH	fH	
GG	0.641	0.630	NS
GC	0.330	0.352	NS
TG	0.026	0.017	NS

Abreviaturas: fH. Frecuencia del haplotipo. SICA: Síndrome isquémico Coronario Agudo. NS: No significativo

El análisis de los polimorfismos del gen de la IL-10 (IL-10-592 A>C, IL-10-819 T>C e IL-10-1082 A>G) se muestran en la Tabla 8. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de estos sitios polimórficos fue muy similar en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo e individuos control, no encontrando nada significativo al analizarlos por separado.

El análisis del desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen IL-10 se muestra en la Tabla 9. Dicho análisis muestra una de seis combinaciones haplotípicas (ACA) con una importante diferencia significativa entre pacientes con SICA e individuos control. El haplotipo "ACA" muestra un incremento en la frecuencia haplotípica en pacientes con SICA cuando se compara con los controles ($pC=2 \times 10^{-4}$, RM=1.66 e IC95%=1.46-1.88).

Además, se encontró fuerte evidencia de desequilibrio de ligamiento entre los sitios polimórficos IL-10-592 e IL-10-819 ($D'=0.85$) e IL-10-592 con IL-10-1082 ($D'=0.92$), así como IL-10-819 con IL-10-1082 con una $D'=0.85$.

Tabla 8. Frecuencia (%) alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos genéticos del gen de IL-10 (IL-10-592C>A, IL-10-819C>T e IL10-1082 A>G) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=301)		Controles (n=248)		pC	RM	IC95%
IL-10-592							
Alelo	n	fa	n	fa			
A	241	0.400	195	0.393			
C	361	0.599	301	0.606			
Genotipo	n	fg	n	fg	NS	-----	-----
AA	50	0.166	41	0.165			
AC	141	0.468	113	0.455			
CC	110	0.365	94	0.379			
IL-10-819							
Alelo	n	fa	n	fa			
C	372	0.617	289	0.582			
T	230	0.382	207	0.417			
Genotipo	n	fg	n	fg	NS	-----	-----
CC	118	0.392	85	0.342			
CT	136	0.452	119	0.479			
TT	47	0.156	44	0.177			
IL-10-1082							
Allele	n	fa	n	fa			
A	441	0.732	356	0.717			
G	161	0.267	140	0.282			
Genotype	n	fg	n	fg	NS	-----	-----
AA	167	0.554	125	0.504			
AG	107	0.355	106	0.427			
GG	27	0.089	17	0.068			

Abreviaturas: RM= Razon de momios; NS= no significativo; pC= P corregida.

Tabla 9. Frecuencia (%) de los haplotipos del gen IL-10 (IL-10-592C>A, IL-10-819C>T e IL10-1082 A>G) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=300)	Controles (n=248)	p	RM	IC955
Haplotipo	fH	fH			
ATA	0.641	0.630	NS		
CCA	0.330	0.352	NS		
CCG	0.243	0.269	NS		
ACA	0.054 ^a	0.007	2X10 ⁻⁴	1.66	1.48-1.88
CTA	0.024	0.024	NS		
CTG	0.013	0.010	NS		

Abreviaturas: fH. Frecuencia del haplotipo. SICA: Síndrome isquémico Coronario Agudo. P: valor de $p < 0.05$. RM: Razón de momios. IC: intervalo de confianza. NS: No significativo

a) Se observa un incremento del haplotipo "ACA" en pacientes al compararse con el grupo control a $p < 0.05$.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen TGF- β 1 en las posiciones -509 T>C (región promotora) y T29C (transición en el nucleótido 29 en la región codificadora de la secuencia señal) en pacientes e individuos control se muestran en la Tabla 10. El análisis del sitio polimórfico TGF- β 1 -509 T>C muestra un incremento en la frecuencia del alelo "T" ($pC=0.04$, $RM=1.23$, $IC95\%=1.02-1.50$) en pacientes cuando se compara con los individuos control. Además, se observa un decremento del alelo "C" y genotipo "CC" en los pacientes al comparar con los controles ($pC=0.04$, $RM=0.81$, $IC95\%=0.67-0.98$ y $pC=0.01$, $RM=0.67$, $IC95\%=0.50-0.90$, respectivamente).

El análisis del polimorfismo T29C muestra incremento en las frecuencias del alelo "T" ($pC=10^{-7}$, $RM=1.79$, $IC95\%=1.47-2.14$) y del genotipo "TT" ($pC=10^{-7}$, $RM=3.27$, $IC95\%=2.19-4.90$) en pacientes cuando se compara con los controles. Además se observó un significativo decremento en la frecuencia del alelo "C" y del genotipo "CC" ($pC=10^{-7}$, $RM=0.56$, $IC95\%=0.46-0.68$ y $pC=2 \times 10^{-4}$, $RM=0.59$, $IC95\%=0.44-0.79$, respectivamente) en pacientes cuando se compara con los individuos control.

El análisis de desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos genéticos del TGF- β 1, mostró tres de cuatro combinaciones haplotípicas (*TC*, *CC* y *TT*) con importantes diferencias significativas entre los grupos de estudio (Tabla 11). Los pacientes muestran incremento en la frecuencia de los haplotipos (*TC* y *TT*) cuando se compara con los controles ($pC=0.009$, $RM=1.30$ e $IC95\%=1.06-1.59$ y $pC=4 \times 10^{-12}$, $RM=5.66$ e $IC95\%=2.99-8.66$, respectivamente). Por otro lado, la frecuencia del haplotipo *CC* se encontró disminuida en los pacientes cuando se comparó con los controles ($pC=6 \times 10^{-9}$, $RM=0.50$, e $IC95\%=0.39-0.63$).

Tabla 10. Frecuencia (%) alélica (fa) y genotípica (fg) de los polimorfismos genéticos del gen *TGF-β1* (*TGF-β1* -509T>C y *TGF-β1* T29C) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA		Controles		pC	RM	95%IC
TGF-B1-509	(n=449)		(n=426)				
Alelo	n	fa	n	fa			
C	473	0.526 ^a	493	0.578	0.04	0.81	0.67-0.98
T	425	0.473 ^b	359	0.421	0.04	1.23	1.02-1.50
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	101	0.224	89	0.208			
TC	223	0.496	181	0.424			
CC	125	0.278 ^c	156	0.347	0.01	0.67	0.50-0.90
TGF-B1T29C	(n=449)		(n=426)				
Alelo	n	fa	n	fa			
C	464	0.516 ^d	560	0.657	10 ⁻⁷	0.56	0.46-0.68
T	434	0.483 ^e	292	0.342	10 ⁻⁷	1.79	1.47-2.19
Genotipo	n	fg	n	fg			
TT	116	0.258 ^f	41	0.096	10 ⁻⁷	3.27	2.19-4.90
TC	202	0.449	210	0.492			
CC	131	0.291 ^g	175	0.410	2x10 ⁻⁷	0.59	0.44-0.79

Abreviaturas: SICA= síndrome isquémico coronario agudo; RM=Razon de momios; pC= P corregida.

a y c) Se observa una disminución del alelo "C" y genotipo "CC" en pacientes cuando se compara con el grupo control a p<0.05.

b) Se observa un incremento del alelo "T" en pacientes cuando se compara con el grupo control a p<0.05.

d y g) Se observa una disminución del alelo "C" y genotipo "CC" en pacientes cuando se compara con los controles a p<0.05.

e y f) Se observa un incremento en el alelo "T" y genotipo "TT" en pacientes cuando se compara con los controles a p<0.05

*Nota: Este análisis se realizo en 449 pacientes, así como en 426 controles que se recopilaron en el último año del programa de Doctorado.

Tabla 11. Frecuencia (%) de los haplotipos del gen *TGF-β1* (*TGF-β1*-509T>C y *TGF-β1* T29C) en pacientes con SICA e individuos control.

	SICA (n=449)	Controles (n=426)	p	RM	IC95%
Haplotipo	fH	fH			
<i>CT</i>	0.369	0.399	NS	-----	-----
<i>TC</i>	0.379 ^a	0.320	0.009	1.30	1.06-1.59
<i>CC</i>	0.147 ^b	0.259	6x10 ⁻⁹	0.050	0.39-0.63
<i>TT</i>	0.104 ^c	0.023	4X10 ⁻¹²	5.66	2.99-8.66

El orden de los haplotipos es de acuerdo a la posición en el cromosoma (rs1982073, también nombrado como [rs1800470](#) y rs1800469).

Abreviaturas: fH. Frecuencia del haplotipo; SICA: síndrome isquémico coronario agudo; RM: Razón de momios; IC: intervalo de confianza; NS: no significativo.

a y c) Se observa un incremento en los haplotipos "TC" y "TT" en pacientes al compararse con los controles a p<0.05.

b) Se observa una disminución del haplotipo "CC" en pacientes al compararse con los controles a p<0.05.

VII. DISCUSION Y CONCLUSION

Cada vez se acepta más la teoría de que los mediadores pro- y anti-inflamatorios producidos por la activación de células del sistema inmune, células endoteliales y células de músculo liso vascular son importantes en el desarrollo de la aterosclerosis y la progresión al síndrome isquémico coronario agudo^{218-221,201}. Varios polimorfismos localizados en genes que codifican para las moléculas pro- y anti-inflamatorias se tienen asociados con el riesgo a desarrollar algún evento cardiovascular. Las citocinas IL-1, TNF- α , IL-6, INF- γ , TGF- β e IL-10 son importantes en el mecanismo inmunoinflamatorio y tienen una importante influencia en la respuesta inflamatoria^{222,223}. En el presente trabajo se estudiaron 17 polimorfismos localizados en los genes que codifican para estas citocinas en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo.

La IL-1 es una de las primeras citocinas pro-inflamatorias en producirse durante el proceso aterogénico. Esta citocina presenta dos formas biológicamente activas, la IL-1 α y la IL-1 β .¹¹³ En humanos, la IL-1 β se encuentra predominantemente en circulación y la IL-1 α es un regulador de eventos intracelulares y mediador de inflamación local.^{113,114} Seis polimorfismos localizados en los genes que codifican para el antagonista del receptor de IL-1 e IL-1 se estudiaron en los pacientes con SICA: Cuatro sitios polimórficos (*IL-1RN.4T>C*, *IL-1RN.6/1C>T*, *IL-1RN.6/2C>G*, y *IL-1RN VNTR*) localizados en el

antagonista del receptor. Dos sitios más, uno localizado en la región promotora IL1 -511 T>C y otro de la familia 10.3 (IL-1F10.3) de los homólogos de IL-1.

La distribución de los sitios polimórficos IL1 -511 T>C e IL-1F10.3 fue muy similar en pacientes y controles. Sin embargo, interesantemente los cuatro sitios del antagonista del receptor de IL-1 (*IL-1RN.4T>C*, *IL-1RN.6/1C>T*, *IL-1RN.6/2C>G*, y *IL-1RN VNTR*) fueron asociados con el riesgo de desarrollar SICA, en especial el sitio RN.6/2C>G que presentó elevado riesgo de desarrollar síndrome isquémico coronario agudo (RM=1.99 para el alelo C y RM=2.21 para el genotipo CC). Minkelen²²⁴ y colaboradores estudiaron 5 polimorfismos del antagonista del receptor y reportaron la asociación de un haplotipo nombrado *H3*, con riesgo de desarrollar infarto agudo del miocardio. Los autores sugieren que éste podría explicar la reducción de la expresión del antagonista del receptor en los individuos que presentan el haplotipo *H3*.²²⁴ Este haplotipo incluye dos polimorfismos que se estudiaron en nuestros pacientes (*RN.4T>C*, y *RN.6/1C>T*). Cuando nosotros hicimos el análisis de los polimorfismos estudiados en nuestro trabajo, también encontramos un haplotipo (T1TC) que se asoció con el riesgo a desarrollar síndrome isquémico coronario agudo.

El haplotipo encontrado en nuestro estudio incluye los polimorfismos *RN.4T>C*, y *RN.6/1C>T* asociados con infarto del miocardio en el trabajo de Minkelen²²⁴.

Sin embargo, en nuestro análisis de haplotipos estos dos polimorfismos no distinguen al haplotipo de riesgo (T1TC) de los haplotipos de protección (T1TG, C2TG y T2TG). Como se puede ver, la principal diferencia es la presencia del alelo C del *RN.6/2C>G* en el haplotipo de riesgo y la presencia del alelo G en los haplotipos de protección. Este polimorfismo es localizado en la región 3' UTR. La región 3' UTR se encuentra en el ARNm y contiene elementos reguladores que son esenciales para la expresión apropiada de muchos genes. Estos elementos reguladores están implicados en el control del transporte nuclear, la poliadenilación, la orientación subcelular, así como la tasa de traducción y degradación del ARN^{225,226}. Esto sugiere que el polimorfismo *RN.6/2C>G* podría estar relacionado con la expresión del ARNm. Sin embargo, no hay estudios funcionales de este polimorfismo en la literatura. Otra diferencia entre el haplotipo de riesgo y protección es la presencia del alelo 1 del VNTR en el intrón 2 en el haplotipo de riesgo, y la presencia del alelo 2 en dos haplotipos de protección. En este caso, el papel de este polimorfismo como marcador de susceptibilidad para enfermedad cardiovascular es muy controversial, ya que en los reportes internacionales se habla de resultados positivos y negativos.

Por ejemplo, Francis²²⁷ y colaboradores, reporta una asociación del alelo 2 con enfermedad coronaria de un solo vaso, pero no con enfermedad múltiple de vasos. Estos hallazgos no fueron confirmados en un estudio posterior que sugiriera que este marcador no está relacionado con riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular²²⁸. Tolusso²²⁹ y colaboradores reportan que en individuos sanos donadores de sangre homocigotos para el alelo 2 tiene una disminución de los niveles del antagonista del receptor en plasma comparado con los individuos que no presentan el alelo 2. Contrario a Hurme²³⁰ y colaboradores, quienes reportan que individuos con el alelo 2 tienen 1.2 veces más incremento de antagonista del receptor de IL-1 en plasma. Así mismo, otros estudios in vitro sugieren que el alelo 2 del antagonista del receptor de IL-1 del VNTR intrón 2 eleva su producción^{231,232}. Estos últimos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo en el cual los haplotipos (T2TG, C2TG) de protección presentan el alelo 2, esto es, los individuos con estos haplotipos producen más antagonista del receptor, disminuyendo el efecto pro-inflamatorio de la citocina IL-1. En resumen nuestros datos obtenidos sugieren que los polimorfismos genéticos del antagonista del receptor de IL-1 tiene un importante papel en el riesgo de desarrollar SICA, con alto riesgo para el polimorfismo IL-1RN6/2G>C. Por otro lado, en nuestro estudio fue posible distinguir un haplotipo de riesgo y 3 haplotipos de protección al desarrollo de SICA.

El TNF- α es una citocina pro-inflamatoria con múltiples actividades biológicas y con un potente efecto inotrópico negativo¹²⁰. Entre las funciones biológicas descritas para el TNF- α se encuentran la producción de citocinas, proteínas de fase aguda, aumento en la expresión de moléculas de adhesión, activación de neutrófilos y co-estimulador de activación de células T. Los resultados obtenidos del análisis de los polimorfismos del gen TNF- α (TNF- α -238 A>G y TNF- α -308T1>T2) no muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio. La asociación de estos sitios polimórficos es muy controversial en la bibliografía internacional debido a que se ha demostrado una asociación del alelo T2 del sitio -308 con el riesgo de algún evento cardiovascular, miocardiopatía dilatada idiopática^{194,196}. Por otro lado, estudios en otras poblaciones no encuentran asociación de este sitio con enfermedad arterial coronaria e infarto agudo del miocardio¹⁹⁷. Estos últimos resultados empatan con los obtenidos en nuestros grupos de estudio, que demuestran que los sitios polimórficos no se relacionan con la susceptibilidad a desarrollar síndrome isquémico coronario agudo.

Por otro lado, la IL-6 es producida por diversos tipos celulares como las células del endotelio, del músculo liso, los linfocitos y los macrófagos y uno de sus principales papeles es la regulación de la respuesta inmune humoral, afectando la producción de inmunoglobulinas por las células B, al regular la actividad citotóxica

de la célula T¹³⁴. Evidencias experimentales indican que esta molécula tiene un papel medular en muchas enfermedades crónicas inflamatorias y en el daño tisular¹³⁵. Estudios relacionados con los niveles de IL-6 en suero y en cultivo celular ha mostrado una asociación con el desarrollo y severidad de enfermedad coronaria, así como, con la inestabilidad de la placa aterosclerótica^{199,233}. El INF- γ es del tipo II. Estructuralmente no se relaciona con el tipo I y se une a un diferente receptor, y es codificado por un locus cromosomal diferente. En algún tiempo se creía que sólo los linfocitos CD4+, CD8+ y las NK producían INF- γ ¹⁶⁰⁻¹⁶³. Sin embargo, hay evidencia de muchas otras células producen INF- γ (células B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, entre otras)^{164,165}. Dentro de sus funciones está la de inhibir la producción de colágena²³⁴, así como un papel fundamental en la inestabilidad de la placa aterosclerótica. Heinisch y colaboradores²¹⁸ reporta niveles incrementados de esta citocina en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo comparado con sujetos control. En este trabajo nosotros estudiamos 2 sitios polimórficos localizados en el gen de la IL-6 y 2 localizados en el gen del INF- γ en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo. Los sitios polimórficos del INF- γ se localizan en la región promotora (-155 y -179): el -155 se localiza río arriba del promotor del gen, cercano al sitio de activación de células T, afectando la estabilidad de esta región elevando la producción de la proteína²³⁵. Bream y colaboradores reportan que el sitio -179 tiene un importante

efecto en la expresión del INF- γ en células T en respuesta a TNF- α ²⁰⁵. Sin embargo, el efecto de estos dos polimorfismos no fue observado en nuestro estudio en el cual se muestra una distribución similar de dichos polimorfismos en pacientes con síndrome isquémico coronario agudo e individuos control. Con respecto a los polimorfismos del gen de IL-6, nuestro estudio muestra similar distribución del polimorfismo -1426 G>T en pacientes y controles. Sin embargo, se observa una asociación negativa del polimorfismo -572G>C con el riesgo de desarrollar SICA. Individuos con SICA presentan una disminución en la frecuencia del genotipo -572 CC cuando se compara con los individuos control. Este polimorfismo que es idéntico al -634 G>C se asocia con la progresión de nefropatía diabética e incremento de los niveles de IL-6 en plasma después de un "bypass" coronario^{236,237}. En el estudio de Kitamura y colaboradores²³⁶, reportan que células mononucleares de individuos que presentan el alelo 634*G (-572 C) elevan la secreción de IL-6 que aquellos individuos que carecen del alelo G (C). Los resultados obtenidos por Kitamura son acordes con los obtenidos en nuestro estudio, sugiriendo que individuos con el genotipo -572 CC producen bajos niveles de IL-6, disminuyendo el efecto de esta citocina en el desarrollo de aterosclerosis y SICA. También, el efecto del polimorfismo -572 G>C se estudio en enfermedad coronaria y riesgos intermedios que incluyen fibrinogeno y presión arterial²⁰².

Los datos obtenidos sugieren que el polimorfismo IL-6 -572 G>C tiene un importante papel en el riesgo de desarrollar SICA en nuestra población. Por otro lado, el análisis del desequilibrio de ligamiento de ambos genes (INF- γ e IL-6) mostró que hubo haplotipos en desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, no se encontró ningún haplotipo asociado que pudiera conferir susceptibilidad a desarrollar síndrome isquémico coronario agudo en la población mexicana.

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina anti-inflamatoria que tiene varios efectos biológicos incluyendo la inhibición del TNF- α , de la IL-18 y de la metaloproteasa 9^{143,144}. Entre sus principales funciones biológicas están la limitación y el “apagado” final de la reacción inflamatoria de un huésped en respuesta a un patógeno¹⁴⁵. Su efecto sobre los macrófagos no está limitada solo a la regulación de citocinas, sino también a su papel en la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión, de antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase II, a la presentación de antígenos y activación de linfocitos¹⁴⁵. De hecho, en suero de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo se han encontrado niveles bajos de IL-10.¹⁴⁶

Estas evidencias experimentales sugieren que niveles reducidos de IL-10 en plasma pueden favorecer la inestabilidad de la placa y el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo. Los resultados del análisis de los polimorfismos del gen IL-10 (IL-10-592C>A, IL-10-819C>T e IL10-1082 A>G) muestran similar distribución en los grupos de estudio. Sin embargo, cuando se hace el análisis de

desequilibrio de ligamiento, se observa la presencia de un haplotipo compuesto por los alelos -592 A, -819 C y -1082 A (ACA) con elevado riesgo (RM=1.66, $p=2 \times 10^{-4}$) de desarrollar síndrome isquémico coronario agudo. Koch y colaboradores, estudiaron estos mismos polimorfismos y reportaron la asociación de un haplotipo compuesto por los alelos -592 A, -819 T y -1082 A nombrado "ATA", con el riesgo de desarrollar infarto agudo del miocardio y aterosclerosis¹⁹⁷. Los autores sugieren que esto podría explicarse por la reducción de la expresión de la citocina IL-10 en los individuos que presentan este haplotipo²³⁸⁻²⁴¹. Cuando nosotros hicimos el análisis de los haplotipos considerando los polimorfismos estudiados en nuestro trabajo, también encontramos un haplotipo "ACA" que se asocio con el riesgo a desarrollar síndrome isquémico coronario agudo. Sin embargo, en nuestro análisis de haplotipos, como se puede ver, la principal diferencia es la presencia del alelo C del polimorfismo IL-10-819C>T en el haplotipo de riesgo. Este polimorfismo es localizado en la región promotora la cual regula la transcripción y por tanto la producción de la proteína. El dato obtenido sugiere que el polimorfismo IL-10 -819 C>T podría estar relacionado con la baja expresión del ARNm de IL-10. Edwards-Smith y colaboradores, hacen un estudio funcional de haplotipos y reportan que el haplotipo compuesto por -1082 A, -819 C y -592 C "ACC" correlaciona con una intermedia-baja producción de IL-10.²⁴¹ Este resultado esta de acuerdo con nuestros resultados, ya que la diferencia la hace el alelo -819 C. Sin embargo, no hay

estudios funcionales para este polimorfismo que puedan definir si el alelo -819 C pudiera estar relacionado con una baja en la expresión de IL-10.

El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), es una proteína pleiotrópica que es secretada por muchos tipos celulares tales como los macrófagos, los linfocitos, las células de músculo liso y las plaquetas. Es secretado en forma inactiva pero es activado cuando es degradado proteolíticamente¹⁵³. Se ha descrito que el TGF- β tiene acción anti-inflamatoria¹⁴⁶. Ensayos *in vitro* sugieren que el TGF- β puede regular la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares en humanos, inducidas por citocinas pro-inflamatorias¹⁵⁴. En los últimos años, se ha propuesto que el TGF- β puede tener un papel protector en la aterogénesis a través de la inhibición de la migración y proliferación de células del músculo liso y macrófagos ejerciendo un efecto protector en la función endotelial^{155, 156}.

Nosotros estudiamos dos sitios polimorficos *TGF- β 1* -509T>C y *TGF- β 1* T29C localizados en el gen del *TGF- β 1* en pacientes con SICA. Interesantemente, los dos sitios polimorficos fueron asociados con el riesgo de desarrollar SICA, con alto riesgo para el alelo T y genotipo TT (OR=1.79 y RM=3.27, respectivamente) del sitio polimorfico *TGF- β 1* T29C, así como el alelo T (RM=1.23) del *TGF- β 1* -509T>C²⁴². En el humano, ambos polimorfismos están relacionados con una elevada expresión del gen. El alelo "T" de sitio polimorfico -509 en la región promotora altera la unión del factor de transcripción Ying-Yang (YYI),

intensificando la unión de YYI y la función del promotor, elevando la concentración de $TGF-\beta 1$.^{242,243} El alelo "C" del $TGF-\beta 1$ (T29C) que se encuentra en el exón 1, resulta en una substitución de un aminoácido en el codón 10 (Ile-Pro), que se relaciona con el incremento en la producción de $TGF-\beta 1$.²⁴⁴ Cambien y colaboradores, hacen un estudio analizando el polimorfismo $TGF-\beta 1$ T29C y reportan que no hay asociación con infarto agudo del miocardio en población europea²⁴⁵. También, Syrris y colaboradores, fallan en detectar una asociación del T29C en enfermedad arterial coronaria en población del Reino Unido²⁴⁶. En contraste con nuestros resultados, Cambien y Syrris no detectan una asociación del polimorfismo T29C con infarto agudo del miocardio y enfermedad arterial coronaria en población caucásica^{245,246}. Sin embargo, Yokota y colaboradores, reportan asociación del alelo T del polimorfismo T29C con el riesgo de desarrollar infarto agudo del miocardio²⁰⁸.

Este resultado concuerda con nuestras observaciones, sugiriendo que el polimorfismo $TGF-\beta 1$ T29C está relacionado con la susceptibilidad a desarrollar síndrome isquémico coronario agudo en la población Mexicana. Por otro lado, el análisis del polimorfismo $TGF-\beta 1$ -509T>C en nuestro trabajo muestra una clara asociación del alelo T con el riesgo de desarrollar SICA, en contraste con los resultados obtenidos por Mark y colaboradores, quienes reportan que el polimorfismo $TGF-\beta 1$ -509T>C no está relacionado con enfermedad arterial coronaria²⁴⁷. Los resultados obtenidos de nuestro estudio son

consistentes con otros estudios que relacionan otras enfermedades de tipo inflamatorio^{213,248,249}.

Crubo y colaboradores estudiaron tres polimorfismos del TGF- β 1 y reportaron la asociación de un haplotipo compuesto por los alelos *TGF- β 1 -800G*, *TGF- β 1 29T* y *TGF- β 1 -509C* nombrado *GTC*, con riesgo de desarrollar infarto agudo del miocardio. Los autores sugieren que esto podría ser explicado por la reducción en la expresión del TGF- β 1 en los individuos que presentan este haplotipo²⁵⁰. Este haplotipo incluye los dos polimorfismos que se estudiamos en nuestros pacientes (*TGF- β 1 -509T>C*, y *TGF- β 1 T29C*). Cuando nosotros hicimos el análisis de los haplotipos considerando los polimorfismos estudiados en nuestro trabajo, también encontramos un haplotipo (TT) con alto riesgo a desarrollar SICA (RM=5.66 y $p=2 \times 10^{-12}$). Además, de otro haplotipo (TC) que podría estar confiriendo una intermedia-baja susceptibilidad de desarrollar SICA (RM=1.30 y $p=0.009$).

Este último resultado coincide con el reportado por Crubo y col.²⁵⁰. Sin embargo, en nuestro análisis de haplotipos uno de los polimorfismos si distingue los haplotipos de riesgo (TC y TT) de los de protección (CC, CT). Como se puede ver, la principal diferencia es la presencia del alelo T del *TGF- β 1 T29C* en el haplotipo de riesgo y la presencia del alelo C en los haplotipos de protección. Esto sugiere que el polimorfismo *TGF- β 1 T29C* podría estar relacionado con la baja expresión del RNAm del gen del *TGF- β 1*. Además, los resultados

obtenidos en este trabajo coinciden con los estudios funcionales de estos polimorfismos en la literatura.

En conclusión, nuestros datos sugieren que los polimorfismos de los genes TNF- α e INF- γ no se asocian con el desarrollo de SICA. Sin embargo, el análisis de los sitios polimorficos del antagonista del receptor de IL-1, de la IL-10, del TGF- β y de la IL-6 -572G>C, muestran una clara asociación de dichos polimorfismos con la susceptibilidad al desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo en la población mexicana. Estudios adicionales en otras poblaciones podrían ayudar a definir bien el verdadero papel de estos marcadores como factores de riesgo para el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo y la enfermedad arterial coronaria.

VIII. REFERENCIAS

1. Página electrónica de la Secretaría de Salud de México
2. Zouridakis E, Avanzas P, Arroyo–Espliguero R, Fredericks S, Kaski JC. Markers of Inflammation and Rapid Coronary Artery Disease Progression in Patients with Stable Angina Pectoris. *Circulation*. 2007; 110: 1747-1753
3. Suraj A. Achar, Suriti K, William A. Norcroos. Diagnosis of Acute Coronary Syndromes. *Am Fam Physician*. 2005; 72:119-126.
4. Fuster V, Badimon L, Badimo JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318.
5. Fuster V, Fayad ZA, Badomin JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999; 353 Suppl 2: S115-119.
6. Ross R, Atherosclerosis-an inflammatory disease *N Engl J Med* 1999; 340: 115- 126.
7. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes *Circulation* 2001; 104: 365-372.
8. Patrick WS, Kutryk Michael JB, Ong Andrew TL. Coronary Artery Stents. *N Engl J Med*. 2006;354:483-495
9. Schillinger M, Minar E. Restenosis after percutaneous angioplasty: the role of vascular inflammation. *Vascular Health Risk Management*. 2005;1:73-78
10. Bruschke AV, Kramer JR, Jr., Bal ET, Haque IU, Detrano RC, Goormastic M. The dynamics of progression of coronary atherosclerosis studied in 168 medically treated patients who underwent coronary arteriography three times. *Am Heart J*. 1989;117:296-305
11. Flugeman MY, Virmani R, Correa R, Yu ZX, Farb A, Leon MB et al. Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. A clue to the mechanism of

- transformation from the stable to the unstable clinical state. *Circulation* 1993;88:2493-24500
12. Davise MJ, Bland JM, Hangartner JR, Angelini A, Thomas AC. Factors influencing the presence or absence of acute coronary thrombi in sudden ischaemic death. *Eur. Heart J.* 1989;10:203-208
 13. Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation.* 1988;77:1213-1220
 14. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2054-2061
 15. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 2000;83:2462-2478.
 16. Braunwald E. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation.* 1998;98:2219-2222
 17. Nagel T, Resnick N, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994;94:885-891
 18. Resnick N Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr. Gimbrone MA, Jr. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90: 7908
 19. Lin MC, Amus-Jacobs F, Chen HH, Parry GC, Mackman N, Shyy JY et al. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest.* 1997;99:737-744
 20. Springer T, Cybulsky M. Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation and atherosclerosis, In: Fuster V, Ross R, Topol E,

- editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Pippincott-Raven. 1996. p.511-538
21. Hajjar DP, Haberland ME. Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan Horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem.* 1997; 272:22975-22978
 22. Stopeck AT, Nicholson AC, Mancini FP, Hajjar DP. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1993;268:17489-17494
 23. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem.* 1997;272:21654-21659
 24. Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997;96:3264-3265
 25. Chobanian A, Dzau V. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol E, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Pippincott-Raven; 1996. p. 237-242
 26. Assoian RK, Grotendorts GR, Miller DM, Sporn MB. Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature.* 1984;309:804-806
 27. Bombeli T, Schwartz BR, Harlam JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha-beta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med.* 1998;187:329-339
 28. Libby P, Ross R. Cytoquines an growth regulatory molecules, In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Pippincott-Raven. 1996. p. 539-555
 29. Raines E, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 511-538

30. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction : insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994;90:2126-2146
31. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler. Throm Vasc Biol*. 1997;17:1859-1867
32. OECD Health Data 2000. Texts, statistical databases, tables, graphics, health system diagrams. Paris:OECD Publications Service, 2000.
33. Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eighth regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349:1269-1276.
34. Murray CJ, Lopes Ad. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349:1498-1504.
35. Saez T, Suarez C, Blanco F, Gabriel R. Epidemiology of cardiovascular disease in the Spanish elderly population. *Rev Esp Cardiol*. 1998;51:864-873.
36. Uemura K, Pisa Z. Trends in cardiovascular disease mortality in industrialized countries since 1950. *World Health Stst Q* 1988;41:155-178.
37. Kannel WB, Prevalence, incidence and mortality of coronary artery disease, In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, editors. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 15-26
38. Pagina electronica Del Instituto Nacional de Estadistica Geografia e Informatica (INEGI). www.inegi.gob.mx
39. Marrugat J, Elosua R, Marti H. Epidemiology of schemic hearth disease in Spain: estimation of the number of cases and trends from 1997 to 2005. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55.337-346
40. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695
41. Steimberg D. Oxidative modifications of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997;95:1062-1071

42. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction. Insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994;90:2126-2146
43. Hansson G, Libby P. The role of lymphocytes. In: Fuster V, Ross R, Topol E eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia. Lippincott-Raven 1996:557-568
44. Stroes E, Rabelink T. Hyperlipidemia and endothelial function. In: Born GVR, Schwartz CJ eds. *Vascular endothelium: Physiology, pathology and therapeutics opportunities*. Stuttgart/New York. Schattauer. 1997:311-328
45. Harrison D. endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 1997;20(suppl II):II-11-II-17
46. Cerlemajer D. Endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:325-333
47. Wever R, Lusher T, Cosentino T, Rabelink T. Atherosclerosis and 2 faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 1998;97:108-112
48. Yoshida A, Kowaki M, Matsutani Y, Fukuchi Y, Naito M. Usefulness of serum total Cholesterol/triglyceride ratio for predicting the presence of small, dense LDL. *J Atheroscler Thromb*. 2004;11:215- 219
49. Choi BG, Vilahur G, Vilez-Gonzalez JF, Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mount Sin J of Med*. 2006;73:690-701
50. Maged FK, Williams DW, Ira JG. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2211-2218
51. Hultgardh-Nissson A, Durbeej M. Role of the extracellular matrix and its receptors in smooth muscle cell function: implications in vascular development and disease. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:540-545
52. Page IH. Atherosclerosis; and introduction. *Circulation*. 1954;10:1-27
53. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977;86:675-684
54. Iozzo RV. Perlecan: a gem of a proteoglycan. *Matrix Biol*. 1994;14:203-208

55. Kunjathoor VV, Chiu DS, O' Brien KD, LeBoeuf RC. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:462-468
56. Schonherr E, Jarvelainen HT, Kinsella MG, Sandell LJ, Wight TN. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1026 –1036.
57. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet derived growth factor and transforming growth factor- β 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial. smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1991;266:17640 –17647.
58. Jarvelainen HT, Kinsella MG, Wight TN, Sandell LJ. Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, PG-I/biglycan and PG-II/decorin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *J Biol Chem.* 1991;266:23274 –23281.
59. Little PJ, Tannock L, Olin KL, Chait A, Wight TN. Proteoglycans synthesized by arterial smooth muscle cells in the presence of transforming growth factor- β 1 exhibit increased binding to LDLs. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol.* 2002;22:55– 60.
60. Chang MY, Tsoi C, Wight TN, Chait A. Lysophosphatidylcholine Regulates Synthesis of Biglycan and the Proteoglycan Form of Macrophage Colony Stimulating Factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:809–815.
61. Jimi S, Sakata N, Matunaga A, Takebayashi S. Low density lipoproteins bind more to type I and III collagens by negative charge-dependent mechanisms than to type IV and V collagens. *Atherosclerosis.* 1994;107:109–116.
62. Chang PY, Luo S, Jiang T, Lee YT, Lu SC, Henry PD, Chen CH. Oxidized low-density lipoprotein downregulates endothelial basic fibroblast growth factor through a pertussis toxin-sensitive G-protein pathway: mediator role of platelet-activating factor-like phospholipids. *Circulation.* 2001;104:588–593.

63. Fukuchi M, Watanabe J, Kumagai K, Baba S, Shinozaki T, Miura M et al. Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries. *Lab Invest.* 2002;82:1437–1447.
64. Kovanen PT, Pentikainen MO. Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 1999;9:86 –91.
65. Boren J, Lee I, Zhu W, Arnold K, Taylor S, Innerarity TL. Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *J Clin Invest.* 1998;101:1084 –1093.
66. Veniant MM, Pierotti V, Newland D, Cham CM, Sanan DA, Walzem RL et al. Susceptibility to Atherosclerosis in Mice Expressing Exclusively Apolipoprotein B48 or Apolipoprotein B100. *J Clin Invest.* 1997;100:180188.
67. Goldberg IJ, Wagner WD, Pang L, Paka L, Curtiss LK, DeLozier JA et al. The NH2-terminal region of apolipoprotein B is sufficient for lipoprotein association with glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1998;273:35355–35361.
68. Flood C, Gustafsson M, Richardson PE, Harvey SC, Segrest JP, Boren J. Identification of the Proteoglycan Binding Site in Apolipoprotein B48. *J Biol Chem.* 2002;277:32228 –32233.
69. Camejo G, Olofsson SO, Lopez F, Carlsson P, Bondjers G. Identification of Apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis.* 1988;8:368–377.
70. Weisgraber KH, Rall SC Jr. Human apolipoprotein B-100 heparinbinding sites. *J Biol Chem.* 1987;262:11097–11103.
71. Hirose N, Blankenship DT, Krivanek MA, Jackson RL, Cardin AD. Isolation and characterization of four heparin-binding cyanogen bromide peptides of human plasma apolipoprotein B. *Biochemistry.* 1987;26:5505–5512.

72. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM et al. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831-842
73. Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD et al. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. *Circ Res.* 1997;80:810-818
74. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, parhami F et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*1990;87:5134-5138
75. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.*2002;82:47-95
76. Stocker R, Keaney JF. Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-1478
77. Keher JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology.* 2000;149:43-50
78. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O et al. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J Clin Invest.* 1990;85:554-652
79. Herdener M, heigold S, Saran M Bauer G. Targer cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intracellular induction of apoptosis. *Free Radiac Biol Med.* 2000;29:1260-1271
80. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-1476
81. Jones SA, O' Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OTG. Expression of phagocyte NAD(P)H oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996;271:H1626-H1634
82. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in

- rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:14483-14488
83. Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassegue B, Griendling K, Navab M et al. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ Res*. 2003;93:1225-1232
 84. Barry-Lane P, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland S, Yeh E, Runge M. p47phos is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*. 2001;108:1513-1522
 85. Schieffer B, Scheffioer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 2000;101:1372-1378
 86. Azimi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H et al. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NADPH oxidase. *Artheroscler thromb Vasc Biol*. 2002;22:1838-1844
 87. Channon KM. Oxidative stress and coronary plaque stability. *Artheroscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1751-1752
 88. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NADPH oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003;107:1383-1389
 89. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J cardiol*. 2003;91:7A-11A
 90. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
 91. Corti R, Fuster V, Badimon JJ Pathogenetic concepts of acute coronary syndrome *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 7S-14S.

92. Lopez N, Vasudevan S, Alvarez R, Binkley P, Goldschmidt P. Pathophysiology of plaque instability insights at genomic level. *Prog in Cardiovascular Dis* 2002; 44: 323-338.
93. García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 990-1003.
94. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*. 2001; 103:1718-1720.
95. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351: 88-92.
96. Ridker PM, Glvnn RI, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. 1998; 97:2007-2011.
97. Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med*. 2000; 45:391-418.
98. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793–798.
99. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, et al. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21:1574–1583.
100. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003; 107: 398-404.
101. Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovasc Res* 1999; 43:850–859.

102. Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonism. *Blood* 1991;77:1627–1652.
103. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, et al. Polymorphisms of the interleukin-1beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:222-227.
104. Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet.* 2004; 31:207-213.
105. Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G, Eber B. Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. *Am J Pharmacogenomics.* 2003; 3:317-328.
106. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* 2003; 88: 54-60.
107. Pérez Fernández R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 55:738-750.
108. Shibata M, Endo S, Inada K, et al. Elevated plasma levels of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in patients with acute myocardial infarction. *J Interferon Cytokine Res.* 1997; 17:145-150
109. Sugita T, Watarida S, Katsuyama K, Nakajima Y, Yamamoto R, Mori A.. Interleukin-10 concentration in children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112:1127-1128.
110. Domínguez-Rodríguez A, Abreu-González P, De la Rosa A, Vargas M, Ferrer J, García M.. Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol.* 2005;99:77-81.

111. Tristram G Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, John B. Imbodem. Inmunología básica y clínica. Ed 10a. Editorial Manual Moderno. Mexico-Santafe de Bogota. 2001:166-187
112. William E. Paul. Fundamental Immunology. 4th Edition. Ed Lippincott-Raven. New York. 1999: 741-811
113. Dinarello CA: Biological basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996; 87: 2095-2147.
114. Dinarello CA, Wolff SM: The role of interleukin-1 in disease. N Eng J Med. 1993; 328:106-113.
115. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ: cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. Science. 1988; 241: 585-589.
116. Libby P, Ordovas JM, Birinyi LK, Auger KR, Dinarello CA: Inducible interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. J Clin Invest. 1986; 78: 1432-1438.
117. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA: Interleukin-1 induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. J Exp Med. 1984; 160: 618-623.
118. Lopes-Virella MF: Interactions between bacterial liposaccharides and serum lipoproteins and their possible role in coronary artery disease. Eur Heart J. 1993; 14 (suppl K): 118-124.
119. Hasdai D, Scheinowitz M, Leibovitz E, Sclarovsky S, Aldar M, Barak V: Increased serum concentrations of interleukin-1 β in patients with coronary artery disease. Heart. 1996; 76: 24-28.
120. Saadeddin SM, Habbab MA, Ferns GA: Markers of inflammation and coronary artery disease. Med Sci Monit. 2002; 8: RA5-12.
121. Tartaglia LA, Goeddel DV: Two TNF receptors. Immunol Today. 1992; 13: 151-153.

122. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS: The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1991; 88: 9292-9296.
123. Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3: 745-756
124. Bemelman MHA, Van Tits LJH, Buurman WA: Tumor necrosis factor: function, release and clearance. *Crit Rev Immunol*. 1996; 16: 1-11.
125. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS: Detection and localization of TNF in human atheroma. *Am J Cardiol*. 1990; 65: 297-302.
126. Hale KK, Smith CG, Baker SL: Multifunctional regulation of the biological effects of TNF- α by the soluble type I and type II TNF receptors. *Cytokine*. 1995; 7: 26-38.
127. Maury CPJ, Teppo AM: Circulating tumor necrosis factor- α (cachectin) in myocardial infarction. *J Int Med*. 1989; 225: 333-336.
128. Pannitteri G, Marino B, Campa PP, Martucci R, Testa U, Peschle C: Interleukin 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1997; 80: 622-625.
129. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL: Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001; 103: 2055-2059.
130. Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, et al: Tumor necrosis factor- α receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2005;111:863-870.
131. Aggawal BB, Puri RK: Human cytokines: their role in disease and therapy. Cambridge, MA: Blackwell Science, Ed. 1995.pp3-24.

132. Müller-Newn G, Küster A, Hemman U, Keul R, Horsten U, Marstens A, et al: Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *The J Immunol* 1998;161:6347-6355.
133. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS: Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part I: introduction and cytokines. *Circulation*. 2006;113:e72-75.
134. Barton BE: The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev*. 1996; 16:87-109.
135. Lotz M: Interleukin-6. *Cancer Invest*. 1993; 11: 732-742.
136. Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S: Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol*. 2006;63:321-329.
137. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA: Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol*. 2006; 80: 227-236.
138. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, et al: Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*. 1993; 82: 1120-1126.
139. Martins TB, Anderson JL, Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Roberts WL, et al: Risk factor analysis of plasma cytokines in patients with coronary artery disease by a multiplexed fluorescent immunoassay. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:906-913.
140. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH: Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767-1772.
141. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, et al : Inflammatory markers and the risk of coronary heart disease in men and woman. *N Engl J Med*. 2004;351:2599-2610.

142. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A: Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary disease. Effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA*. 2001;286:2107-2113.
143. Blankerberg S, Luc G, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, et al: Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the prospective epidemiological study of myocardial infarction (PRIME). *Circulation*. 2003; 108: 2453-2459.
144. Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, et al. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNF-alpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest*. 2002; 32: 803-810.
145. Girndt M, Köhler H: Interleukin-10 (IL-10): an update on its relevance for cardiovascular risk. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1976-1979.
146. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC: Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angine. *Circulation*. 2001; 104: 746-749.
147. Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM: Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44: 44-49.
148. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM: Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003; 107: 2109-2114.
149. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS: Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes. Part I: introduction and cytokines. *Circulation*. 2006;113:e72-75.

150. Gunnett CA, Heistad DD, Berg DJ, Faraci FM: IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: H1555- H1562.
151. Mostafa Mtairag E, Chollet-Martin S, Oudghiri M, Laquay N, Jacob MP, Michel JB, et al: Effects of interleukin-10 on monocyte/endothelial cell adhesion and MMP-9/TIMP-1 secretion. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 882-890.
152. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM: IL- 10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2304-2310.
153. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342: 1350-1358.
154. Os I, Djurovic S, Seljeflot I, Berg K: Transforming growth factor (TGF)- β 1 inversely related to vascular cell adhesion molecule – 1 in post menopausal women with coronary artery disease. A possible mechanism for the putative cardioprotective role of TGF – β 1?. *J Intern Med.* 2002; 251: 223-227
155. Morisaki N, Kawano M, Koyama N, Koshikawa T, Umemiya K, Saito Y, et al: Effects of transforming growth factor β 1 on growth of aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1991; 88: 227-234.
156. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, et al: The serum concentration of active transforming growth factor β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med.* 1995; 1:74-79.
157. Stefoni S, Cianciolo G, Donati G, Dormi A, Silvestri GM, Coli L, et al: Low TGF- β 1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int.* 2002;61:324-335
158. Wang XL, Liu SX, Wilcken DE: Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 1997; 34: 404-410.
159. Dabek J, Kulach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z: Transforming growth factor β and cardiovascular disease: the other facet of the "protective cytokine". *Pharmacol Rev.* 2006;58:799-805.

160. Bach, EA, Aguet M, Schreiber RD. The INF gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-591
161. Jonasch, E, Haluska, FG. Interferon and oncological practice. Review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *Oncologist.* 2001;6:34-55.
162. Bazer FW, Spencer TE, Ott, TL. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol.* 1997;37:412-420.
163. Yuong HA. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16:563-568
164. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. INF-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001;22:556-560
165. Gessani S, Belardelli F. INF-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9:117-123.
166. Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature.* 1996;380:627-630
167. Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. Stat 6 is required for mediating response to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity.* 1996;4:313-319
168. Russell ME, Adams DH, Wyner LR, Yamashita Y, Halnon NJ, Karnovsky MJ. Early and persistent induction of monocyte chemoattractant protein 1 in rat cardiac allografts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:6086-6090.
169. Luizzo G, Kopecky SL, Frye RL, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999;100:2135-2139
170. Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2002;88:554-567
171. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med.* 2000;247:349-358

172. Koh KP, Wang Y, Yi T, et al. T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from inf-gamma dysregulation of NO synthase. *J Clin Invest.* 2004;114:846-856.
173. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
174. Kaartinen M, van der Wal AC, van der Loos CM, Piek JJ, Koch KT, Becker AE et al. Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:606-612
175. Arbustini E, De Servi S, Bramucci E, Porcu E, Constante AM, Grasso M et al. Comparison of coronary lesions obtained by directional coronary atherectomy in unstable angina, stable angina, and restenosis after either atherectomy or angioplasty. *Am J Cardiol.* 1995;75:675-682
176. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;95:594-599
177. Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. *Circulation.* 2000;101:570-580
178. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation.* 1995;92:657-671
179. Alderman EL, Corley SD, Fhiser LD, Chaitman BR, Faxon DP, Foster ED et al. Five-year angiographic follow-up of factors associated with progression of coronary artery disease in the Coronary Artery Surgery Study (CASS). CASS Participating Investigators and Staff. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 22:1141-1154
180. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lesson from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20: 1262-1275
181. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J et al. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation.* 1996;93:1354-1363

182. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bocciarelli M, Specchia G et al. Plaque erosion is major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart*. 1999;82:269-272
183. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Viemani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *N Engl J Med*. 1997;336:1276-1282
184. Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996;94:2013-2020
185. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 1995; 91:2844-2850
186. Moreno PR, Bernardi VH, Lopez-Cuellar J, Newell JB, McMellon C, Gold HK et al. Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary intervention in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94:3098-3102
187. Garcia-Moll X. Inflammatory and anti-inflammatory markers in acute coronary syndromes. Ready for use in the clinical setting. *Rev Esp Cardiol*. 2005;58:615-617
188. Fragoso JM, Ramirez Bello J, Cruz Robles D, Perez Mendez O, de la Peña A, Vargas Alarcon G. Marcadores pro y antiinflamatorios en la enfermedad arterial coronario y el syndrome isquemico coronario agudo. *Arch Cardiol Mex*. 2009;79:54-62
189. Carter AM. Inflammation, thrombosis and acute coronary syndromes. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2005;2:113-121.
190. Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell HJ, Bradbury LA, Abbott A, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet*. 2004;75:587-595
191. Arnalich F, López-Maderuelo D, Cordoce R, López J, Solis-Garrido LM, Capiscol C, et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and mortality in patients with severe sepsis. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:331-336.

192. Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med*. 2003;198:877-888.
193. Kang S, Kim JW, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. Interleukin-1 beta -511 polymorphisms and risk of cervical cancer. *J Korean Med Sci*. 2007;22:110-113.
194. Gardner ML, Fischer JE, Maly FE, von Kanel R. Effect of the G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF- α) gene promoter site on plasma levels of TNF- α and C-reactive protein in smokers: a cross-sectional study. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2004;4:17.
195. Mackay K, Milicic A, Lee D, Tikly M, Laval S, Shatford J, Wordsworth P. Rheumatoid arthritis susceptibility and interleukin 10: a study of two ethnically diverse populations. *Rheumatology*. 2003;42:149-153
196. Ito M, Takahashi H, Fuse K, Hirono S, Washizuka T, Kato K, et al. polymorphisms of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Heart J*. 2000;41:183-191
197. Koch W, Kastrati A, Bittiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;159:137-144
198. Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J Gastroenterol*. 2005;11:6656-6661
199. Tanaka C, Mannani T, Kamide K, Takiuchi S, Kokubo Y, Katsuya T, et al. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in Japanese general population. *Hypertens Res*. 2005;28:35-41

200. Qi Lu, van Dam RM, Meigs JB, Manson JE, Hunter D, Hu FB. Genetic variation in IL-6 gene and type 2 diabetes: tagging-SNP Haplotype analysis in large-scale case-control study and meta-analysis. *Hum Mol Genet.* 2006;15:1914-1920
201. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension.* 2001;38:399-403
202. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J.* 2001;22:2243-2252.
203. Govan VA, Carrara H, Sachs JA, Hoffman M, Stanczuk G, Williamson AL. Ethnic differences in allelic distribution of IFN- γ in South African woman but no link with cervical cancer. *Carcinogenesis J.* 2003;2:3
204. Qi S, Cao B, Jiang M, Xu Ch, Dai Y, Li K, et al. Association of the -183 polymorphism in the IFN- γ gene promoter with hepatitis B virus infection in the Chinese population. *J Clin Lab Anal.* 2005;19:276-281
205. Bream JH, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young HA. A single polymorphism in the proximal IFN-gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes and Immunity.* 2002;3:165-169
206. Huang Y, Yang H, Borg B, Su X, Rhodes SL, Yang K, et al. A functional SNP of interferon- γ gene is important for interferon- α -induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. *PNAS.* 2007;104:985-990
207. Chong W, Eddie Ip WK, Wan Tso GH, Wai Ng M, Sang Wong WH, Wai Law HK, et al. The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. *BMC Infections Disease.* 2006;6:82
208. Yokota M, Ichihara S, Tong-Lang L, Nakashima N, Yamada Y. Association of T29-C polymorphism of the transforming growth factor- β 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. *Circulation.* 2000;101:2783-2787

209. Peterson MC. Circulating transforming growth factor β 1: a partial molecular explanation for associations between hypertension, diabetes, obesity, smoking and human disease involving fibrosis. *Med Sci Monit.* 2005;11:RA229-232
210. Baogui L, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, August P. TGF- β 1 DNA polymorphisms, protein levels and blood pressure. *Hypertension.* 1999; 33(part II): 271-275
211. Lio D, Candore G, Crivello A, Scola L, Colonna-Romano G, Cavallone L, et al. Opposite effects of interleukin-10 common gene polymorphisms in cardiovascular disease and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet.* 2004;41:790-794
212. Marchand L, Haiman Ch, van den Berg D, Wilkens LR, Kolonel LN, Henderson BE. T29C polymorphism in the transforming growth factor B1 gene and postmenopausal breast cancer risk: The multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:412-415
213. Celedon JC, Lange Ch, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, et al. The transforming growth factor-B1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet.* 2004;13:1649-1656
214. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of transforming growth factor B1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:678-681
215. Pagina electronica del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). www.inegi.gob.mx
216. Lahiri DK, Numberger Jr. JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids res.* 1991;19:5444.
217. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 1955; 19: 251-253

218. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramirez JA, Serrano Jr; CV. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005; 1(3): 245-250
219. Pasqui AL, Di Renzo M, Bova G, Maffei S, Pompella G, Auteri A, Puccetti L. Pro-inflammatory/anti-inflammatory cytokine imbalance in acute coronary syndromes. *Clin Exp Med.* 2006; 6(1): 38-44
220. Wang YN, Che SM, Ma AQ. Clinical significance of serum cytokines IL-1beta, sIL-2R, IL-6, TNF-alpha, and INF-gamma in acute coronary syndrome. *Chin Med Sci J.* 2005;19(2):120-124
221. Suxia Qi, Cao B, Jiang M, Xu Ch, Dai Y, Li K, Wang K, Ke Y, Ning T. Association of the -183 polymorphisms in the INF-gamma gene promoter with hepatitis B virus infection in the Chinese population. *J Clin Lab Anal.* 2005;19: 276-281
222. Duff GW. Cytokines and anti-cytokines. *Br J Rheumatol* 1993; 32 (Suppl 1): 15-20.
223. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin 1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 27-55.
224. van Minkelen R, Wettinger SB, de Visser MC, Vos HL, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bertina RM, Doggen CJ. Haplotypes of the interleukin-1 receptor antagonist gene, interleukin-1 receptor antagonist mRNA levels and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 203:201-205,2009.
225. Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002; 3(3):REVIEWS0004.
226. Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 June 19; 98(13): 7025-7028.
227. Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, Jeffery S, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW, Crossman DC. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation.* 1999 Feb 23;99(7):861-6.

228. Iacoviello L, Donati MB, Gattone M. Possible different involvement of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in coronary single vessel disease and myocardial infarction. *Circulation*. 2000 May 9;101(18):E193
229. Toluoso B, Pietrapertosa D, Morelli A, De Santis M, Gremese E, Farina G, Carniello SG, Del Frate M, Ferraccioli G. IL-1B and IL-1RN gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: relationship with protein plasma levels and response to therapy. *Pharmacogenomics*. 2006 Jul;7(5):683-95.
230. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol*. 1998 Aug;28(8):2598-602.
231. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol*. 1995 Feb;99(2):303-10.
232. Vamvakopoulos J, Green C, Metcalfe S. Genetic control of IL-1beta bioactivity through differential regulation of the IL-1 receptor antagonist. *Eur J Immunol*. 2002 Oct;32(10):2988-96.
233. Gabriel AS, Ahnve S, Wretling B, Martinsson A. IL-6 and IL-1 receptor antagonist in stable angina pectoris and relation of IL-6 to clinical findings in acute myocardial infarction. *J Intern Med*. 2000; 248: 61-66.
234. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11: 1223-1230
235. Barbulescu K, Meyer zum Büschenfelde KH, Neurath MF. Constitutive and inducible protein/DNA interactions of the interferon-gamma promoter in vivo in [corrected] CD45RA and CD45RO T helper subsets. *Eur J Immunol*. 1997; 27:1098-107.

236. Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M, Yano M, Tanaka T, Yamaguchi M, Shigeta H, Ogata M, Nakamura N, Yoshikawa T. Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2002; 19: 1000-1005.
237. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, Lowe GD, Humphries SE. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1458-1463.
238. Rosenwasser LI, Borish L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:5252-5155
239. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An Investigation of polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24:1-8
240. Crawley E, Kay R, Silibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1101-1108
241. Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Short-house C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alpha. *Hepatology.* 1999;30:526-530
242. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. The transforming factor growth beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169:214-219
243. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1. *Hum Mol Genet.* 1999;8:93-97

244. Suthanthiran M, Li B, Song JO, Ding R, Sharma BK, Shwartz JE, et al. Transforming growth factor beta1 hiperexpression in African-American hipertensives: A novel mediator of hypertension and /or target organ damage. *Proc natl Acad Sci USA*. 2000;97:3479-3484.
245. Cambien F, Richard S, Troesch A, et al. Polymorphism of the transforming growth factor B1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. *Hypertension*. 1996;28:881-887
246. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC, et al. Transforming growth factor B1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin Sci*. 1998;95: 659-667
247. Mark PS Sie, Andre G. Utterlinde, Michiel J. Bos, Pascal P. Arp, Monique MB. Breteler, Peter J. Koudstaal, et al. TGF-(beta)1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam study. *Stroke*. 2006;37:2667-2671
248. Tzakas P, Wong BYL, Logan AG, Rubin LA, Cole D. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass: association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2005;6:29
249. van Demien CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Nolte IM, Boezen HM. Decorin and TGF-B1 polymorphisms and development of COPD in a genral population. *Respir Res*. 2006;7:89
250. Crubo F, Palumbo L, Franco E, Bergerone S, Carturan S, Guerra S, et al. Role of TGF-B1 haplotypes in the occurrence of myocardial infarction in young Italian patients. *BMC Medical Genetics*. 2008;9:13

IX. ANEXOS

TECNICA DE EXTRACCION DE DNA POR EL METODO DE EXPULSION SALINA.

1. Recolectar 8-10 ml de sangre total periferica con anticoagulante (EDTA).
2. En un tubo falcón de 50 ml. poner 40 ml de solución de lisis (SLR 1X), vaciar toda la sangre en el tubo. Mezclar vigorosamente la solución.
3. Centrifugar la solución a 1200 rpm/10 minutos
4. Quitar el sobrenadante con una pipeta con cuidado, sin tocar el precipitado.
5. Agregar nuevamente sol. SLR 1X hasta 40 ml. Centrifugar a 1200 rpm/10 minutos.
6. Quitar el sobrenadante; hasta que el precipitado este limpio (sin presencia de eritrocitos). En este paso se puede invertir el tubo y dejarlo escurrir. Repetir el lavado las veces necesarias para su limpieza.
7. Agregar en el tubo falcón: 259ul de agua estéril, 160ul de buffer de proteinasa, 40ul de SDS al 20% y 40ul de proteinasa K. disgregando el paquete.
8. Pasar el paquete disgregado con la solución a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Previamente marcado y mezclar vigorosamente.
9. Incubar a 37°C toda la noche o incubar a 55|°C durante 3 a 4 horas (en este caso agregar 20ul de proteinasa K).
10. Terminada la incubación agregar 240ul de NaCl 5M. Mezclar vigorosamente durante 40 segundos y centrifugar a 14000 rpm/ 10 minutos.
11. Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf sin tomar el precipitado.
12. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/ 10 minutos y recuperar el sobrenadante.
13. Agregar etanol frio al 95% e invertir el tubo hasta que aparezca un precipitado blanco (DNA).
14. Centrifugar a 14000 rpm/10 minutos.
15. Se decanta el sobrenadante y se agrega etanol frio al 70%, con el propósito de lavar el DNA.

16. Centrifugar a 14000 rpm/10 minutos y se desecha el sobrenadante.
17. Secar el precipitado en un desecador de DNA durante 30 minutos.
18. Agregar de 50 a 100ul de TE (tris -EDTA) y someterlo a una temperatura de 65°C durante 3 horas para que se resuspenda el DNA en el agua.
19. Medir la concentración del DNA a 260 nm. La pureza se obtiene de medir el DNA a 260 nm y las proteínas a 280 nm, la relación entre 260/280 nos da la pureza. Este valor debe corresponder entre 1.7-1.8

PROCEDIMIENTO PARA AJUSTAR EL DNA.

Abs a 260 nm x 50 ng (que es el índice de densidad óptica) x 100ul (volumen de dilución)= [ng/ul] x vol total del tubo = ng totales en el tubo. Este proceso se hace en un NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

Para ajustar a 100 ng/ul dividir los ng totales entre 100 (concentración deseada) y la resultante restarle el volumen que ya se tienen en el tubo. El resultado es la cantidad que hay que agregar de agua a mi tubo para que quede ajustado el DNA a la concentración deseada; esto es 100 ng por ul.

Hacer diluciones a 10 ng por ul. Esto con la fineliada de ajustar el DNA para trabajarlo en el equipo de Tiempo-Real.

EJEMPLO:

Abs 260 nm (0.056) x 50 ng x 100 (factor de dilución)=282.2 ng/ul

282.2 x 90ul (vol. del tubo)=25425 mg en 90 ul (concentración total)

$244257/100$ [concentración que deseo]=127.125ul - 90 (vol que ya tengo)=37.125ul que necesitó agregar a mi tubo para tenerlo todo ajustado a 100ng/ul. La dilucion es de la siguiente manera tomar 10 ul del tubo ajustado a 100ng por ul y poner 90 de agua para que la concentración total sea de 10ng por ul.

TECNICA de PCR en tiempo-real.

La amplificación es por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en tiempo-real). Consta de varios pasos, los cuales son de acuerdo a la manufactura de Applied Biosystems México (ABM). ABM proporciona los reactivos que se necesitan para este propósito son: la mezcla maestra (master mix), los ensayos TaqMan.

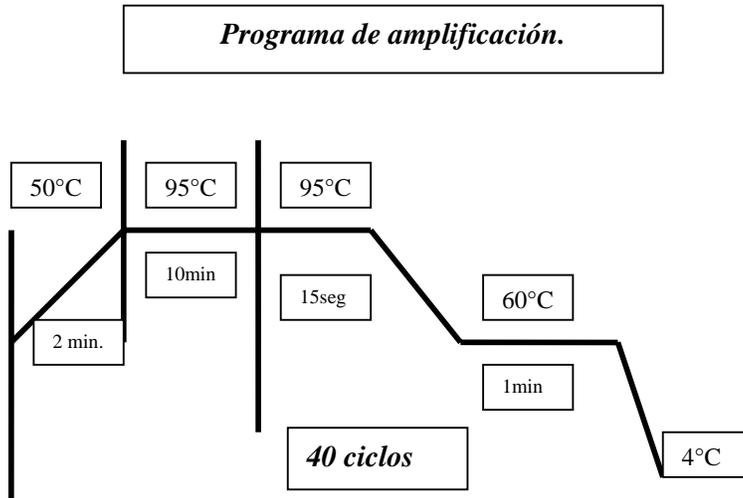
La mezcla maestra (master mix) contiene los siguientes reactivos ya mezclados: AmpliTaq polimerasa, dNTP's con (dUTP), referencia pasiva ROX, Buffer y MgCl.

Los ensayos TaqMan contienen: los iniciadores y la sonda que detectaran el sitio polimorfico (La sonda es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicòn). Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presentan en el extremo 5` una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3` un apagador que no permite la fluorescencia del reportero).

La detección de la PCR en Tiempo-Real se lleva acabo mediante la medición de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y detectada por el sistema óptico de detección del equipo especialmente diseñado para este propósito. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado. La determinación de los SNP's es por medio de dos sondas cada una de las cuales presenta en la posición central una de las variantes del nucleótido dimorfico (es decir, una de las sondas contiene el tipo silvestre y la otra el tipo mutante), marcadas con los reporteros FAM y VIC para diferenciarlas entre si. El principio es que la sonda se hibride perfectamente con la secuencia blanco que es escindida por la Taq polimerasa, mientras que esta hace un mismach en el nucleótido dimorfico se reduce la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia blanco y por lo tanto se degrada por la misma Taq polimerasa que tiene función de exonucleasa.

Es decir, la sonda TaqMan es complementaria a una secuencia localizada dentro del amplicòn la cual se encuentra flanqueada por las secuencias especificas de los iniciadores que se utilizan para amplificación de PCR, de tal forma cuando

EL PROGRAMA DE AMPLIFICACION.



- ⊞ Activación AmpErase UNG: 50°C durante 2 minutos
- ⊞ Desnaturalización: 95°C durante 10 minutos
- ⊞ Alineación y elongación: 95°C durante 15 seg
- ⊞ Alineación y elongación final 60°C durante 1 minuto
- ⊞ Todo el proceso se realiza durante 40 ciclos.

ANALISIS DE RESULTADOS.

Una vez finalizado el proceso de amplificación. Se analiza en el mismo equipo con el software SDS 3.1 que el mismo equipo trae incluido. El análisis que se hace es el de discriminación alelica, en el cual se muestra tres figuras en colores (rombo azul, círculo rojo y triángulo verde) que indican en azul homocigocidad a la variante tipo silvestre, el rojo homocigocidad a la variante tipo mutante y el verde heterocigocidad.

Para preparar 1L 1X

50ml de SLR (20X) aforar a 1000ml con H₂O.

BUFFER DE PROTEINASA K (5X)

Para 100ml

0.375M de NaCl = 2.19grs

0.12M de EDTA =4.46grs

Ajustar el pH a 8 y aforar a 100ml con H₂O.

Filtrar.

PROTEINASA K

Ajustarla a 10 mg/ml con H₂O inyectable.

SDS AL 20%

NaCl 5M 14.6grs en 50 ml