



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO PARA EL POLIMORFISMO -308
G>A (rs1800629) EN LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *TNFA* Y SU
RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Roberto Porco Gallina Rodríguez como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutores: Prof. Carolina Pestana
Prof. Guillermina Alonso

Caracas, Venezuela
MAYO - 2014

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECs) constituyen la principal causa de muerte a nivel mundial, siendo el infarto agudo al miocardio (IAM) la primordial manifestación de estas patologías y primera causa de muerte en Venezuela, seguido en tercer lugar por el accidente cerebrovascular (ACV). Por su parte, la trombosis venosa profunda (TVP), corresponde a otra de las manifestaciones trombóticas de gran impacto en la salud pública. Estas enfermedades son producidas en parte, por la alteración en los mecanismos de coagulación sanguínea, los cuales van a generar una rápida y fuerte respuesta inflamatoria. Entre los factores genéticos que pueden aumentar el riesgo a padecer estas enfermedades, se encuentra el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) ubicado en la región promotora del gen *TNFA*, cuyo proteína codificante, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una importante citoquina proinflamatoria. El objetivo del presente trabajo fue determinar el genotipo para este polimorfismo en pacientes que han sufrido IAM (n=100), ACV (n=73) o TVP (n=100) e individuos controles (n=100), e investigar su relación con el desarrollo de estas patologías. De esta manera, a partir de muestras de sangre periférica total, se realizó el aislamiento del ADN genómico y posteriormente, se realizó la genotipificación para dicho polimorfismo mediante la implementación de la técnica de PCR-RFLP. El análisis de los resultados mostró un incremento en el riesgo de desarrollo de IAM de hasta tres veces en individuos portadores del alelo de riesgo -308A para este polimorfismo, valor estadísticamente significativo. Por su parte, no se determinó asociación significativa de riesgo atribuible para el desarrollo de ACV o TVP. Se concluyó que la presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*, pudiera estar altamente relacionado con el desarrollo de IAM y ser este un marcador a considerar en estudios de perfil de riesgo genético cardiovascular. En este sentido, la importancia de este estudio se basa en poder determinar la existencia de un posible aumento en la susceptibilidad génica individual en población sana para esta patología, en presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo estudiado, lo cual permitirá desarrollar mejores tratamientos, medidas preventivas y reducir así, la alta mortalidad de estas enfermedades.

Palabras Clave: polimorfismo, gen *TNFA*, polimorfismo, IAM, ACV, TVP.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Enfermedades Cardiovasculares (ECs).....	4
2.1.1. Infarto agudo al miocardio.....	5
2.1.2. Accidente cerebrovascular.....	6
2.1.3. Aterosclerosis.....	7
2.1.4. Trombosis.....	10
2.2. Relación entre los procesos de coagulación sanguínea e inflamación.....	11
2.2.1. Hemostasia y proceso de coagulación sanguínea.....	13
2.2.2. Proceso de inflamación.....	16
2.3. Factores de riesgo asociados al desarrollo de las ECs.....	18
2.3.1. Factores ambientales o modificables.....	18
2.3.2. Factores genéticos.....	19
2.3.2.1. Polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	20
III. JUSTIFICACIÓN.....	27
IV. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo general.....	29
4.2. Objetivos específicos.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. Características de la población a ser estudiada.....	30
5.1.1. Población de pacientes o casos.....	30
5.1.1.1. Criterios de inclusión.....	30
5.1.1.2. Criterios de exclusión.....	31

5.1.2. Población de individuos controles.....	31
5.1.2.1. Criterios de inclusión.....	31
5.1.2.2. Criterios de exclusión.....	32
5.2. Obtención de las muestras.....	32
5.2.1. Diagnóstico molecular.....	32
5.2.1.1. Extracción de ADN genómico a partir de sangre total o paquete globular.....	34
5.2.1.2. Comprobación de integridad y cuantificación del ADN genómico.....	34
5.2.1.3. Amplificación por PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>) de los fragmentos de interés.....	35
5.2.1.4. Ensayo de restricción enzimática (RFLP).....	37
5.2.1.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	38
5.3. Análisis Estadístico.....	39
VI. RESULTADOS.....	41
6.1. Características de las poblaciones estudiadas.....	41
6.2. Extracción de ADN genómico (ADNg) a partir de sangre periférica total.....	42
6.3. Determinación del genotipo para el polimorfismo -308G>A (rs1800629) en el gen <i>TNFA</i> mediante la técnica de PCR-RFLP.....	44
6.4. Distribución de los genotipos obtenidos para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en los diferentes grupos de estudio.....	47
6.5. Evaluación del Equilibrio Herdy-Weinberg (H-W).....	50
6.6. Determinación de las frecuencias genotípicas, alélicas y Odds Ratio (OR).....	51
6.7. Efecto aditivo de la combinación del alelo de riesgo -308A en el gen <i>TNFA</i> y diferentes alelos de riesgo procoagulantes.....	53
VII. DISCUSIÓN.....	56
7.1. Características étnicas de la población estudiada.....	58
7.2. Polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen <i>TNFA</i> y su asociación con el desarrollo de las ECs.....	59
7.2.1. Infarto agudo al miocardio (IAM).....	60
7.2.2. Accidente cerebrovascular (ACV).....	63
7.2.3. Trombosis venosa profunda (TVP).....	64

7.3. Efecto de diferentes factores de riesgo en de desarrollo de ECs.....	67
7.4. Implicaciones e importancia conocimiento genético del polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	72
VIII. CONCLUSIONES.....	76
IX. FINANCIAMIENTO.....	78
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
XI. ANEXOS.....	89
Anexo I: Planilla de consentimiento informado para los pacientes que entran al estudio.....	89
Anexo II: Planilla de recolección de datos y parámetros clínicos.....	92
Anexo III: Concentraciones y purezas de los ADNg aislados.....	94

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Clasificación de las quimioquinas y citoquinas.....	17
Tabla 2. Condiciones óptimas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	36
Tabla 3. Características generales de las poblaciones estudiadas.....	41
Tabla 4. Asociación de diferentes características poblacionales con las 3 patologías de estudio.....	42
Tabla 5. Promedio y desviación estándar de los valores de concentración y pureza de ADN genómico extraído para los grupos de estudio.....	43
Tabla 6. Análisis del equilibrio H-W para el polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	51
Tabla 7. Tabla resumen de las frecuencias genotípicas, alélicas y valores del cociente OR para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen <i>TNFA</i> en los diferentes grupos de estudio.....	52
Tabla 8. Efecto aditivo de los diferentes alelos de riesgo de los <i>SNPs</i> en los genes <i>TNFA</i> , <i>F2</i> y <i>F5</i> , en el riesgo de IAM, ACV y TVP.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación de un infarto agudo al miocardio producto de la obstrucción de la arteria coronaria.....	6
Figura 2. Tipos de accidente cerebrovascular (ACV).....	7
Figura 3. Evolución de la placa de ateroma.....	9
Figura 4. Representación gráfica de las diferencias entre un trombo arterial y un trombo venoso.....	11
Figura 5. Relación entre los procesos de inflamación, coagulación y fibrinólisis.....	13
Figura 6. Modelo Celular de la coagulación sanguínea.....	15
Figura 7. Proceso de formación del TNF- α	21
Figura 8. Ruta de señalización celular-MAPKKK inducida por TNF- α	22
Figura 9. Análisis de la secuencia de un fragmento del gen <i>TNFA</i>	23
Figura 10. Posición cromosómica del polimorfismo -308 G>A.....	24
Figura 11. Plan de trabajo a seguir para el análisis molecular del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen <i>TNFA</i>	33
Figura 12. Fragmento de la secuencia actual del gen <i>TNFA</i> (<i>NG007462.1</i>).....	37
Figura 13. Patrón de restricción del fragmento de PCR de 107 pb contenido del sitio polimórfico -308 G>A al ser digerido con la enzima <i>NcoI</i>	38
Figura 14. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8 % de ADNg extraído a partir de muestras de sangre de 5 pacientes.....	43
Figura 15. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5 % de los productos de PCR contentivos del sitio polimórfico -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	44
Figura 16. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 8 % de los productos de la RFLP contentivos del sitio polimórfico -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	45
Figura 17. Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR-RFLP y de secuenciación para la genotipificación del polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	47
Figura 18. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con IAM según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	48
Figura 19. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con TVP según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	49
Figura 20. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con ACV según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen <i>TNFA</i>	50
Figura 21. Representación gráfica de los ORs obtenidos para las tres patologías estudiadas con respecto a la presencia del AR para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen <i>TNFA</i>	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A: Adenina

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Ácido desoxirribunucleico

ADNg: ADN genómico

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

ECs Enfermedades cardiovascular

FT: Factor tisular

G: Guanina

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HTA: Hipertensión arterial

IAM: Infarto agudo al miocardio

IL-1: Interleuquina 1

IL-2: Interleuquina 2

IL.6: Interleuquina 6

IL-10: Interleuquina 10

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LDL-ox: LDL oxidada

LGMHB: Laboratorio de Genética Molecular Humana B

OR: Odds Ratio o Cociente de Razón de probabilidades

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerasa Chain Reaction*)

RFLP: Polimorfismos por longitud de los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Tm-TNF: TNF Transmenbrana

sTNF: TNF soluble

TNFA: Gen que codifica para el TNF- α

TVP: Trombosis venosa profunda

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECs), son en la actualidad la principal causa de muerte a nivel mundial, constituyendo un problema de salud pública y prioridad sanitaria. En el caso particular de Venezuela, para el 2010, aproximadamente el 21% del total de muertes fueron debidas al desarrollo de una EC (MPPS, 2012). Entre estas enfermedades, las de tipo isquémica son las de mayor incidencia, siendo la principal manifestación el infarto agudo al miocardio (IAM). Asimismo, las enfermedades vasculares periféricas, como la trombosis venosa profunda (TVP), presentan un elevado número de casos a nivel mundial.

El mecanismo principal causante de las ECs es la aterosclerosis, caracterizada por un bloqueo parcial o total de la circulación sanguínea. Las principales arterias sufren una reducción de su diámetro interno, generado por la formación de una placa de ateroma, ocasionando además, el endurecimiento de las arterias y un aumento de la presión arterial. Si continúa el crecimiento de la placa, ésta puede llegar a romper la capa de células endoteliales y activar el proceso de coagulación sanguínea, conllevando a la formación de un trombo arterial, que dependiendo en donde se produzca, puede generar en última instancia el desarrollo de complicaciones clínicas como un IAM, accidente cerebrovascular (ACV), trombosis, entre otros.

Otro mecanismo que puede conllevar al padecimiento de algún tipo de EC, es la inducción anormal de la coagulación sanguínea. Si se producen eventos de coagulación sanguínea de manera descontrolada, se van a generar trombos en diferentes vasos sanguíneos, ya sean en arterias o venas, que también pueden generar la obstrucción de las mismas. Sumado a ello, como un evento secundario, el desprendimiento de uno de estos coágulos, por ejemplo en una vena del cuerpo, puede traer en consecuencia el desarrollo de un tromboembolismo pulmonar (TEP), obstruyendo el paso de sangre y disminuyendo la cantidad de oxígeno y de nutrientes transportado (Fox y Kahn, 2005).

Debido a la alta incidencia de estas enfermedades a nivel mundial, ha sido de gran importancia conocer las causas que puedan conllevar al padecimiento de estas patologías, con el fin de poder prevenirla y mejorar la calidad de vida de las personas. Entre los diferentes factores de riesgo que han podido ser asociados, se tienen aquellos de tipo modificables como

el tabaquismo, la obesidad, el sedentarismo, el estrés, entre otros; y aquellos no modificables o propios del individuo como la edad, el sexo, el origen étnico y en general las variantes de tipo genético que involucran los antecedentes familiares con riesgo de EC (Mitchell y col., 1996).

Actualmente, es bien sabido que muchas ECs, como el IAM, tienen un componente hereditario importante. En la última década se ha buscado identificar aquellos genes candidatos, cuyas alteraciones génicas codifiquen productos proteicos alterados responsables de un aumento del riesgo de sufrir estas patologías, lográndose avances significativos gracias a los adelantos en la biología molecular. Ello, ha permitido el estudio cada vez más preciso de aquellos cambios en la secuencia de ADN que pudiesen tener un efecto perjudicial en el individuo (Casas y col., 2006).

Algunos de los estudios realizados se han enfocado en el análisis de genes candidatos relacionados con la producción de citoquinas, debido a que los procesos inflamatorios juegan un papel importante en los mecanismos de coagulación y de formación de la placa de ateroma. Algunas de las citoquinas más estudiadas han sido la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α); debido a su papel importante como proteínas reguladoras y activadoras de numerosas rutas de señalización celular (Goldsby y col., 2001).

Específicamente el TNF- α , es conocido por ser una potente citoquina con un amplio rango de actividades pro-inflamatorias. Este, es producido principalmente por los monocitos y los macrófagos, aunque células como los linfocitos T y B también producen cantidades significativas de esta proteína (Wilson y col., 1997). Entre las diferentes funciones, esta citoquina presenta un efecto citotóxico, además de inducir la transcripción y la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias como la IL-6 (Wilson y col., 1997).

Debido a que la EC es una enfermedad multifactorial compleja asociada a un proceso inflamatorio crónico, cuya génesis y desarrollo pudiese estar acompañado de un componente genético importante, muchos estudios se han abocado a la identificación de polimorfismos genéticos y sus respectivos alelos de riesgo, en el gen que codifica para la proteína TNF- α . En este sentido, se han identificado diversos polimorfismos asociados a este gen, siendo uno de los más estudiados el encontrado en la región promotora proximal, específicamente en la

posición -308 (rs1800629), en donde se produce el cambio de una guanina G (alelo normal) por una adenina A (alelo mutado). Entre ellos, la presencia del alelo mutado A ha sido asociado con un aumento en los niveles transcripcionales del gen y en los niveles de esta proteína; y en consecuencia, a una mayor respuesta inflamatoria por parte del organismo, siendo considerado como el alelo de riesgo (Wilson y col., 1997).

Es por ello, y con el fin de determinar la susceptibilidad genética individual asociada con el desarrollo del IAM, ACV y/o TVP como principales manifestaciones clínicas de las ECs, en el Laboratorio de Genética Molecular Humana B de la Universidad Simón Bolívar se están investigando las principales alteraciones genéticas en diversos genes candidatos y su relación con diferentes patologías trombóticas en la población venezolana. Específicamente, este trabajo tuvo como objetivo principal, determinar los genotipos para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en la región promotora proximal del gen *TNFA* mediante la implementación de la técnica de PCR-RFLP, en una muestra de la población constituida por pacientes diagnosticados con IAM, ACV, TVP e individuos controles sanos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades Cardiovasculares (ECs)

Las enfermedades cardiovasculares (ECs) son aquellas que afectan al sistema circulatorio, caracterizándose por ser de etiologías diferentes y localización diversa, incluyendo los vasos sanguíneos (venas y arterias), la sangre y el corazón. Estas enfermedades pueden clasificarse principalmente en 3 tipos fundamentales: 1) las enfermedades isquémicas del corazón, 2) las enfermedades cerebrovasculares, 3) las enfermedades cardiovasculares periféricas; siendo las dos primeras las que representan la principal causa de muerte asociada a EC (Corella y Ordovás, 2007).

Las enfermedades isquémicas del corazón son debidas al estrechamiento progresivo de las arterias coronarias, causado por la formación de una placa de ateroma. La obstrucción total de la arteria conlleva a la interrupción del flujo de sangre o isquemia; por lo que, si este estado persiste en el tiempo, el tejido cardíaco muere dando lugar a una zona de necrosis o infarto (Corella y Ordovás, 2007).

Las enfermedades cerebrovasculares, se deben a alteraciones de la circulación sanguínea del cerebro, siendo clasificadas en isquémicas o hemorrágicas. Las enfermedades cerebrovasculares de tipo isquémica se caracterizan por la reducción del flujo sanguíneo que llega hacia alguna zona del cerebro, pudiendo generar daños irreversibles a este órgano. Por su parte, las de tipo hemorrágica se producen por una extravasación de la sangre hacia el tejido cerebral debido a la ruptura de un vaso (Corella y Ordovás, 2007).

Por último, las enfermedades vasculares periféricas afectan a las arterias o a las venas que irrigan a los miembros superiores (brazos) o miembros inferiores (piernas). Ello, se debe principalmente a la formación de coágulos o trombos anómalos en las paredes internas de los vasos sanguíneos, conllevando a un estrechamiento de los mismos y a un aumento de la presión sanguínea, lo cual puede producir la isquemia (Corella y Ordovás, 2007).

2.1.1 Infarto agudo al miocardio (IAM)

El infarto agudo al miocardio se define como la muerte del músculo cardíaco (miocitos cardíacos), debido a una isquemia prolongada, provocada en la mayoría de los casos por una oclusión de las arterias coronarias (arterias que irrigan el corazón y con ello, la reducción del flujo de oxígeno al órgano, ocasionando el cese de la actividad cardíaca (Boersma y col., 2003).

La principal causa asociada a la obstrucción de las arterias coronarias es la aterosclerosis, mecanismo fisiopatológico el cual conlleva poco a poco la reducción de la luz del vaso, hasta llegar a obstruirlo completamente. Por su parte, la activación inapropiada de la cascada de coagulación, en conjunto con la respuesta inflamatoria, incrementan la rapidez en que se produce la aterogénesis. En este sentido, un espasmo coronario, un émbolo o la ruptura de la arteria coronaria puede ocasionar un IAM (Havey y Chew, 2008).

Con el fin de identificar la presencia de un IAM, la organización mundial de la salud (OMS), ha definido que un IAM ocurre cuando al menos dos de estos tres eventos ocurren: dolor en el pecho, aumento en la concentración de creatina quinasa-MB en suero y un análisis de electrocardiograma positivo para esta patología; lo que hace posible que en la mayoría de los casos se dé un diagnóstico rápido y un tratamiento efectivo. Ahora bien, en muchos de los casos si el daño al músculo cardíaco es muy grave, puede traer en consecuencia la muerte del paciente (Boersma y col., 2003).

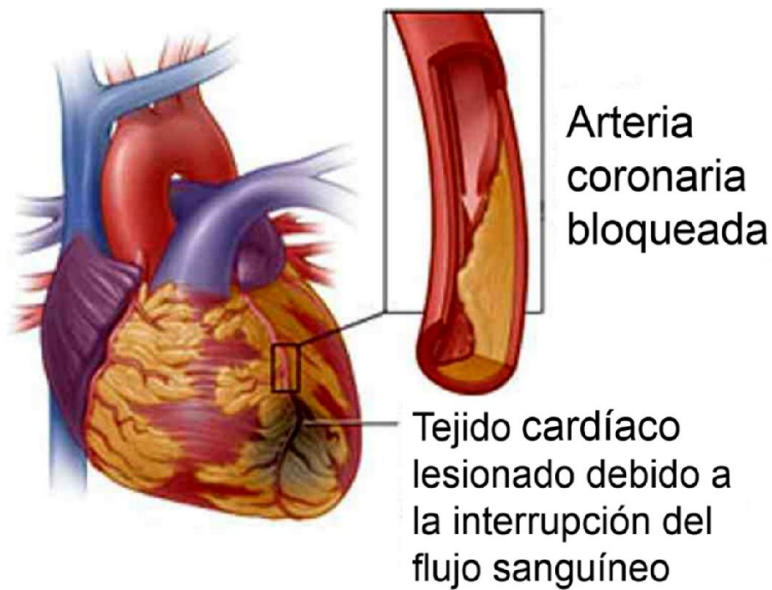


Figura 1. Representación de un infarto agudo al miocardio producto de la obstrucción de la arteria coronaria [Tomado y modificado de: <http://reddesaludiam.blogspot.com/>].

2.1.2 Accidente cerebrovascular (ACV)

El accidente cerebrovascular (ACV), es una EC, que se produce por el deterioro o daño neurológico debido a la reducción del flujo sanguíneo cerebral, y se caracteriza por aparecer de manera repentina (Crepeau y col., 2005).

El ACV puede dividirse en dos tipos dependiendo del mecanismo responsable por el cual este se produce (Figura 2). Por un lado, el ACV isquémico es generado por un flujo sanguíneo inadecuado a una zona específica del tejido cerebral, provocando un área de infarto cerebral (Figura 2.A). Por otro lado, el ACV hemorrágico es producido por una extravasación sanguínea en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo, generando la lesión o desplazamiento de las estructuras cerebrales (Figura 2.B) (Velez y col., 2002).

El desarrollo de esta enfermedad es principalmente ocasionado por la obstrucción vascular debido generalmente a la formación de un trombo sanguíneo generado en alguna arteria del cerebro, que puede además estar superpuesto a una placa aterosclerótica, reduciendo el flujo sanguíneo. Sin embargo, la obstrucción de la vasculatura cerebral puede

deberse a un émbolo (fragmento de coágulo sanguíneo que viaja por el torrente sanguíneo), el cual al detener el flujo de sangre, causa la liberación de este en el cerebro por presión capilar y arteriolar, causando la disfunción o muerte de un área específica del cerebro (Crepeau y col., 2005).

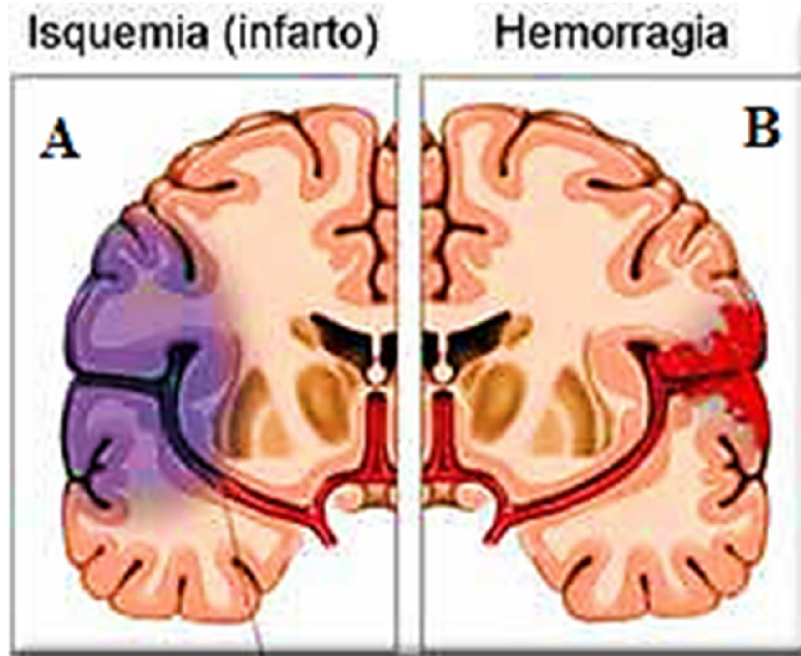


Figura 2. Tipos de accidente cerebrovascular (ACV). A) Representación esquemática de un ACV del tipo isquémico. B) Representación esquemática de un ACV del tipo hemorrágico [Tomado y modificado de: http://www.companiamedica.com/images/ataque_cerebrovascular2.jpg].

2.1.3 Aterosclerosis

La aterosclerosis se define como un proceso crónico e inflamatorio que se produce en respuesta a diferentes formas de daño al endotelio vascular, órgano de gran importancia para el mantenimiento y regulación del sistema cardiovascular. Debido a ello, si el tejido endotelial entra en un estado de disfunción, producto de la acción de diferentes factores, ello se convierte en el principal iniciador del proceso aterosclerótico (Chechi y col, 2006). La aterosclerosis está caracterizada por el engrosamiento de las paredes arteriales, ocasionado por la acumulación de lípidos en la zona del subendotelio, formándose la llamada placa de ateroma. Esta, crece de manera progresiva disminuyendo el diámetro del lumen vascular, reduciendo el flujo sanguíneo normal a los órganos vitales como el corazón y el cerebro,

además de ocasionar una pérdida de elasticidad, engrosamiento y endurecimiento arterial (George, 2010).

En determinadas circunstancias estas placas de ateroma pueden fracturarse, haciéndolas más frágiles y vulnerables. Esto puede conllevar a la formación de una trombosis arterial, como evento secundario producto de la activación de los factores de coagulación sanguínea y formación de un coágulo o trombo alrededor de los depósitos de la placa, disminuyendo aún más la luz arterial y el flujo sanguíneo. Adicional a ello, este coágulo puede llegar a desprenderse y viajar libremente por el torrente sanguíneo hasta llegar al corazón, el cerebro o los pulmones, y obstaculizar arterias de menor diámetro o tamaño, llegando a ocasionar un infarto agudo del miocardio (IAM), un ACV o una embolia pulmonar, respectivamente (Tousoulis y col., 2003).

De esta manera, la aterosclerosis se define como un proceso progresivo, resultante de un conjunto de eventos patológicos que siguen a la disfunción del endotelio. Entre estos eventos se destacan: la adhesión y penetración de los monocitos a la pared del vaso, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incorporación de las LDL-oxidadas (LDL-ox) por los macrófagos; con la subsiguiente formación de las células espumosas. Adicionalmente, este proceso viene acompañado por la generación de citoquinas y factores de crecimiento, migración y proliferación de células del músculo liso vascular (VSMC, por sus siglas en inglés: *Vascular Smooth Muscular Cells*) y la lesión vascular por la formación de una placa fibrosa. Esta placa fibrosa puede complicarse generando el desarrollo de hemorragias, necrosis, calcificación, ulceraciones o trombosis producto de su ruptura; conllevando a una serie de manifestaciones clínicas, entre ellas el IAM y el ACV isquémico (Ruef y col., 1999).

Cuando los niveles plasmáticos de LDL son saturantes (Figura 3), trae como consecuencia la acumulación de estas lipoproteínas en el espacio subendotelial, en donde pueden ser oxidadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las células endoteliales, las VSMC y los macrófagos (Vega, 2006). Una vez que estas lipoproteínas son oxidadas, las LDL-ox son fagocitadas ávidamente por los macrófagos, los cuales no reconocen las LDL nativas, sino aquellas que se han visto modificadas, dando origen a la

producción de las células espumosas, producto de esta incorporación ilimitada de las LDL-ox (Bird y col., 1999).

La acumulación de células espumosas comienza a generar un ligero engrosamiento en la zona subendotelial cubierta de endotelio intacto, lo cual se conoce como estría grasa. Si persisten las agresiones crónicas de estímulos aterogénicos, se puede llegar a la formación de una placa de ateroma bien estructurada (Figura 3). De esta manera, la cantidad de lípidos continúa aumentando, así como la acumulación de estos por parte de las células espumosas, hasta que se produce la lisis de éstas, liberando su contenido al espacio extracelular. Esto último, desencadena una fuerte respuesta inflamatoria, conllevando a la liberación de diferentes proteínas, como citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y de agregación plaquetaria; además de inducir la infiltración de células de la musculatura lisa a esta placa de ateroma (Figura 3) (Rodríguez y col., 2009).

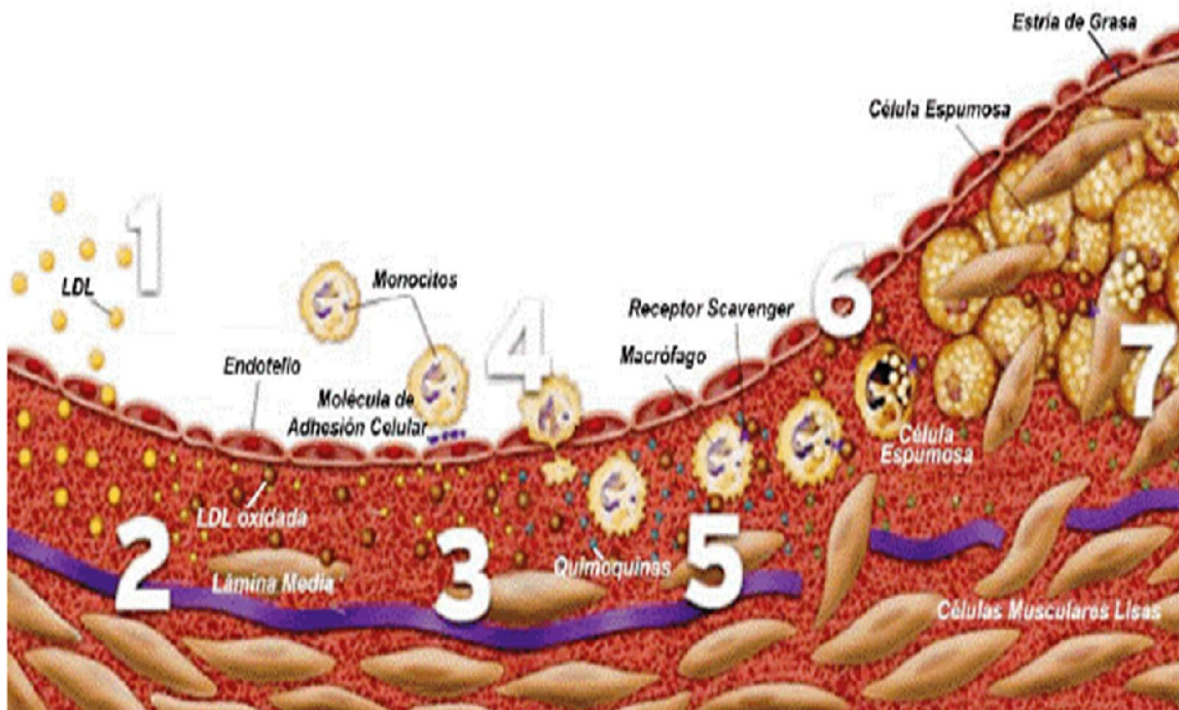


Figura 3. Evolución de la placa de ateroma. 1) Migración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial, 2 y 3) Proceso de oxidación de las LDLs, 4) Migración de monocitos al espacio subendotelial 5) Incorporación de las LDL-ox por los macrófagos, 6) Formación de las células espumosas, 7) Formación de la placa de ateroma, con la presencia de infiltraciones de VSMCs [Tomado y modificado de: Rodríguez y col., 2009].

La progresión del proceso aterosclerótico conlleva a la obstrucción parcial o total de la arteria. Si este evento se produce en alguna de las arterias principales que irrigan al órgano cardíaco, dejando al mismo privado de oxígeno y nutrientes para su funcionamiento y supervivencia, se produce la muerte de las células cardíacas, generándose un IAM, evento el cual puede conllevar como consecuencia última a la muerte del individuo.

2.1.4 Trombosis

La trombosis es un trastorno vascular que ocurre cuando se da la formación de un trombo, por efecto de la activación inapropiada del sistema hemostático, en que los procesos procoagulantes superan considerablemente los de tipo anticoagulante, provocando la obstrucción total o parcial del interior del vaso sanguíneo, ya sea una arteria o una vena (Quezada, 2001).

Al crecer el trombo o coágulo sanguíneo anormal, puede ocluir el vaso sanguíneo y provocar la muerte de los tejidos abastecidos por él. Además, puede desprenderse una porción del trombo (émbolo); y desplazarse por el torrente sanguíneo y alojarse en vasos de menor tamaño obstruyendo el flujo continuo de sangre, provocando un embolia o tromboembolia, causando la muerte del tejido (Mckenzie, 1999). Estos trombos se pueden desarrollar en arterias (trombosis arterial) y se caracterizan principalmente por presentar una coloración blanquecina debido a la presencia de células del sistema inmune como leucocitos y macrófagos, que se originan por la disfunción endotelial e interacción de este tejido con las plaquetas. Así, los trombos arteriales están constituidos principalmente por plaquetas y fibrina, pudiendo quedar también atrapados leucocitos y eritrocitos (Figura 4.A). En el caso de la formación de trombos en venas (trombosis venosa), estos se caracterizan por presentar un color rojizo, debido a la presencia de una gran cantidad de eritrocitos atrapados entre la red de plaquetas y fibrina (Figura 4.B).

La trombosis venosa que presenta significancia a nivel clínico se denomina Trombosis Venosa Profunda (TVP), la cual ocurre principalmente en las venas proximales de los miembros inferiores, y ocasionalmente, en los miembros superiores (Quezada, 2001). Las complicaciones principales de la TVP son las embolias o coágulos procedentes del

sistema venoso. En este sentido, los émbolos producidos en las venas profundas de los miembros inferiores, pueden desplazarse a través de las venas más grandes del cuerpo hasta llegar al corazón y alcanzar la circulación pulmonar, obstruyendo los vasos de este y causando un tromboembolismo pulmonar (TEP).

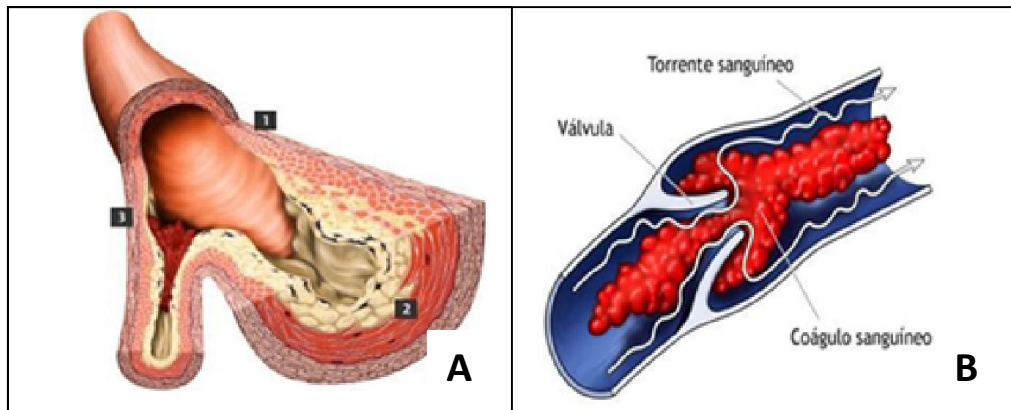


Figura 4. Representación gráfica de las diferencias entre un trombo arterial y un trombo venoso. A) Se observa un coágulo en una arteria, donde se indican a su vez 1) la pared arterial, 2) zona obstruida por la placa de ateroma, 3) zona obstruida por el coágulo haciendo más lento el flujo de sangre. B) Se observa un segmento de una vena en donde se está produciendo un coágulo de sangre alrededor de una válvula

[Tomado de: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/9326.htm].

2.2 Relación entre los procesos de coagulación sanguínea e inflamación

La respuesta inflamatoria, está altamente relacionada con la formación de la placa de ateroma y con la activación de la coagulación sanguínea. Al producirse la disfunción endotelial, se activa el sistema inmunológico y comienza la liberación de un gran número de citoquinas que favorecen la adhesión de los monocitos e incrementan el paso de estos al espacio subendotelial, permitiendo la formación de la placa de ateroma y conllevando al padecimiento de la aterosclerosis (Frostedgard, 2013). Debido a ello, existe una relación estrecha entre la respuesta inflamatoria y la coagulación sanguínea (Figura 5), producto a que la activación de la coagulación después de un daño endotelial, siempre viene acompañado de

una rápida activación de sistema inmune y junto a ésta, a una fuerte respuesta inflamatoria (Thijs, 2000).

Los mecanismos que conllevan a la coagulación y al proceso inflamatorio están regulados entre sí, ya que la liberación de determinadas proteínas que inducen inflamación, también promueven la coagulación sanguínea; otras proteínas pueden a su vez estimular los mecanismos de fibrinólisis, creándose así una red de regulación intrincada entre estos mecanismos fisiológicos (Figura 5) (Opal, 2003).

Los principales mediadores en los procesos de coagulación inducida por inflamación son las citoquinas pro-inflamatorias, siendo de gran importancia la interleuquina 6 (IL-6) en la iniciación de los procesos coagulantes, así como del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de la interleuquina 1 (IL-1) en la regulación de los procesos de coagulación y fibrinólisis (Figura 5). Otra proteína central en la interacción entre estos tres procesos (inflamación, coagulación y fibrinólisis) es el factor tisular (FT), proteína producida principalmente por las células endoteliales y que entra en contacto con la sangre circulante al momento de algún daño en el tejido, siendo esta proteína la principal iniciadora de los procesos coagulantes, culminando con la deposición de fibrina y formación del coágulo sanguíneo. Por su parte, la expresión del FT depende en gran medida de la producción de IL-6, adicional a ello, estas interleuquinas pro-inflamatorias están asociadas con la regulación negativa del receptor de la proteína C y la trombomodulina, siendo estas proteínas importantes factores anticoagulantes (Figura 5). De esta manera, se tiene que células inflamatorias van a modular la activación de los procesos inflamatorios y a su vez los de coagulación sanguínea, ya sea por inducción del proceso procoagulante o represión del proceso fibrinolítico (Figura 5) (de Levi y van der Poll, 2005).

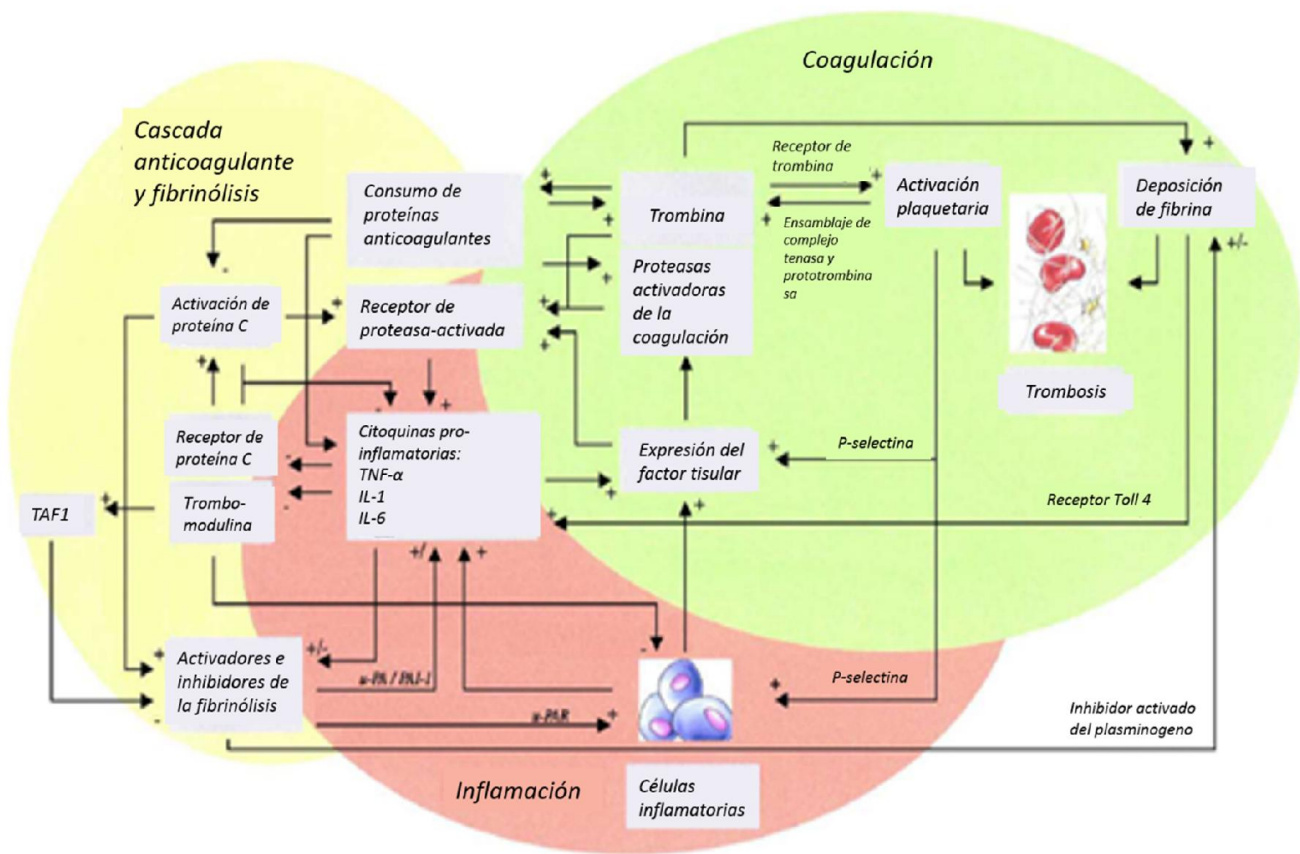


Figura 5. Relación entre los procesos de inflamación, coagulación y fibrinólisis. Se muestran las diferentes proteínas propias de cada uno de los tres procesos; así como su influencia ya sea activadora o inhibitoria sobre los otros [Tomado y modificado de: de Levi y van der Poll, 2005].

2.2.1 Hemostasia y proceso de coagulación sanguínea

La hemostasia es el proceso que permite la formación de la barrera contra la pérdida de sangre y que ello ocurra únicamente en el sitio de la lesión. La masa que forma esta barrera es conocida como tapón hemostático o coágulo sanguíneo, el cual se forma por la activación del proceso de coagulación sanguínea (Gaudens, 1984; McKenzie, 1999). Si el daño al vaso sanguíneo es producido únicamente en el interior de la pared, se activarán los mismos mecanismos, produciendo la misma masa sólida e insoluble, denominada trombo pero ahora en el interior del vaso, generándose una trombosis.

El proceso hemostático se produce en tres etapas principales denominadas: hemostasia primaria, hemostasia secundaria y fibrinólisis. En la hemostasia primaria, se da la interacción entre las plaquetas y el endotelio del vaso lesionado, formándose un tapón plaquetario o tapón hemostático primario, el cual sirve para detener temporalmente la hemorragia (Mckenzie, 1999). Una vez formado el tapón primario, comienzan a actuar una serie de proteínas plasmáticas, las cuales van a intervenir en la formación del coágulo y otras en la disolución del mismo. Así, las primeras proteínas van a contribuir a la deposición de fibrina sobre el tapón plaquetario primario, con lo que este se hace más fuerte y estable, para luego dar inicio a la segunda etapa de coagulación, conocida como hemostasia secundaria. Por último, aquellas proteínas que intervienen en la disolución del coágulo se van a ocupar de la última fase de la coagulación, denominada fibrinólisis (Gaudens, 1984).

Durante la segunda etapa de la coagulación, se van a activar diferentes proteínas que van a permitir la formación del coágulo insoluble. En los años 60 se había planteado un modelo de coagulación, denominado cascada de coagulación sanguínea, proceso según el cual, la acción secuencial de diferentes proteínas iban a conllevar a la transformación del fibrinógeno soluble a fibrina insoluble (Sword y Mann, 2000). Hoy en día, se ha planteado y aceptado un nuevo modelo denominado modelo celular de la coagulación, el cual explica que la coagulación ocurre, no por una serie de reacciones en cascada, sino en tres etapas superpuestas, en las cuales se enfatizan la importancia de receptores celulares específicos para las proteínas coagulantes (Hoffman y Monroe, 2001).

El modelo celular de la coagulación (Figura 6), se fundamenta en tres etapas, la primera conocida como iniciación, se lleva a cabo en las células portadoras del factor tisular (FT), y si el estímulo coagulante es suficientemente fuerte se inicia la generación de trombina por el complejo FT/Factor VIII (F7); además de activarse los factores V, IX y XI que van a iniciar la segunda etapa (Hoffman y Monroe, 2001). La segunda etapa, conocida como de amplificación, ocurre en la superficie plaquetaria, en donde, tras la activación de las plaquetas por la trombina generada en la fase de iniciación, se expresan en la superficie fosfolípidos de carga negativa, los cuales sirven de base para la activación del Factor X (F10) y una mayor síntesis de trombina; además, se da la activación del Factor VIII (F8) y de otros factores. Por último, en la fase de propagación, se da la formación del complejo F8a/F9a (complejo

“tenasa”) y el complejo F5a/F10a (complejo “protombinasa”), los cuales se ensamblan en la superficie de las plaquetas y se comienzan a generar altas cantidades de trombina, lo que resulta en la activación del fibrinógeno y polimerización de los monómeros de fibrina (Hoofman y Monroe, 2001; Carrillo y col., 2004). Seguida a la formación del tapón hemostático secundario a través de la deposición de fibrina, y el cumplimiento de su respectivo rol en la reparación del tejido dañado y restablecimiento del flujo sanguíneo, se activa un último mecanismo conocido como fibrinólisis, que llevará a cabo la disolución del coágulo y remoción de la fibrina que lo compone.

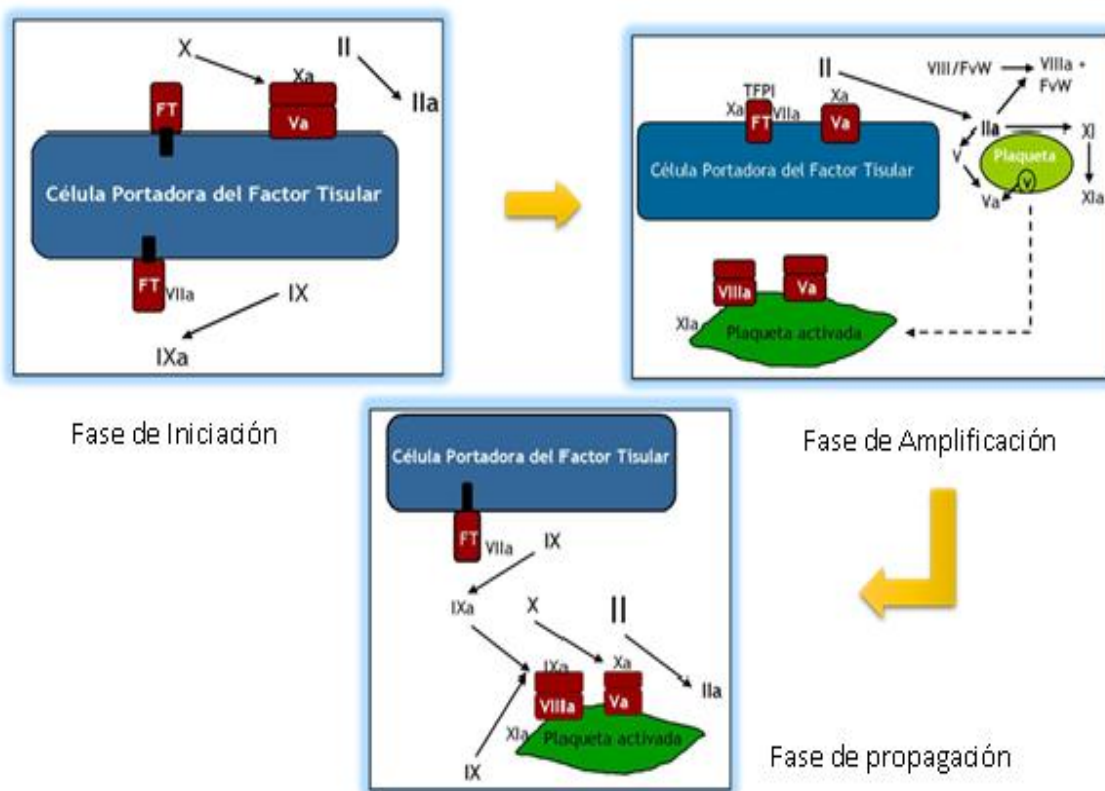


Figura 6. Modelo celular de la coagulación sanguínea. Se pueden distinguir las tres etapas del modelo de coagulación. En la fase de iniciación ocurre la unión del entre el FT y el F7, el cual genera la formación del F10 y F11. En la fase de amplificación se produce la activación plaquetaria y la activación de los factores 5,8 y 11 en la superficie de estas. Por último, en la fase de amplificación se da el ensamblaje de los complejo “tenasa” y “protombinasa”, activando así la secreción de trombina necesaria para la generación de fibrina [Tomado y modificado de: Hoffman, 2013].

2.2.2 Proceso de inflamación

La inflamación es una respuesta fisiológica a una variedad de estímulos como lo son infecciones o el daño a algún tejido. En general, una respuesta inflamatoria aguda ocurre de manera rápida y con una duración corta. La respuesta inflamatoria está generalmente acompañada por una respuesta sistémica del organismo, caracterizada por una alteración rápida de los niveles de varias proteínas plasmáticas. En algunas enfermedades, una respuesta inmune prolongada puede generar una respuesta inflamatoria crónica, que normalmente genera diferentes consecuencias patológicas (Goldsby y col., 2001).

En la respuesta inflamatoria se encuentran involucradas un gran número de proteínas, específicamente la familia de las quimioquinas y de las citoquinas (Tabla 1). Las quimioquinas son una superfamilia de pequeños polipéptidos, que usualmente están relacionados con los procesos de adhesión, quimiotaxis y activación de muchos tipos de leucocitos, por lo que son reguladores del tráfico leucocitario. Una gran variedad de tejidos, ya sean de tipo linfoide o no linfoide, son capaces de producir estas proteínas usualmente relacionados con la iniciación o progresión de la respuesta inflamatoria (Goldsby y col., 2001).

Tabla 1. Clasificación de quimioquinas y citoquinas

TIPO DE FAMILIA		PROTEÍNA	FUNCIÓN
Quimioquinas		IL-8	Atracción de neutrófilos
		β -trombomodulina	Inhibición de la coagulación
		GRO- α	Estímulo de quimiotaxis
		MCP-1	Atracción de monocitos
Citoquinas	Pro-inflamatorias	TNF- α	Inducción de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias
		IL-6	Activación de células inflamatorias
		IL-1	Inducción de la síntesis de moléculas de adhesión
	Anti-inflamatorias	IL-2	Inducción de la síntesis de interferón
		IL-4	Inhibición de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias
		IL-10	

Por su parte, las citoquinas son otra superfamilia de proteínas de bajo peso molecular con funciones del tipo reguladoras, las cuales pueden ser divididas en base a su función en el proceso inflamatorio como citoquinas anti-inflamatorias o citoquinas pro-inflamatorias. Una de las principales citoquinas anti-inflamatorias es la interluquina 10 (IL-10), la cual se encarga de mantener la respuesta inflamatoria controlada, para que la misma no genere daños adversos al organismo (Montoya, 2004). Por el contrario, las citoquinas pro-inflamatorias, inducen la activación de la respuesta inflamatoria, activando al sistema inmunológico y el endotelio vascular, aumentando así la permeabilidad vascular (Goldsby y col., 2001). Una de las principales citoquinas pro-inflamatorias es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de interés principal en este trabajo, el cual se describirá detalladamente más adelante.

2.3 Factores de riesgo asociados al desarrollo de las ECs

Las ECs son patologías de tipo multifactorial, que se producen por la interacción entre un gran número de factores. Éstos pueden ser de tipo no modificables, como lo son la edad, el sexo del individuo, su origen étnico; los de tipo ambientales o modificables como el tabaquismo, obesidad, sedentarismo y estrés. Por otra parte, se ha determinado que existe un componente genético asociado con un aumento del riesgo de padecer algunas de estas enfermedades.

2.3.1 Factores ambientales o modificables

Existen una gran cantidad de factores asociados con el desarrollo de las ECs que pueden ser adquiridos por el individuo a lo largo de su vida. Entre los más importantes se encuentran la hipertensión arterial (HTA), hiperlipidemia (altos niveles de colesterol total, colesterol del tipo LDL y bajos niveles del colesterol de tipo HDL), tabaquismo, diabetes *mellitus*, obesidad, sedentarismo, alcoholismo, entre otros. Estos factores producen diferentes efectos adversos en el organismo como la estimulación de procesos inflamatorios, la disminución en la disponibilidad del óxido nítrico (NO), la disfunción del endotelio, estrés oxidativo, aumento en los niveles de LDL y disminución en los niveles de HDL, entre otros; los cuales, en primera instancia, podrían llevar a un evento aterosclerótico, y como consecuencia clínica final el desarrollo de una trombosis (arterial o venosa), y en consecuencia a un IAM, ACV o TVP. Cabe destacar, que la aparición de estos factores puede darse individualmente o de manera simultánea, pero los mismos no son determinantes para el desarrollo de estas patologías. Ahora bien, la combinación de éstos con otros factores de riesgo como los de tipos genético, pueden aumentar significativamente el riesgo a padecer estas enfermedades (Mitchell y col., 1996).

2.3.2 Factores genéticos

Debido a que existen muchas enfermedades a las cuales no se les puede vincular completamente con la presencia de factores de tipos modificables o no modificables, así como a la presencia de algún organismo patogénico, el interés del hombre por el estudio del genoma humano ha crecido significativamente, con el fin de encontrar respuestas a diferentes interrogantes respecto al origen y desarrollo de diversas patologías. En los últimos años, el estudio de la genética humana ha dado grandes pasos, gracias al conocimiento, cada vez más profundo, de la secuencia del genoma humano; así como el desarrollo de técnicas cada vez más sofisticadas en el campo de la biología molecular. En la actualidad se han sugerido numerosos genes candidatos, en los cuales la presencia de diferentes alteraciones, o alelos de riesgo, pudieran estar relacionados, al menos en parte, con el desarrollo de las ECs. Esto ha sido atribuido, como ya se mencionó anteriormente, al hecho de que los factores de riesgo clásicos no son capaces de explicar más del 30-50 % de los casos con presencia de EC, y/o a la aparición de múltiples casos sin la presencia aparente de alguno de estos factores de riesgo denominados clásicos (Navarro, 2003).

En la última década numerosos estudios de tipo genético y clínico, han sido realizados con el fin de encontrar factores de riesgo genéticos, asociados a un aumento en la susceptibilidad genética individual, con los que se pueda comprender y determinar la fisiopatogénesis de estas enfermedades. Así, la cantidad de genes propuestos como candidatos es cada vez mayor, aunque en una gran parte de los casos, la relación entre variantes en estos genes con el desarrollo de la enfermedad aún no ha podido ser probada de manera contundente. Ello podría deberse a la diferencia existente entre las diversas poblaciones o por el limitado número de muestras para la realización de estos estudios en algunos de los casos (Ginsburg, 2005).

Entre los genes propuestos como candidatos para el desarrollo de la EC, cuyas alteraciones proteicas o enzimáticas pudieran estar asociados a la presencia de una variante genética y debido a la estrecha relación existente entre ambos procesos fisiológicos, se encuentran por un lado, aquellos genes que codifican para proteínas relacionadas con la coagulación sanguínea, cuyas alteraciones génicas estén asociadas a un estado de hipercoagulabilidad (factores de la coagulación: F5, F7 y el F1 o fibrinógeno, entre otros).

Por otro lado, se tienen los genes que codifican para proteínas inflamatorias, entre ellas, la interleuquina 6 (IL-6) o el TNF- α , cuyas alteraciones génicas pudiesen estar asociadas a una respuesta pro-inflamatoria exacerbada.

Entre las proteínas antes mencionadas y la de principal interés ente trabajo, se encuentra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), una citoquina pro-inflamatoria de gran importancia tanto para el progreso de los procesos ateroscleróticos como los mecanismos de coagulación sanguínea, por ser una de las citoquinas primarias en la respuesta inflamatoria (Dvorkin y col. 2010). Debido a ello, ha sido de gran interés, la búsqueda e identificación de variantes genéticas o polimorfismos (variación en la secuencia de ADN en un lugar determinado en más del 1 % de los individuos de una población) en el gen que codifica para esta proteína, cuyos alelos pudiesen estar asociados con un aumento en la producción de la misma en el individuo; y su relación con una respuesta inflamatoria exacerbada o crónica aumentando la susceptibilidad de desarrollo de enfermedad trombótica (Goldsby y col., 2001).

2.3.2.1 Polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El TNF- α , es una potente citoquina con un amplio rango de actividades pro-inflamatorias. Este factor es producido a partir de un precursor denominado TNF- α de transmembrana (tm-TNF), el cual se expresa en la superficie de la membrana celular de células del sistema inmune como los macrófagos y los linfocitos en su estado activado. El precursor tm-TNF, es un péptido formado por 233 aminoácidos (26 KDa), que luego de ser procesado por la enzima TACE (por sus siglas en inglés: *TNF- α –Converting Enzime*), da origen a la formación de una forma soluble del TNF- α (sTNF) formada por 157 aminoácidos (17 KDa) la cual va a unirse posteriormente a los receptores de TNF (TNF-R). Por su parte, la proteína SPPL2b (por sus siglas en inglés: *Signal Peptide Peptidase-Like 2b*), va a actuar liberando el resto intracelular del tm-TNF, siendo posteriormente translocado al núcleo, en donde servirá como mediador de la expresión de otras citoquinas. (Figura 7) (Horiuchi y col., 2010).

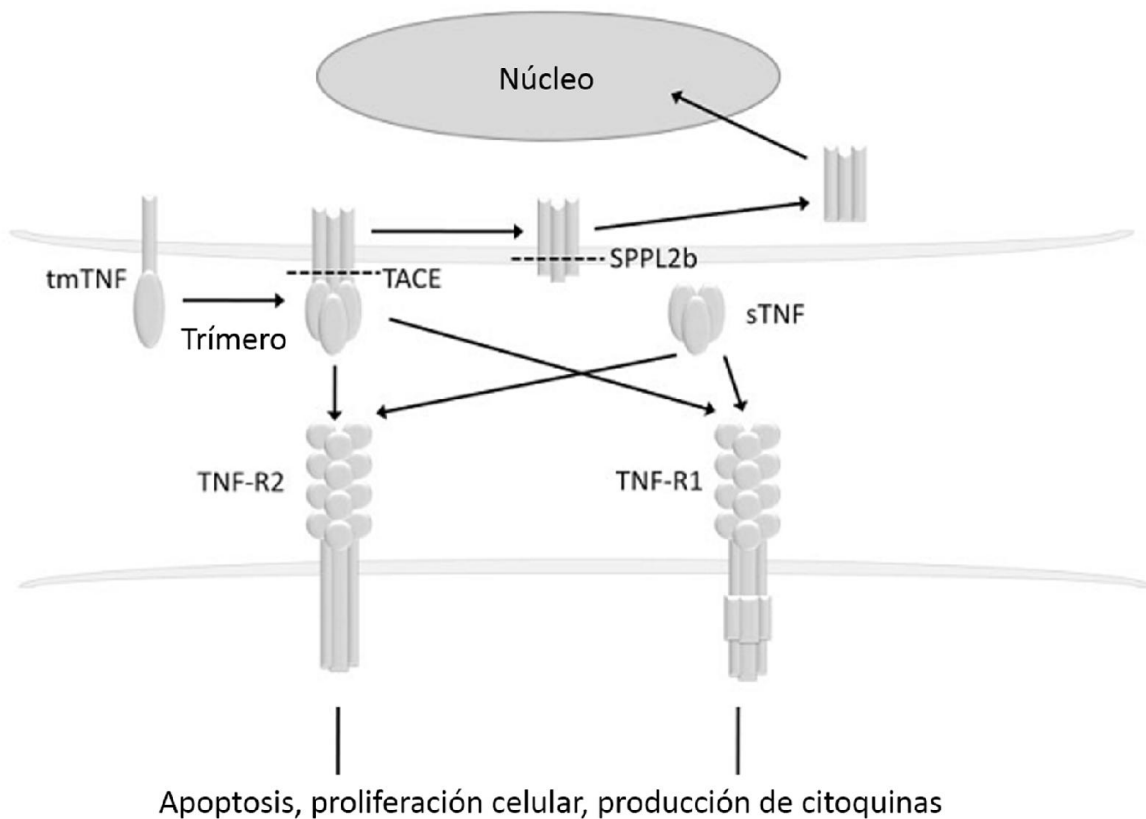


Figura 7. Proceso de formación del TNF- α . Formación del TNF- α soluble (sTNF) a partir de su precursor el TNF- α Transmembrana (tm-TNF), mediado por la proteína TACE (por sus siglas en inglés: *TNF- α -Converting Enzyme*). TNF-R1: Receptor de TNF de tipo 1; TNF-R2: Receptor de TNF de tipo 2; SPPL2b: Péptido de señal tipo peptidasa 2b [Tomada y modificada de: Horiuchi y col., 2010].

Con respecto a las funciones atribuidas a la citoquina pro-inflamatoria TNF- α se tiene la inducción de la apoptosis y proliferación celular; así como la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 2 (IL-2). Esta última función es llevada a cabo mediante la activación de una ruta de señalización celular de tipo MAPKKK (por sus siglas en inglés: *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase*) (Figura 8), la cual se inicia por la activación del receptor de TNF- α , y culmina en la liberación del factor transcripcional NF- κ B que inducirá la producción de un amplio grupo de otras citoquinas pro-inflamatorias (Lodishy col, 2005).

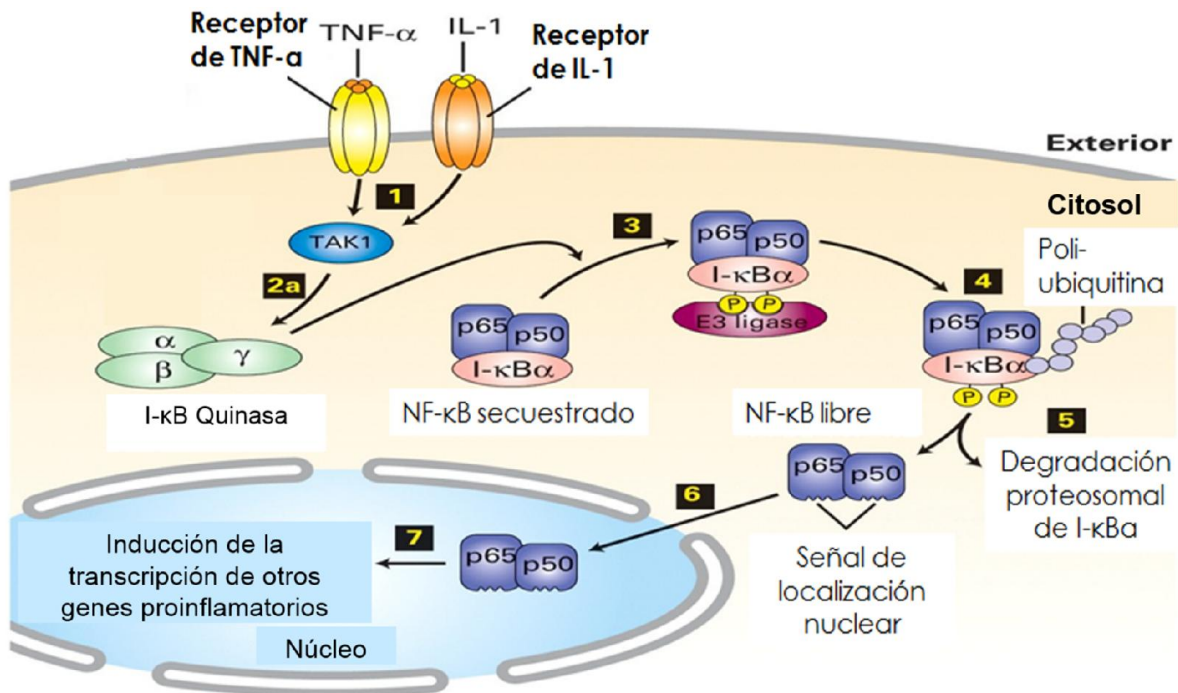


Figura 8. Ruta de Señalización celular- MAPKKK inducida por el TNF- α . Se distinguen los diferentes pasos que llevan a la liberación del factor NF- κ B inducido por TNF- α . Se detalla como la activación del receptor celular de TNF- α activa la proteína TAK1, que a su vez activa a la I- κ B quinasa. Una vez activada la I- κ B quinasa, ésta fosforila a I- κ B y promueve la unión de la enzima E3 ligasa. Posterior a ello, ocurre la ubiquitinación de I- κ B, marcando esta proteína para su degradación, liberándose así el sitio de localización nuclear de NF- κ B, con lo cual esta proteína puede ahora translocarse al núcleo y servir como factor transcripcional para diferentes genes [Lodish y col.,2005].

El gen *TNFA* que codifica para esta citoquina proinflamatoria, se encuentra ubicado en la región del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase III, en el cromosoma 6 (6p21,3) (Zhang y col., 2011). Diferentes alteraciones en este gen han sido asociadas a un incremento en los niveles transcripcionales de TNF- α y están relacionadas con un incremento en la respuesta inflamatoria y en consecuencia, al padecimiento de diferentes tipos de ECs como por ejemplo, el IAM, ACV y la trombosis. Diferentes polimorfismos han sido identificados en este gen, principalmente en la región promotora (Herrmann y col., 1998), dentro de los cuales uno de los más estudiados ha sido el ubicado en la posición -308 (código de referencia de GenBank: rs1800629), en donde se produce la transición de una guanina por una adenina en dicha posición (-308 G>A). Este polimorfismo fue reportado por primera vez por Wilson y colaboradores en 1992, partiendo del conocimiento de la secuencia completa de este gen previamente descrita en 1986

(Nedospasov y col., 1986). Una vez identificado este polimorfismo, se comenzaron a realizar diferentes estudios con el fin de determinar la relación de la variante alélica mutada para este polimorfismo con diferentes alelos de antígenos de leucocitos humanos (ALH), encontrándose así, una fuerte relación entre la presencia del alelo de riesgo para este polimorfismo (-308 A) y la expresión de diferentes alelos de ALH (Wilson y col., 1993). Posteriormente, en 1994 Alfonso y Richiardi, realizaron estudios adicionales en la secuencia de la región promotora del gen *TNFA*, con el fin de determinar variantes alélicas en diferentes sitios polimórficos asociados con la regulación de la expresión de este gen, identificando un sitio polimórfico adicional en la región estudiada ubicado en la posición -238, en donde se da el cambio de una guanina por una adenina (cuadro amarillo, Figura 9). Igualmente, estos investigadores identificaron nuevamente la variante polimórfica -308 G>A (cuadro rojo, Figura 9) previamente descrita por Wilson y colaboradores en 1992, de interés en este estudio.

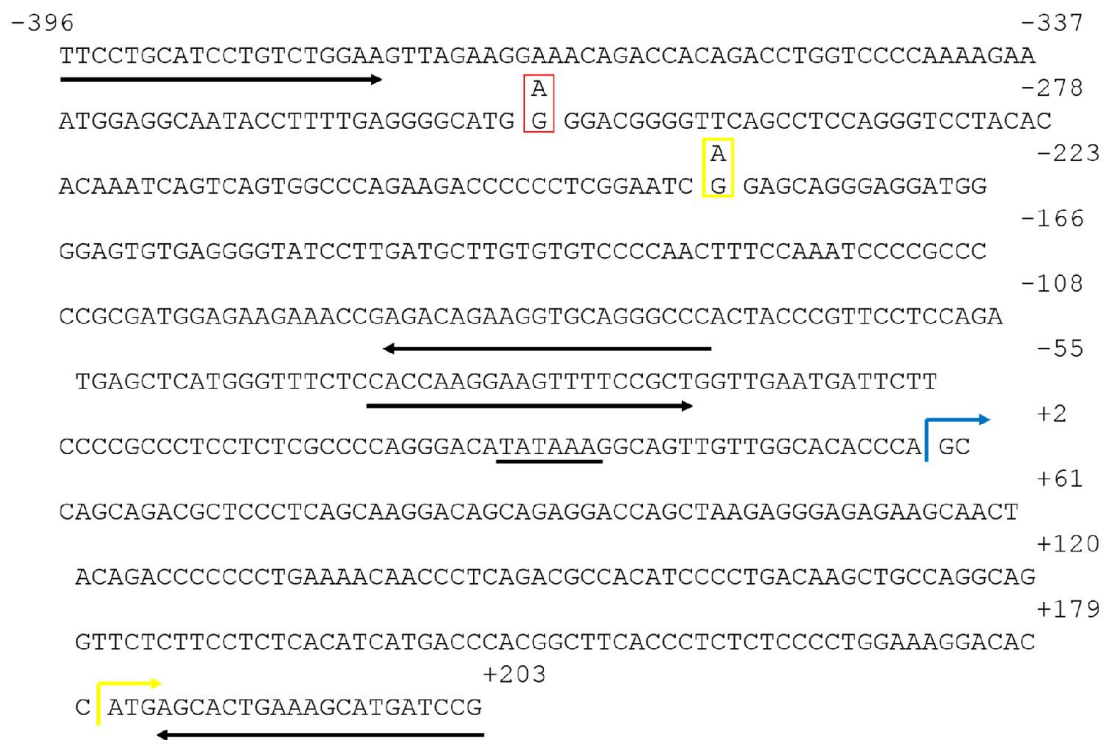


Figura 9. Análisis de la secuencia de un fragmento del gen *TNFA*. Se observa una parte de la secuencia del gen *TNFA*, el fragmento va desde la base -396 a la base +203 del gen. Flechas negras: cebadores, Flecha azul: sitio de inicio de la transcripción, flecha amarilla: sitio de inicio de la traducción (Codón ATG), Cuadro amarillo: sitio polimórfico -238 G>A, Cuadro rojo: sitio polimórfico -308 G>A. [Tomado y modificado de: Alfonso y Richiardi, 1994].

En la Figura 10, se observa la posición cromosómica del polimorfismo -308 G>A. En ella, se detalla la posición exacta del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el cromosoma (31.483.031 pb), igualmente se indican los diferentes polimorfismos identificados en el contexto cromosómico.

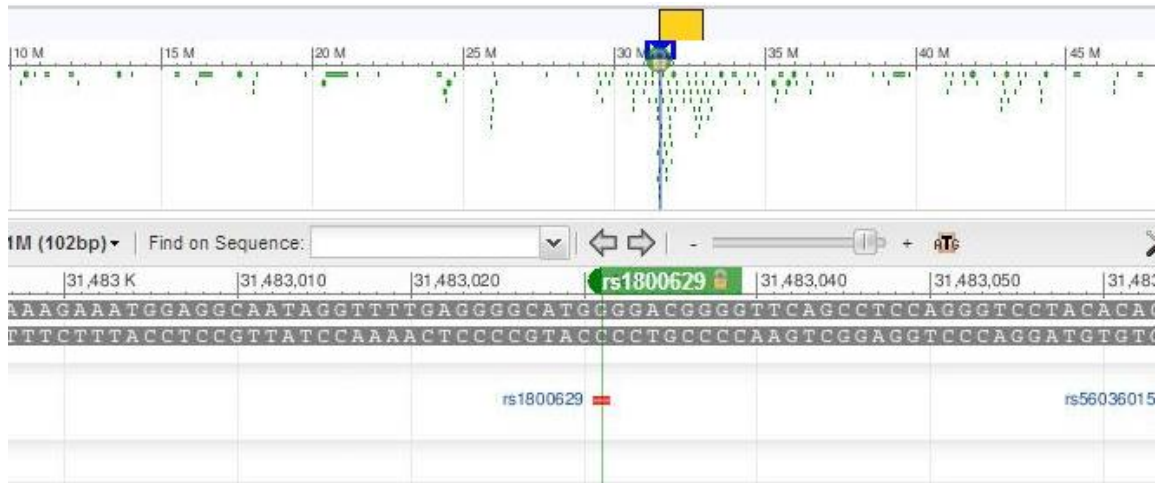


Figura 10. Posición cromosómica del polimorfismo -308 G>A. Se observa la ubicación del polimorfismo (rs1800629) estudiado con dos niveles de detalle. En la parte superior, se observa una vista más amplia del cromosoma, indicando otros polimorfismos identificados en el mismo. En la parte inferior de la figura, se observa con mayor detalle la ubicación del sitio polimórfico indicando la base normal -308G (línea verde) con el código de referencia del *SNP* en GenBank, además de su ubicación exacta en el cromosoma [Tomado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NT_007592.15?report=graph&db=nucleotide&v=31482980:31483080&content=5/7m=31483031!&mn=rs1800629].

Con respecto al efecto biológico asociado a esta variante polimórfica -308 G>A, se ha relacionado la presencia del alelo A en esta posición, con un aumento en los niveles transcripcionales del gen y mayor producción de TNF- α (Wilson y col., 1997). El mecanismo molecular por el cual la presencia de este polimorfismo conlleva a un aumento en la producción de TNF- α , ha sido relacionado con el hecho de que la presencia del alelo A (alelo mutado), genera un promotor más fuerte que en presencia del alelo G (alelo normal) (Wilson y col., 1997). Ello, fue demostrado por Wilson y colaboradores en 1997 mediante ensayos de transfección de linfocitos B con plásmidos portadores de una construcción que contenía un segmento de la secuencia del promotor de *TNFA* diferencial. Emplearon construcciones con cada uno de los alelos del polimorfismo, fusionado al gen que codifica para la proteína CAT (Cloranfenicol acetiltransferasa); y midieron los niveles producidos de la misma en presencia

de cada alelo. Estos investigadores, encontraron que en presencia del alelo A se generaba un aumento significativo en los niveles de la proteína CAT, indicando que este alelo produce un promotor más fuerte, sugiriendo un aumento en la actividad transcripcional (Wilson y col., 1997).

Adicionalmente, con el fin de determinar si existía una unión diferencial de factores transcripcionales en presencia de los diferentes alelos en la posición -308 de *TNFA*, este mismo grupo de investigadores realizó un ensayo de cambio en la movilidad electroforética, EMSA (por sus siglas en inglés: *Electrophoresis Mobility Shift Assay*) en presencia de extracto de proteínas nucleares. Sin embargo, los resultados no mostraron un patrón diferencial de alguna proteína en particular, sugiriendo estos autores que el cambio nucleotídico en la posición -308 de la región promotora proximal, pudiese conllevar es a un ligero cambio en la estructura de la cromatina, siendo esta zona más accesible para la maquinaria transcripcional y por ende, aumentando la tasa de transcripción del gen (Wilson y col., 1997)

Con el fin de responder a dicha interrogante, Knight y colaboradores en el 2003, diseñaron un estudio mediante la implementación de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina haplotipo específica, haploChIP (por sus siglas en inglés: *haplotype-specific Chromatin Immunoprecipitation*). Esta técnica consiste en la precipitación y posterior análisis de los fragmentos de ADN unidos a una proteína específica que se esté analizando y su cuantificación mediante espectrometría de masa. Ello, con el objetivo de determinar si existía una unión diferencial en cantidad de la ARN polimerasa II en presencia de los respectivos alelos en la posición -308 del gen *TNFA*, lo cual pudiese ser atribuido a un cambio estructural en la cromatina que hiciera más accesible a la maquinaria transcripcional en presencia del alelo -308A. Sin embargo, este estudio no evidenció una unión diferencial de la ARN polimerasa II (mayor o menos cantidad) en presencia de las diferentes variantes alélicas en dicha posición específica en el promotor (Knight y col., 2003)

Ahora bien, aunque aún el mecanismo molecular atribuido a la presencia de esta variante no está del todo claro, el genotipo para este polimorfismo sigue siendo altamente estudiado, con el fin de determinar su asociación con diferentes enfermedades.

Algunos de los estudios más ampliamente realizados han sido para investigar la asociación de la presencia de la variante alélica -308A de *TNFA* con el incremento en el

riesgo genético del desarrollo de EC. Uno de los primeros estudios en este sentido, fue el realizado por Brown y colaboradores en 1998, en donde se determinó la relación del alelo de riesgo para este polimorfismo con el desarrollo de tromboembolismo pulmonar (TEP) como fenotipo clínico, a partir de un muestra de 575 pacientes y 511 individuos controles. Estos autores observaron que en condición heterocigota de este polimorfismo se produce un incremento del 10 % en el riesgo de padecer esta patología. Por su parte, en un estudio de meta-análisis publicado más recientemente por Zhang y colaboradores en el 2012, el cual incluyó un total de 24 estudios del tipo caso-control de diferentes orígenes étnicos, obtuvieron un riesgo incrementado del 8 % de padecer un IAM en población asiática y del 50 % en el padecimiento de enfermedad coronaria del corazón en población caucásica, en presencia de la variante alélica -308A (alelo mutado) (Zhang y col., 2012).

Por otro lado, un estudio caso-control publicado recientemente por Chu y colaboradores en el 2012, el cual incluyó 535 pacientes con IAM y más de 1000 individuos controles, determinaron que la presencia del alelo de riesgo A (-308A) se encontró asociado a un incremento en el riesgo de padecer esta patología de un 70 % en una muestra de población asiática (Chu y col., 2012).

En este sentido, y debido al alto riesgo asociado a la presencia del alelo -308A en el gen *TNFA* con el desarrollo de ECs, y a la alta prevalencia de este alelo en la población caucásica, se propuso en este estudio, identificar el genotipo para este polimorfismo en una muestra de población venezolana, y establecer una posible asociación en el desarrollo de IAM, ACV y/o TVP; como diferentes manifestaciones clínicas de las ECs.

III. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECs) son la principal causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En Venezuela para el año 2010, se registraron cerca de 40.000 muertes producto de ECs, representando casi un 30 % del total muertes en el país (MPPS, 2012). Entre las diferentes manifestaciones de las ECs, el IAM es la principal causa de muerte, seguido por aquellas muertes ocasionadas por un ACV. Un importante porcentaje de muertes son debido a la presencia de un trombo embolismo pulmonar, originado en la mayoría de los casos, por una trombosis venosa profunda (TVP). Es por ello, que las patologías trombóticas son consideradas un grave problema de salud pública, tanto en Venezuela como en el resto del mundo.

Debido a la alta prevalencia e incidencia de las ECs, diferentes estudios se han abocado a la determinación de las causas genéticas y los mecanismos fisiopatogénicos de estas enfermedades, en conjunto con los factores de riesgo clásico atribuidos a las mismas. En este sentido, en la actualidad, numerosos genes han sido propuestos como candidatos, siendo el riesgo genético de padecer ECs atribuido en función del número de alelos de riesgo presentes en un determinado individuo, en relación a la identificación de diferentes sitios polimórficos (Keavney, 2002). En base a ello, se han diseñado novedosos y sofisticados métodos para poder predecir factores de riesgo genéticos relacionados al padecimiento de estas enfermedades, con el fin de comprender el riesgo que pueda tener la presencia de una única variante génica, o en el contexto poligénico.

De esta manera, debido al entendimiento de la EC como una enfermedad multifactorial, en la cual la génesis y desarrollo pudiese estar asociado a un importante componente genético, en el Laboratorio de Genética Molecular Humana B de la Universidad Simón Bolívar (USB), se realiza la identificación de diferentes polimorfismos en diversos genes candidatos, entre los cuales se incluye la identificación del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, debido a la importancia de la acción de la proteína TNF- α en la respuesta inflamatoria y su asociación con el desarrollo de las patologías trombóticas arteriales y/o venosa (Ej.: IAM, ACV y TVP), y poder explorar al menos en parte, el riesgo

atribuible a la presencia del alelo de riesgo A del polimorfismo -308, con el desarrollo de este tipo de enfermedades.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar el genotipo del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen de la citoquina pro-inflamatoria *TNFA* en pacientes que han sufrido Infarto agudo al miocardio (IAM), Accidente cerebrovascular (ACV) y/o trombosis venosa profunda (TVP), e individuos controles; e investigar su relación al desarrollo de estas patologías en población venezolana

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen que codifica para la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , en pacientes que han sufrido IAM, ACV y/o TVP y población control.
- Determinar si los alelos del polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en la población control.
- Calcular las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* en cada una de las poblaciones estudiadas.
- Estimar el cociente de probabilidades “OR” para calcular el riesgo atribuible a la presencia del alelo de riesgo A con el desarrollo de IAM, ACV y/o TVP como fenotipo clínico.
- Correlacionar la presencia de otros factores de riesgo: edad, sexo, hipertensión, diabetes *mellitus* y hábito tabáquico con el desarrollo de IAM, ACV y/o TVP.
- Determinar el riesgo asociado al desarrollo de IAM, ACV y TVP en presencia de la coexistencia de los alelos de riesgo presentes en los polimorfismos 20210 G>A (rs1799963) en el gen que codifica para el Factor II y c.1691 G>A (rs6025) en el gen para el Factor V, ambos relacionados con la coagulación sanguínea; y el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Características de la población estudiada

Con el fin de correlacionar el genotipo para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) del gen *TNFA* con el desarrollo de diferentes manifestaciones clínicas de las ECs, en este trabajo se realizó un estudio del tipo caso-control en población venezolana, con pacientes diagnosticados con IAM, ACV y/o TVP y un grupo de individuos controles.

5.1.1 Población de pacientes o casos:

Para la población de pacientes o casos, se incluyeron un total de 273 pacientes clasificados en: 100 pacientes de ambos sexos residentes en Venezuela, mayores de 18 años, sobrevivientes de un IAM, 73 pacientes sobrevivientes de un ACV isquémico y 100 pacientes sobrevivientes de una TVP. Para el caso particular de los pacientes infartados, estas muestras de sangre fueron suministradas por el Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo, durante el período comprendido entre mayo de 2007 hasta diciembre del 2009; en un estudio enmarcado dentro del proyecto “Influencia genética en el desarrollo de patologías aterotrombóticas en la población de Venezuela”. Para el caso particular de las muestras de los pacientes con TVP y ACV, estas fueron suministradas por el Banco Metropolitano de Sangre (BMS), durante el período comprendido entre febrero 2005 y julio 2007; en un estudio enmarcado como parte del proyecto multicéntrico “Diagnóstico molecular de polimorfismos genéticos asociados a Trombosis Arterial y Venosa”.

5.1.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años, de ambos sexos, que hayan dado consentimiento escrito de ingresar al estudio (anexo 1).
- Pacientes quienes hayan sido diagnosticados con la enfermedad (IAM, ACV y/o TVP) mediante la evaluación de los síntomas clínicos característicos para cada uno de ellos. Para el caso de IAM fue mediante confirmación de un aumento transitorio en dos veces la concentración sobre el límite superior de las enzimas cardíacas y

cambios electrográficos; según los criterios publicados por el comité de Redefinición de Infarto del Miocardio de la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología de julio 1999. Para el caso de ACV, ello fue confirmado mediante el análisis de una tomografía computarizada o ensayo angiográfico. Por ultimo, para el caso de TVP se certificó mediante ultrasonido doppler o ensayo angiográfico.

5.1.1.2 Criterios de exclusión

- Pacientes en quienes se sospechó la presencia de un IAM, ACV y/o TVP por las manifestaciones clínicas aparentes, pero que no se pudo corroborar el diagnóstico mediante métodos clínicos, bioquímicos y electrocardiográficos.
- Pacientes que no autorizaron su ingreso al estudio.

5.1.2 Población de individuos controles:

Se seleccionaron aleatoriamente un grupo de 100 individuos controles residentes en Venezuela, sin presentar relaciones filiales entre ellos, quienes manifestaron ausencia de síntomas cardiovasculares, así como también la ausencia de antecedentes de historia familiar de EC. Dichos controles fueron recolectados de diferentes centros de referencia nacional, entre ellos: El Banco de Sangre del Hospital Miguel Pérez Carreño, Banco de Sangre del Hospital Metropolitano de Caracas, pacientes de Servicio Médico de IVIC, Banco de Sangre del Servicio de Investigaciones Endocrinológicas del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo y donantes voluntarios de la comunidad de la Universidad Simón Bolívar.

5.1.2.1 Criterios de inclusión:

- Individuos mayores de 18 años, de ambos sexos, que hayan dado consentimiento escrito de ingresar al estudio (anexo 1).

- Fueron incluidos individuos que presentaron otras condiciones patológicas o factores de riesgo como la presencia de diabetes *mellitus*, HTA, hábito tabáquico, entre otras; siempre y cuando se tuviera pleno conocimiento del mismo.
- Fueron incluidos individuos que estuviesen bajo cualquier tipo de tratamiento ya sea uso de anticonceptivos orales (ACO), aspirina, hipolipemiantes, antihipertensivos, entre otros; siempre y cuando se tuviera pleno conocimiento del mismo.

5.1.2.2 Criterios de Exclusión:

- Individuos en quienes se sospeche algún síndrome coronario agudo.
- Individuos con presencia de antecedentes de historia familiar de EC (IAM, ACV, o enfermedad vascular periférica).
- Individuos que recibieron tratamiento antihipertensivo o hipolipemiante antes de la toma de la muestra, en el caso particular de la realización de las determinaciones bioquímicas respectivas.
- Individuos que no autorizaron su ingreso al estudio.

5.2 Obtención de las muestras

A través de la técnica de venopunción se recolectó una muestra de sangre periférica total (10 mL) en tubos citratados o con EDTA, la cual fue distribuida en varias alícuotas para su posterior traslado a los diferentes centros según fuera la determinación a realizar. Una vez centrifugada la muestra en frío, se tomó el plasma y se almacenó a -70 °C (determinaciones bioquímicas) y el paquete globular a -20 °C (determinaciones moleculares).

5.2.1 Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular Humana B de la Universidad Simón Bolívar, tanto de las muestras provenientes del grupo de pacientes como del grupo control. Estas muestras fueron procesadas según el plan de trabajo general mostrado en la Figura 11. El análisis molecular se realizó a partir de las muestras de

ADN genómico ya aisladas previamente en el laboratorio, y sólo se realizó el aislamiento del ADN genómico de las muestras que lo requirieron.

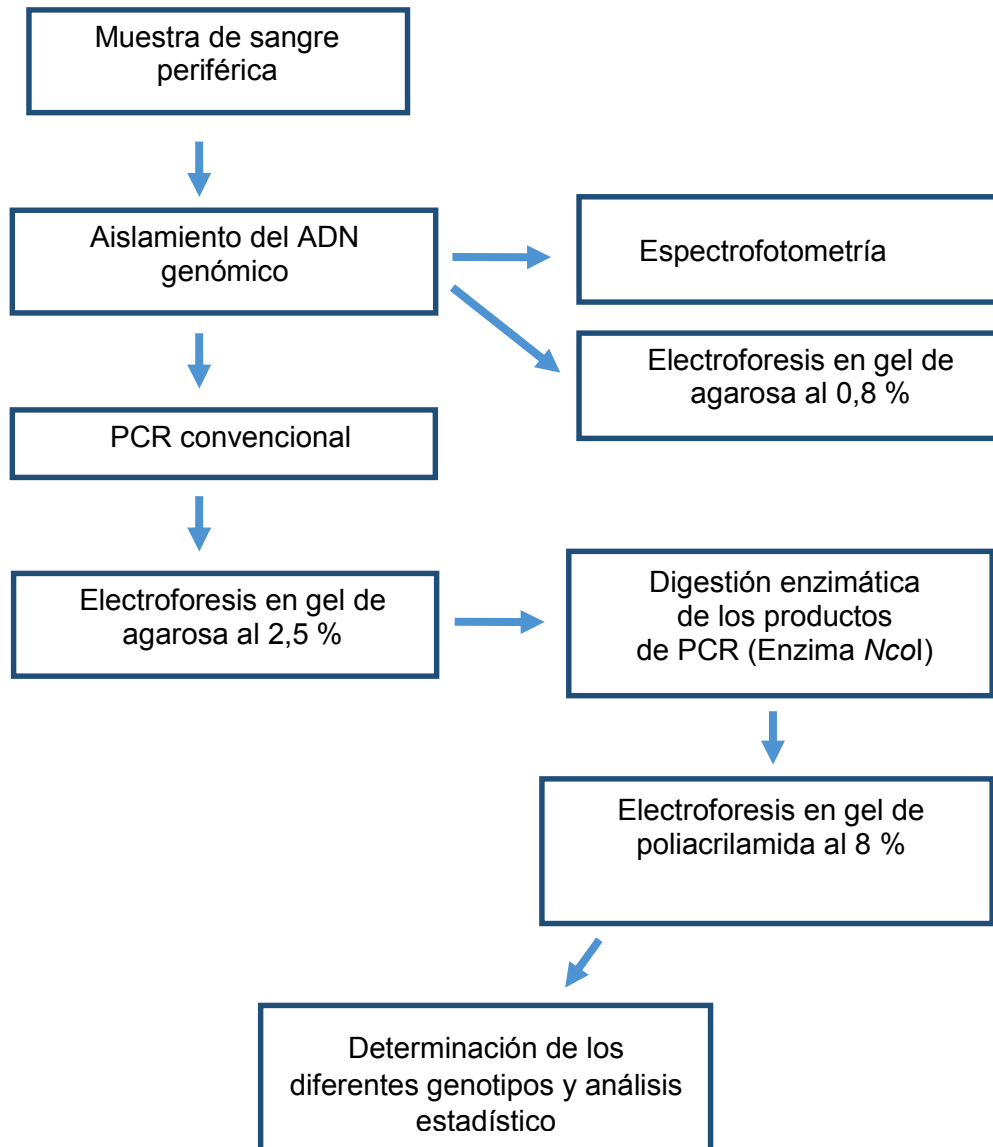


Figura 11. Plan de trabajo general para el análisis molecular del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*.

5.2.1.1 Extracción del ADN genómico a partir de sangre periférica total.

El aislamiento del ADN genómico se realizó a partir de una muestra de sangre periférica total de los pacientes e individuos controles. Las muestras de sangre recolectadas en tubos con EDTA (7,5 mM) se mantienen conservadas a -20 °C para futuros usos. A partir de estas muestras de sangre periférica se realizó el aislamiento del ADN genómico mediante el protocolo modificado de Bowen y Keeney (2003). Se inició agregando 700 µL de sangre fresca o previamente descongelada en un tubo eppendorf de 1,5 mL, al cual se le agregaron 700 µL de buffer de Lisis Celular (Tris-HCl 10 mM pH 8, Sacarosa 11 % p/v, MgCl₂ 5 mM, Triton X-100 1% v/v) y se mezcló brevemente en el *vortex*. La mezcla se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, para luego centrifugar la misma por 5 minutos a 2000 g. Seguido a ello, se descartó el sobrenadante y se le agregaron 500 µL de buffer de lisis celular, mezclando en el *vortex* y centrifugando la mezcla nuevamente por 2 min a 2000 g. Se descartó el sobrenadante y se agregó al sedimento 300 µL de buffer de lisis nuclear y se resuspendió el mismo con el uso de una micropipeta (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 10 mM, Citrato de Sodio 10 mM y SDS 1 %). Luego, se agregó a esta mezcla 100 µL de NaCl (5,3 M) y 500 µL de cloroformo y se mezcló por inversión hasta tener una emulsión uniforme, la cual se centrifugó por 5 min a 2000 g. Posteriormente, se tomaron 350 µL de la fase acuosa (superior) y se mezclaron con 700 µL de etanol absoluto frío, mezclando por inversión suavemente hasta observar la formación de una malla blanca de ADN, centrifugando posteriormente por 10 min a 12000 g. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el etanol completamente. Por último, se agregó al ADN precipitado entre 100 µL y 300 µL de agua desionizada dependiendo del rendimiento en el aislamiento de cada muestra.

5.2.1.2 Comprobación de integridad y cuantificación del ADN genómico extraído.

Luego de realizado el aislamiento del ADN genómico, se procedió a la comprobación de la integridad a través de electroforesis en geles de agarosa 0,8 %. Para ello, el ADN genómico se mezcló con un buffer de carga 1X (glicerol 5 %; azul de bromofenol 0,04 %; xilencianol 0,04 %) y se cargó en un gel de agarosa al 0,8 % en presencia de buffer TAE 0,5X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM), el cual contiene SYBR-safe 1X (compuesto fluorescente) (Sambrook y col., 2001). La corrida se llevó a cabo empleando una cámara de

electroforesis horizontal “Easy Cast™” a un voltaje constante de 100 V durante 15-20 minutos. La visualización de las bandas de ADN se realizó a través de fluorescencia indirecta, utilizando un transiluminador a 320 nm, acoplado con una cámara digital con la cual se realizó el registro fotográfico y visualización.

Posteriormente, se realizó la cuantificación del ADN aislado espectrofotométricamente. Se realizó una dilución 1/200 de la muestra de ADN obtenida y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro *BioPhotometer* (Eppendorf), a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, para poder determinar las concentraciones de ADN y proteínas respectivamente en cada muestra. Luego, se determinó la relación A_{260}/A_{280} para poder determinar la pureza del ADN extraído. Para poder determinar la concentración de ADN extraído se tomó como factor de conversión, para una unidad de absorbancia a 260 nm una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ referido a ADN doble cadena (Sambrook y col., 2001). Luego de haber comprobado estos parámetros, se procedió a preparar una solución de trabajo de ADN para la posterior amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de 60 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

5.2.1.3 Amplificación por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de los fragmentos de interés.

Para la detección del genotipo del polimorfismo -308 G>A ubicado en la región promotora del gen que codifica para la proteína TNF- α , se procedió a la amplificación de un fragmento de 107 pb contentivo del sitio polimórfico. Con este fin, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) bajo las siguientes condiciones: ADN genómico 6 $\text{ng}/\mu\text{L}$, Buffer 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 59 mM), MgCl_2 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 1 μM de cada oligonucleótido o cebador (5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' (*sentido mutagénico*, C: base mutada) y 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' (*antisentido*) (Wilson y col., 1992), 0,05 U/ μL de Taq ADN polimerasa (*GoTaq DNA polymerase*) y agua desionizada para un volumen final de 20 μL . La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el programa mostrado en la Tabla 2, con una repetición de 30 ciclos.

Tabla 2. Condiciones óptimas de la reacción en cadena de la polimerasa.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	40 s	30
Hibridación	62	40 s	
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	5 min	1

Según la secuencia del gen *TNFA* de referencia proporcionada por el centro nacional de información biotecnológica (NCBI; NG_007462.1), se encontró una ligera diferencia en la posición nucleotídica de este polimorfismo, con respecto a la reportada clásicamente (-308), lo cual es debido a una diferencia en la posición del sitio de inicio de la transcripción reportado por Alfonso y Richiardi en 1994, y el reportado actualmente en la base de datos de NCBI. En este sentido, según la secuencia reportada por NCBI, el sitio de inicio de la transcripción está ubicado 5 bases nitrogenadas por delante del identificado anteriormente por los autores antes mencionados (Flecha azul, Figura 12), ubicando al sitio polimórfico en la posición -313 de la región promotora del gen, y no en la posición -308. En el fragmento de secuencia del gen mostrado en la Figura 12, se indica la posición donde hibridan los cebadores descritos anteriormente, acotando un fragmento de 107 pb. Igualmente se identifica la base polimórfica y el sitio de unión de la enzima de restricción la cual se empleará posteriormente para el genotipaje.

```

4561 tctgaagccctcccagttctagttctatcttttctcgcacccctgtctggaagttagaa
4621 ggaaacagaccacagacctggtcccccagaaatggaggcaataggttttqagggcat
4681 ggagcggggttcagcctccaggtcctacacacaaatcagtcagtgccagagacc
4741 ccctcggaaatcggagcagggaggaatggggagtgtaggggtatccttgatgcttgtgtg
4801 ccccaactttccaaatccccgccccgcgatggagaagaaaccgagacagaaggtgcagg
4861 gccactaccgcttccctccagatgagctcatgggtttctccaccaaggaagtttccgct
4921 ggttgaatgattctttccccgcccctcctctcgccccaggacatataaaggcagttgtg
4981 gcacaccagccagagacgctccctcagcaaggacagcagaggaccagctaagagggag
5041 agaagcaactacagacccccctgaaaacaaccctcagacgccacatccccctgacaagct
5101 gccaggcaggttctctctcctctcacatactgacccacggctccaccctctctccccctgga
5161 aaggacccatgagcaactgaaagcatgatccgggacgtggagctggccgaggaggcctc
5221 cccaagaagacaggggggccccagggctccagggcgtgcttgttccctcagcctcttctcc

```

Figura 12. Fragmento de la secuencia actual del gen *TNFA* (NG007462.1). Se observa un fragmento del gen *TNFA*, conformado por parte de la región promotora proximal y parte del gen estructural. Cuadro amarillo: Sitio de inicio de la traducción (Codón ATG); Cuadro Azul: Sitio de inicio de la transcripción; Secuencias con doble subrayado: Sitios de anclaje para los cebadores en la PCR; Cuadro morado: Secuencia de reconocimiento de la enzima *NcoI*, dentro se indica la base polimórfica G en color amarillo [Tomado y modificado: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007462.1].

5.2.1.4 Ensayo de restricción enzimática (RFLP)

Una vez obtenidos los fragmentos amplificados por PCR se procedió a la detección del polimorfismo -308 G>A del gen *TNFA*, a través de un ensayo de restricción enzimática, utilizando la enzima de restricción *NcoI*. La reacción enzimática se realizó bajo las siguientes condiciones: buffer 1X, albumina sérica bovina (BSA) 0,1 mg/mL, *NcoI* 0,25 U/μL, agua desionizada y producto de PCR para un volumen final de 5 μL.

El fragmento amplificado presenta un único sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NcoI* (5'-CCATGG-3'), secuencia la cual por la acción del cebador mutagénico y en presencia del alelo normal G estará presente (cuadro morado, Figura 13), y por lo tanto, se generará el corte enzimático. En este sentido, en presencia de un genotipo homocigoto normal (GG) se observarán dos fragmentos, uno de 87 pb y otro de 20 pb (Figura 13). Por su parte, en presencia del alelo de riesgo en forma homocigota (AA), no se producirá el corte de las hebras de ADN, obteniéndose así un fragmento único de 107 pb de igual tamaño al producto amplificado por PCR (Figura 13). Por último, si el individuo presenta una condición heterocigota (GA), se observará un patrón de bandas de restricción combinado, observándose un fragmento de 107 pb, uno de 87 pb y otro de 20 pb (Figura 13).

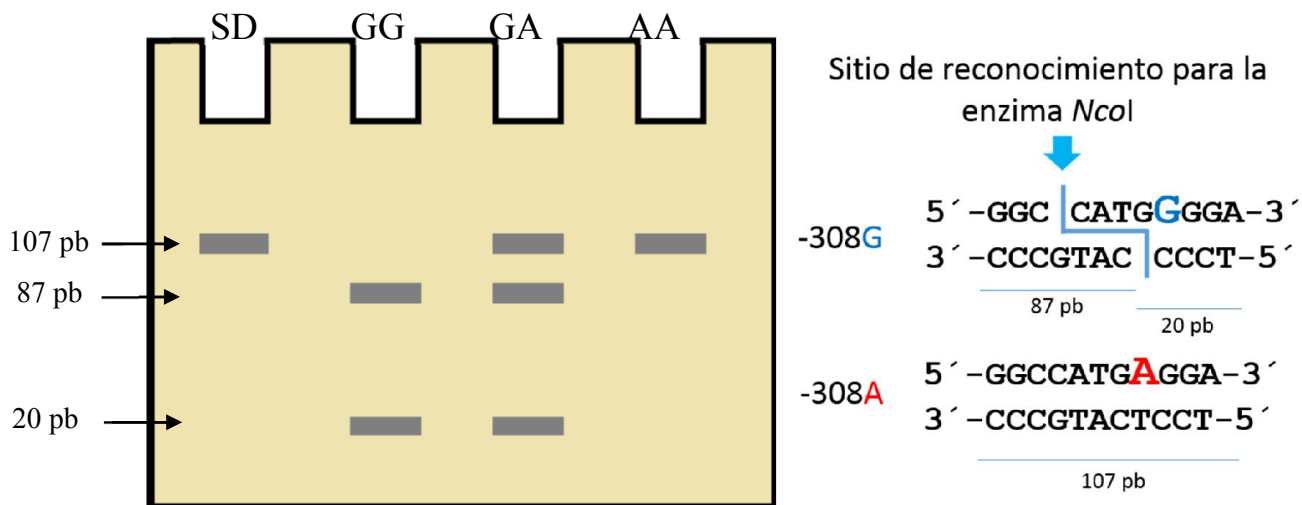


Figura 13. Patrón de restricción del fragmento de PCR de 107 pb contenido del sitio polimórfico -308 G>A al ser digerido con la enzima *NcoI*. SD: producto sin digerir, GG: homocigoto normal, GA: heterocigoto, AA: homocigoto mutado.

5.2.1.5 Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

Los productos obtenidos a partir de la digestión enzimática con la enzima *NcoI* fueron corridos en geles de poliacrilamida al 8 % para la observación del patrón de restricción. Los fragmentos de restricción fueron mezclados en primer lugar con buffer de carga 1 X (Glicerol 5 %, Azul de Bromofenol 0,04 %, Xilencyanol 0,04 %), y posteriormente cargados en un gel de poliacrilamida al 8 % (Persulfato de Amonio o APS 0,04 %, Acrilamida-bisacrilamida 8 %, 5 µL de TEMED y buffer TAE 1X, para un volumen final de 5 mL en una solución de buffer TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM), según Sambrook y colaboradores (2001). Para la realización de la corrida electroforética, se utilizó una cámara Termo EC120 (*Mini Vertical Gel System*) a 150 V y 25 mA por 30 minutos. Previo a la carga de las muestras se realizó una pre-corrída del gel por 10 minutos.

Para el proceso de tinción y revelado del gel, se utilizó el protocolo de revelado de geles con nitrato de plata (AgNO_3), según Brandt y colaboradores (1992). Este protocolo consiste en el uso de tres soluciones: Solución fijadora (ácido acético glacial 0,5 %), una solución de impregnación (Nitrato de plata 0,15 %) y una solución reveladora (200 µL de formaldehído 37 % e hidróxido de sodio 1,5 %). En primer lugar, se sumergió el gel en 50 mL de solución fijadora y se dejó por 15 minutos con agitación constante y un mínimo de tres lavados con agua desionizada. Una vez transcurrido este tiempo, se sumergió el gel en

50 mL de solución de impregnación por 15 minutos con agitación, y se realizó un nuevo lavado de gel con agua desionizada. Por último, se sumergió el gel en 50 mL de solución reveladora y se agregaron 200 µL de formaldehído 37 % y se agitó el gel suavemente, hasta observar la aparición de las bandas y se realizó un último lavado. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz blanca y posteriormente, se procedió al registro fotografico del gel, para su análisis e interpretación de los genotipos.

5.3 Análisis Estadístico

Se realizaron los cálculos de porcentaje, promedio y desviación estándar, según fue el caso, de los parámetros mencionados a continuación: edad, el porcentaje de hombres y mujeres presentes en el estudio, el porcentaje de individuos hipertensos, diabéticos y fumadores en cada uno de los grupos de estudio (IAM, ACV, TVP y controles).

Se realizó el cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*. En el caso de la población control se determinó si esta se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg con respecto a dicho sitio polimórfico, mediante la realización de la prueba χ^2 con una significancia de 0,05 con el fin de constatar si la distribución de los alelos (G y A) en esta población es debida al azar, para luego poder realizar los diferentes análisis de asociación.

Conocidos estos valores, se procedió al cálculo del cociente de razón de proporción “Odds Ratio” (OR), como una medida de estimación del riesgo atribuible a la presencia del alelo de riesgo A para padecer la enfermedad (IAM, ACV y/o TVP). Se entiende por el Odds de un evento A, como el cociente entre la probabilidad de que el evento ocurra y que no ocurra, definiéndose como:

$$\text{Odds (A)} = P(\text{ocurra A})/P(\text{no ocurra A}) = P(A)/1-P(A)$$

De tal manera que el OR, va a corresponder al cociente del “Odds” de un evento A y el “Odds” de un evento B:

$$\text{OR} = \text{Odds(A)}/\text{Odds(B)}$$

Teniendo así, que una valor de OR igual a 1, sugiere que la probabilidad que ocurra el evento A es igual a que ocurra el evento B; si el OR es mayor a 1, la probabilidad de que ocurra el evento A será mayor a la del B y viceversa. Así, el OR es una medida epidemiológica, que permite determinar el grado de asociación entre una condición y diferentes variables explicativas; medida que determina el riesgo de cada variable en una data caso-control. Para la realización de los cálculos de OR se utilizó el programa estadístico PAST distribuido gratuitamente bajo los términos de la licencia GNU (Free Software Foundation) y disponible en la web.

Se realizó un análisis de correlación multivariable entre el IAM, ACV y/o TVP como variable dependiente (o variable de respuesta), y las variables independientes: edad, sexo, hábito tabáquico, hipertensión, diabetes *mellitus*, y la presencia de los genotipos para el polimorfismo estudiado; como variables explicativas mediante un análisis de regresión de logística binaria. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SPSS de IBM.

VI. RESULTADOS

6.1 Características de las poblaciones estudiadas.

En la presente investigación se realizó un estudio caso-control, el cual consistió en la determinación del genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el en *TNFA*, y su relación con el padecimiento del IAM, ACV y TVP. Para ello, se analizaron un total de 100 muestras de pacientes diagnosticados con IAM, 73 muestras de pacientes diagnosticados con ACV, 100 muestras de pacientes diagnosticados con TVP; así como, 100 muestras de individuos.

En la Tabla 3 se muestra la media (variables continuas) y el porcentaje de presencia (variables categóricas), para varios parámetros clínicos y características generales recopilados para la población total de los grupos estudiados. Se puede observar que el grupo de pacientes con IAM presentó la mayor edad promedio ($60,3 \pm 12,3$ años), en comparación con los otros tres grupos de estudio con edades promedio similares. Así mismo, el grupo de pacientes con IAM presentó los mayores porcentajes de hipertensión arterial, diabetes *mellitus* y hábito tabáquico (73,2; 30,11 y 47,31 %, respectivamente).

Tabla 3. Características generales de las poblaciones estudiadas.

Variables	Pacientes IAM (n=100)	Pacientes TVP (n=100)	Pacientes ACV (n=73)	Controles (n=100)
Edad ($X \pm SD$ años)	60,3 \pm 12,3	39,19 \pm 15,33	33,44 \pm 14,62	39,89 \pm 14,3
Sexo Masculino (%)	74,49	21,43	26,8	45,24
Sexo Femenino (%)	25,51	78,57	73,19	54,76
Presencia de Hipertensión Arterial (%)	73,196	9,375	10,29	17,28
Presencia de Diabetes <i>Mellitus</i> (%)	30,11	1,03	1,05	0
Presencia de Hábito Tabáquico (%)	47,31	23,71	10,41	27,94

Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión logística binaria, con el fin de determinar la asociación de cada uno de los parámetros descritos (Tabla 4), con el desarrollo de cada una de las enfermedades estudiadas, observándose una correlación

positiva de la edad con el padecimiento de IAM y TVP, así como una correlación positiva entre las variables sexo masculino y la hipertensión arterial con el desarrollo de IAM

Tabla 4. Asociación de diferentes características poblaciones con las 3 patologías de estudio.

Variables	<i>p</i>-valor	Asociación con IAM	<i>p</i>-valor	Asociación con ACV	<i>p</i>-valor	Asociación con TVP
Edad	<i>p</i> <0,05	Asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> <0,05	Asociado
Sexo Masculino	<i>p</i> <0,05	Asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado
Sexo Femenino	<i>p</i> <0,05	Asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado
Hipertensión arterial (HTA)	<i>p</i> <0,05	Asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado
Diabetes mellitus	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado
Hábito Tabáquico	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado	<i>p</i> >0,05	No asociado

6.2 Extracción del ADN genómico (ADNg) a partir de sangre periférica total.

Con el fin de poder realizar el análisis molecular del polimorfismo estudiado y la relación del genotipo con el padecimiento de IAM, ACV y TVP, se procedió en primer lugar al aislamiento del ADN genómico (ADNg) a partir de las muestras de sangre de los individuos incluidos en el estudio, tal como fue descrito en la sección materiales y métodos. Para la comprobación de la integridad del ADNg aislado, se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 0,8 %. En la Figura 14 se presenta el registro fotográfico de la corrida electroforética obtenida para cinco muestras de ADNg provenientes de pacientes diagnosticados para las tres patologías evaluadas, en donde se puede identificar en cada caso, una única banda de alto peso molecular, indicando la obtención de un material genético de buen rendimiento y calidad.



Figura 14. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8 % del ADN_g extraído a partir de muestras de sangre de 5 pacientes. Carriles 1-5 muestras I181, I180, T001, T002 y A001 respectivamente. M: marcado de 1 Kb, I: grupo de pacientes con IAM, T: grupo de pacientes con TVP, A: grupo de pacientes con ACV.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación y determinación de la pureza del ADN_g extraído mediante ensayo de espectrofotometría. Los valores promedios y desviación estándar de la concentración y pureza para los cuatro grupos de estudio se encuentran resumidos en la Tabla 5. Se pudo observar que los valores de concentración estuvieron en un rango de entre 78,67 y 274,86 ug/mL, y el rango de valores de pureza entre 1,29 y 1,88, valores que nos indican un buen rendimiento y cantidad de extracción de ADN_g.

Tabla 5. Promedio y desviación estándar de los valores de concentración y pureza del ADN_g extraído para los grupos de estudio.

EC	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Pureza
IAM	274,86 \pm 126,47	1,71 \pm 0,19
ACV	182,23 \pm 142,27	1,29 \pm 1,21
TVP	78,67 \pm 43,60	1,87 \pm 0,12
Controles	230,34 \pm 96,78	1,88 \pm 0,27

6.3 Determinación del genotipo para el polimorfismo -308G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* mediante la técnica de PCR-RFLP.

Una vez determinada la integridad, concentración y pureza del ADNg extraído de las muestras en estudio, se procedió a la amplificación por PCR del fragmento de interés de 107 pb contentivo del sitio polimórfico -308 G>A en el gen *TNFA*, mediante la utilización de cebadores específicos (sección 5.2.1.3, materiales y métodos). En la Figura 15 se observa el resultado de la corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5 % de los productos de PCR obtenidos de 6 muestras, donde se verificó la presencia de un amplificado del tamaño esperado.

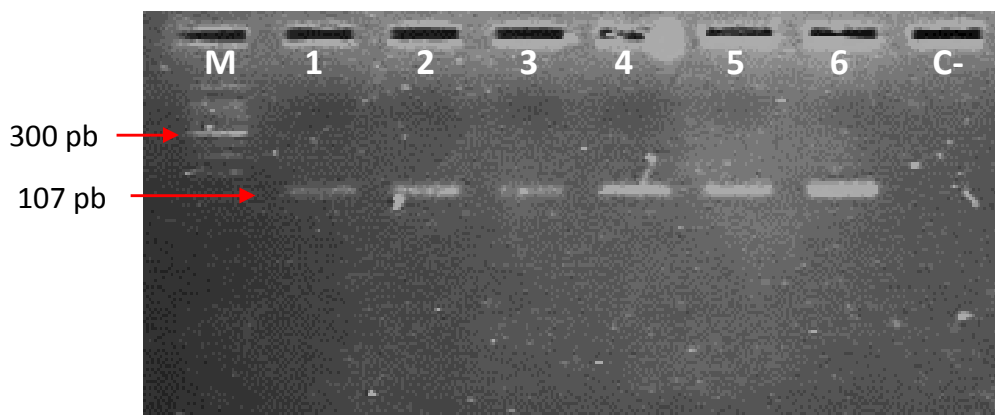


Figura 15. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5 % de los productos de PCR contentivos del sitio polimórfico -308 G>A en el gen *TNFA*. Carriles 1 y 2: muestra pacientes IAM (I181 y I180); Carriles 2 y 3: muestra pacientes TVP (T001 y T002); Carriles 5 y 6: muestra pacientes ACV (A001 y A002); M: Marcador 100 pb; C-: Control negativo.

Realizada la amplificación del fragmento de interés contentivo de la variante polimórfica en cada uno de las muestras de los individuos pertenecientes a los diferentes grupos de estudio, se procedió al análisis por longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante la digestión con la enzima de restricción *NcoI* (Sección 5.2.1.4, materiales y métodos). En el fragmento amplificado, en presencia del alelo normal G (Guanina) en la posición -308 del gen, se presenta la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *NcoI*, lo cual genera dos fragmentos de restricción enzimática, uno de 87 pb y otro

de 20 pb. Por el contrario, en presencia de del alelo mutante A (Adenina) en la posición -308, el sitio de reconocimiento para esta enzima se pierde, por lo que no se produce la escisión obteniéndose así, un único fragmento de 107 pb igual al producto amplificado por PCR (Figura 13, materiales y métodos).

En la Figura 16, se muestra el registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 8 % del análisis de RFLP de 3 muestras provenientes de pacientes, en donde se evidencian los genotipos posibles: el genotipo homocigoto para el alelo normal, GG (carril 1), el genotipo heterocigoto GA (Carril 2) y el genotipo homocigoto para el alelo mutado A, AA (Carril 3). Adicionalmente, se observa como control positivo, el resultado del ensayo de RFLP para una muestra de genotipo conocido GA (C_{GA}); los cuales permitieron corroborar los resultados para las muestras.

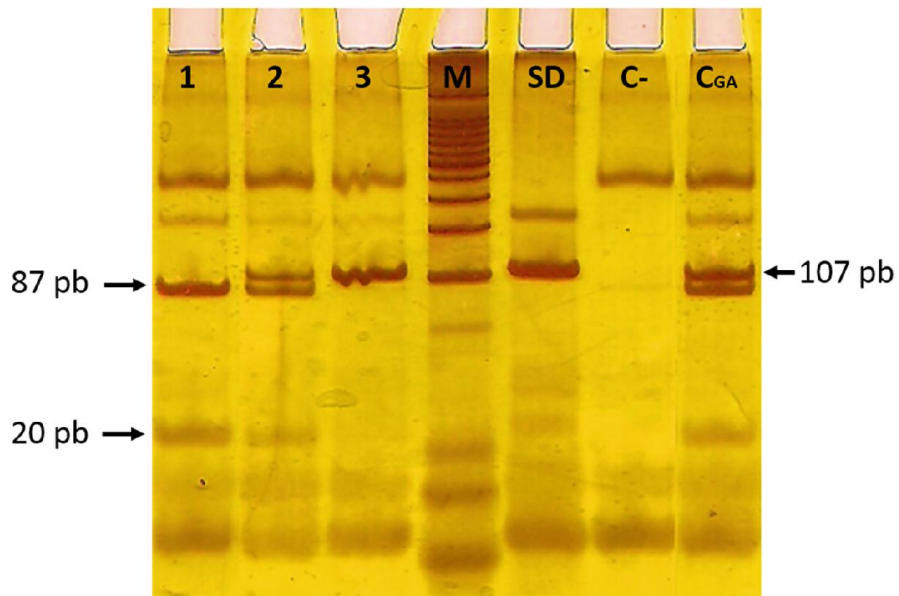


Figura 16. Registro fotográfico de la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 8 % de los productos de la RFLP contentivos del sitio polimórfico -308 G>A en el gen *TNFA*. Carril 1: paciente con TVP (T001); Carril 2: paciente con ACV (A024); Carril 3: paciente con IAM (I0.65); M: marcador 100 pb; SD: producto PCR; C-: Control negativo; C_{GA} : control positivo heterocigoto (GA).

Además, con el fin de corroborar los resultados y eficiencia de la técnica de diagnóstico implementada, se procedió a la realización del análisis de secuenciación de 2

muestras al azar, genotipificadas como homocigoto GG y heterocigoto GA para el polimorfismo -308 G>A, por PCR-RFLP. En la figura 16 se observan los resultados de la secuenciación y el posterior análisis *in silico* de las dos muestras analizadas.

En la figura 17 parte A, se muestra el estudio comparativo del análisis de secuencia del caso GG y la determinación de su genotipo aparente mediante la técnica de PCR-RFLP (izquierda). Así, según el resultado de la secuenciación (arriba-derecha) se indica el sitio polimórfico (recuadro rojo) observándose un único pico representativo de la base guanina (G): Igualmente, se representa el análisis de multialineamiento (abajo-derecha) realizado entre la secuencia obtenida del fragmento analizado y la secuencia consenso, observando que no existen diferencia entre estas.

Por su parte, en la figura 17 parte B, se representan los resultados obtenidos para el caso heterocigoto GA. Se observa, en el electroferograma obtenido por secuenciación (arriba-derecha) la presencia de dos picos indicativos de las bases guanina (G) y adenina (A), en la posición del sitio polimórfico. Estos resultados demostraron por ende, que la aplicación de la técnica PCR-RFLP para la genotipificación del polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*, permite discriminar entre los dos alelos y en consecuencia la determinación de los diferentes genotipos del polimorfismo.

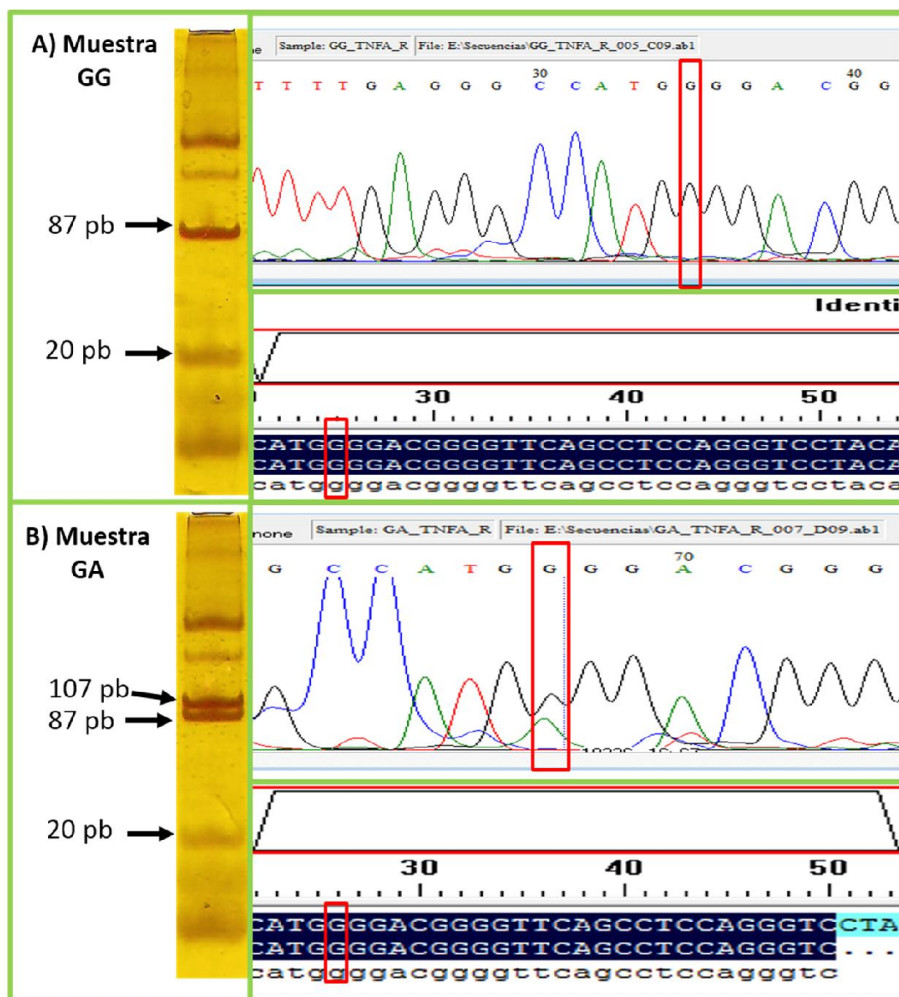


Figura 17. Análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR-RFLP y de secuenciación para la genotipificación del polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*. A) Muestra GG, comprobada mediante ambas técnicas. B) Muestra GA, comprobada mediante ambas técnicas.

6.4 Distribución de los genotipos obtenidos para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en los diferentes grupos de estudio.

Una vez identificado el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el total de muestras consideradas en este estudio (100 controles, 100 pacientes IAM, 73 pacientes ACV y 100 pacientes TVP), se determinó la distribución de los diferentes genotipos en cada uno de los grupos de pacientes, en comparación con la obtenida en el grupo de individuos controles. En la Figura 18, se observa la distribución de los genotipos en el grupo de muestras pertenecientes al grupo de pacientes sobrevivientes de un IAM en comparación con el grupo

control. Se pudo observar que ambos grupos de estudio presentaron el genotipo homocigoto GG en mayor porcentaje, siendo mayor dentro del grupo control (87 % vs. 71,15 %, Figura 18). Con respecto al genotipo heterocigoto GA se pudo apreciar un mayor porcentaje en el grupo de pacientes (25 % vs. 13 %). Por último, con respecto al genotipo homocigoto para el alelo mutado A (AA), este únicamente se detectó dentro del grupo de pacientes con IAM (3,85 %, Figura 18). De esta manera, se observó que los genotipos portadores del alelo de riesgo -308A se encontraron en mayor porcentaje dentro del grupo de pacientes.

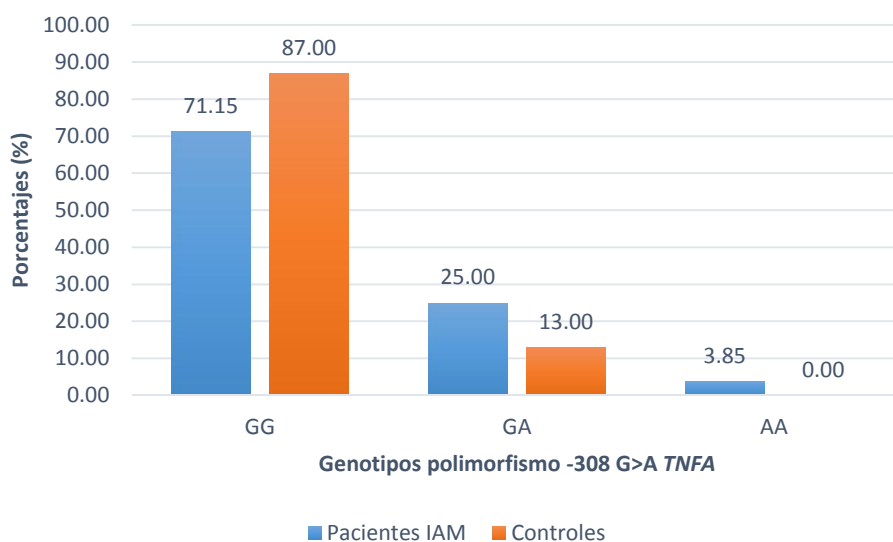


Figura 18. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con IAM según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*.

Por su parte, en la Figura 19, se puede apreciar la distribución de los tres genotipos en el grupo de pacientes con TVP en comparación con el grupo control. Se pudo observar con respecto a los genotipos portadores del alelo de riesgo A, que ambos grupos presentaron un porcentaje similar de individuos portadores del genotipo heterocigoto GA (14 % pacientes vs. 13% controles). Con respecto al genotipo homocigoto mutado (AA), únicamente fue detectado este genotipo en dos pacientes con TVP y ninguno dentro del grupo control.

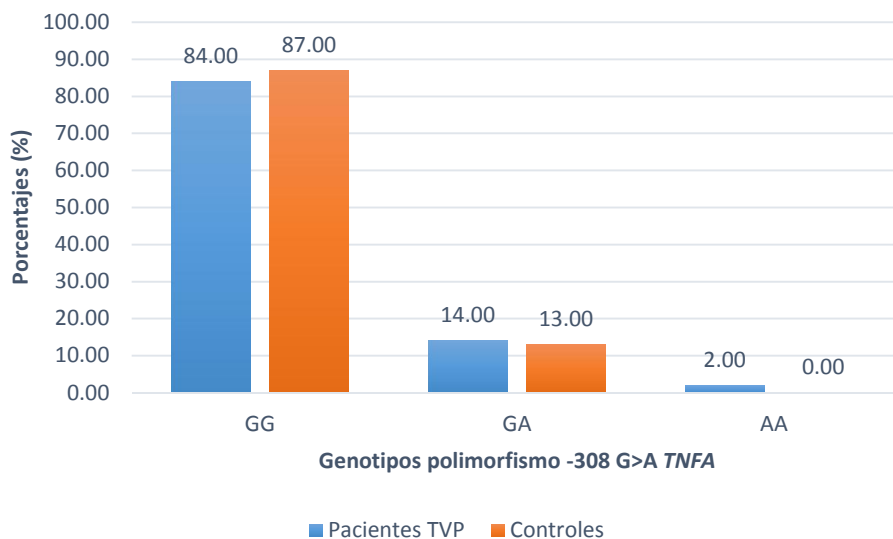


Figura 19. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con TVP según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*.

Por último, igualmente que en los grupos anteriores, se realizó la comparación entre la distribución de los diferentes genotipos considerando el grupo de pacientes con ACV y el grupo de individuos control (Figura 20). Se pudo apreciar, que la mayoría de los pacientes presentaron un genotipo homocigoto para el alelo normal GG, en un porcentaje ligeramente menor al compararlo al grupo control (84 % vs. 87 %). Por su parte, con respecto a los individuos portadores del genotipo heterocigoto, se determinó una distribución similar entre ambos grupos (13 % pacientes vs. 14 % controles); resultados que fueron similares a los observados en el grupo de pacientes con TVP vs. controles (Figura 20). Por último, a diferencia del grupo de pacientes con TVP, no se detectaron pacientes portadores del genotipo homocigoto mutado AA dentro de este grupo.

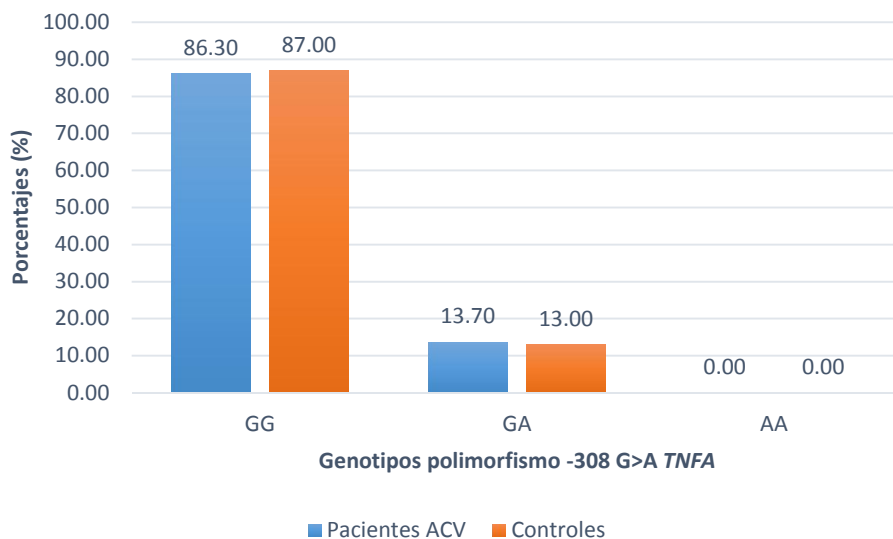


Figura 20. Composición y comparación de la población de controles y pacientes con ACV según el genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*.

6.5 Evaluación del Equilibrio Herdy-Weinberg (H-W).

Una vez realizada la determinación de los diferentes genotipos para el polimorfismo -308 G>A en el *TNFA* en los 4 grupos de estudio, se procedió a evaluar si la población de individuos controles correspondía a una muestra representativa de la población general, en base al cumplimiento o no del postulado del equilibrio de Herdy-Weinberg; ello con el fin de poder realizar posibles asociaciones entre la presencia del alelo de riesgo para este polimorfismo y el desarrollo de las tres patologías evaluadas. Para ello, se determinó la prueba de χ^2 , obteniéndose como resultado que la probabilidad de que las diferencias entre los valores observados y esperados se deba al azar para cada uno de los alelos (G: normal y A: mutado) del polimorfismo evaluado, estuvo entre un 45-50 %, correspondiente a un valor de $\chi^2=0,485$, valor el cual fue estadísticamente significativo (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis del equilibrio H-W para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*.

Gen	SNP	χ^2 Calculado	χ^2 Crítico	Probabilidad
<i>TNFA</i>	-308 G>A (rs1800629)	0,485	3,8415*	45-50 %

6.6 Determinación de las frecuencias genotípicas, alélicas y Odds Ratio (OR).

Llevado a cabo la determinación del genotipo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* en el total de los grupos estudiadas (100 pacientes IAM, 73 pacientes ACV, 100 pacientes TVP y 100 controles), se procedió al cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas, así como el cálculo del cociente de OR (*Odds Ratio*, Razón de probabilidad) como se indica en la Tabla 7.

Con respecto a las frecuencias alélicas obtenidas, se observó que la frecuencia del alelo de riesgo -308A resultó ser mayor en el grupo de pacientes evaluados, al ser comparado con el valor resultante en el grupo control. Entre ellos, la mayor frecuencia obtenida para el alelo de riesgo -308A se obtuvo para el grupo de pacientes con IAM, seguido por el grupo de pacientes con TVP y ACV respectivamente (0,163 (IAM); 0,090 (TVP); 0,068 (ACV) y 0,065 (control)); (Tabla 7).

Con el fin de determinar posibles asociaciones con respecto a la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de cada una de las tres patologías estudiadas, se realizó la determinación del cociente OR (Sección 5.3, materiales y métodos. Para ello, se consideró la suma de los individuos portadores del alelo de riesgo, ya sea en condición homocigota o heterocigota tanto en el grupo de pacientes como en los individuos portadores de este alelo en el grupo control ($OR_{PAC-X+AR/CTRL+AR}$, X: tipo de patología). El valor obtenido de este cociente, permite determinar el riesgo atribuido a los individuos en presencia de este alelo, a una mayor o menor predisposición a alguna de estas patologías (Tabla 7).

En este sentido, se determinó que en todos los casos la presencia del alelo de riesgo -308A, generó un aumento en el riesgo de predisposición a padecer cualquiera de las patologías estudiadas (Tabla 7). En el caso particular del riesgo asociado al desarrollo de

TVP, se encontró un incremento en el riesgo del 27 % (OR=1,275; $p>0,05$), aunque dicho valor no fue estadísticamente significativo. Por su parte, el riesgo asociado con el desarrollo de ACV, fue del 6,2 % (OR=1,062; $p>0,05$). No obstante, para el caso de la estimación de riesgo asociado al desarrollo de IAM, se observó un incremento de casi tres veces en el riesgo de padecer esta enfermedad en presencia del alelo -308A, valor que fue estadísticamente significativo (OR=2,713, $p<0,05$) (Tabla 7). Adicionalmente, con el fin de determinar la asociación del alelo de riesgo para este polimorfismo con el desarrollo de hipertensión (HTA), se realizó un nuevo cálculo de OR en donde, se dividió los grupos (controles y pacientes IAM) en hipertensos y no hipertensos, obteniéndose un incremento en el riesgo de desarrollo de HTA de 2,5 veces estadísticamente significativo, valor cercano al obtenido para el desarrollo de IAM (OR=2,504, $p<0,05$; Tabla 7)). Estos resultados indican una fuerte asociación del alelo de riesgo para este polimorfismo con el desarrollo de HTA e IAM.

Tabla 7. Tabla resumen de las frecuencias genotípicas, alélicas y valores del cociente OR para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* en los diferentes grupos de estudio.

EC	Frecuencias genotípicas			Frecuencias alélicas		
	Genotipo	Controles	Pacientes	Alelo	Controles	Pacientes
IAM	GG	0,870	0,712	G	0,935 (0,930-0,938)	0,836 (0,829-0,843)
	GA	0,130	0,250	A (AR)	0,065 (0,060-0,069)	0,163 (0,156-0,170)
	AA	0	0,038			
	OR_{PAC-IAM + AR/CTRL + AR} = 2,713 (1,319-5,579 IC 95%; $p<0,05$)^{ES}					
OR_{PAC-HTA + AR/CTRL + AR} = 2,504 (1,157-5,421 IC 95 %; $p<0,05$)^{ES}						
TVP	GG	0,870	0,840	G	0,935 (0,930-0,938)	0,910 (0,904-0,915)
	GA	0,130	0,140	A (AR)	0,065 (0,060-0,069)	0,090 (0,084-0,095)
	AA	0	0,020			
	OR_{PAC-TVP + AR/CTRL + AR} = 1,275 (0,578-2,811 IC 95%; $p>0,05$)					
OR_{PAC-HTA + AR/CTRL + AR} = 1,005 (0,274-3,692 IC 95 %; $p>0,05$)						
ACV	GG	0,870	0,863	G	0,935 (0,930-0,938)	0,932 (0,925-0,938)
	GA	0,130	0,137	A (AR)	0,065 (0,060-0,069)	0,068 (0,062-0,075)
	AA	0	0			
	OR_{PAC-ACV + AR/CTRL + AR} = 1,062 (0,438-2,576 IC 95%; $p>0,05$)					
OR_{PAC-HTA + AR/CTRL + AR} = 1,002 (0,3545-5,195 IC 95 %; $p>0,05$)						

Abreviaturas: AR; alelo de riesgo, OR; Odds Ratio, IC; intervalo de confianza, ES; estadísticamente significativo.

De esta forma, a manera de resumen, en base a los resultados obtenidos, se pudo observar una tendencia en el aumento en el riesgo de padecer un IAM, ACV y TVP en presencia del alelo de riesgo -308A para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*. Esto, es sugerido ya que los valores de OR obtenidos para las 3 patologías estudiadas, se mantuvo por encima de 1 para cualquiera de los casos, indicando un aumento en la probabilidad de riesgo de padecer estas enfermedades (Figura 21). Resultó especialmente interesante, el aumento, estadísticamente significativo, de casi tres veces el riesgo de desarrollar IAM en presencia del alelo de riesgo -308A (Figura 21), sugiriendo a este alelo como un marcador genético a considerar, al estudiar el perfil genético de riesgo cardiovascular en individuos susceptibles.

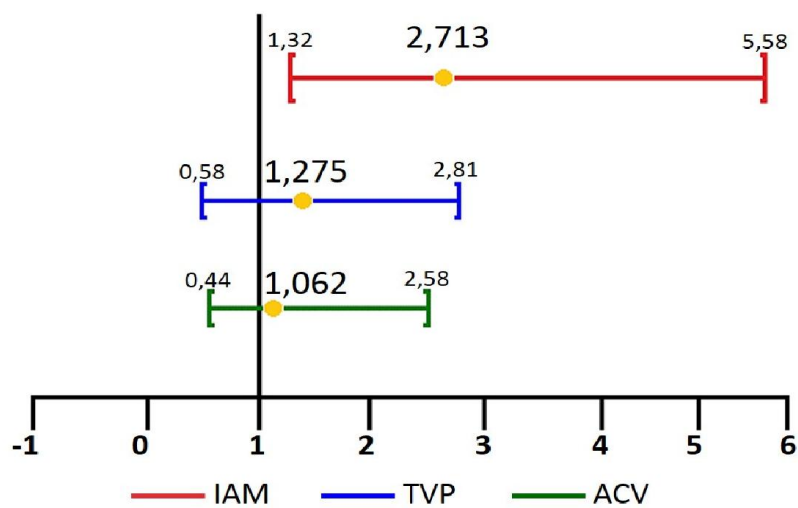


Figura 21. Representación gráfica de los ORs obtenidos para las tres patologías estudiadas con respecto a la presencia del AR para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*.

6.7 Efecto aditivo de la combinación del alelo de riesgo -308A en el gen *TNFA* y diferentes alelos de riesgo procoagulantes.

Finalmente, con el fin de evaluar el efecto en el riesgo de desarrollo de IAM, ACV y/o TVP, en presencia de la coexistencia de múltiples alelos de riesgo en un mismo individuo, se realizó el análisis del efecto aditivo para tres alelos de riesgo referentes a tres *SNPs* en genes diferentes: el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*, realizado en

el presente estudio relacionado con un aumento en los niveles de TNF- α , el polimorfismo 20210 G>A (rs1799963) en el gen que codifica para el F2 o protrombina de la coagulación sanguínea asociado con un aumento en los niveles del F2 y el polimorfismo c.1691 G>A (rs6025) en el gen que codifica para el F5 de la coagulación sanguínea, relacionado con mayores niveles del F5 producto de una mayor resistencia a la inactivación por parte de la proteína C activada (anticoagulante natural) (Tabla 8). Cabe la pena destacar que los últimos dos polimorfismos relacionados con la coagulación sanguínea, fueron realizados anteriormente en trabajos previos en el LGMHB en el mismo grupo de pacientes y controles.

Tabla 8. Efecto aditivo de los diferentes alelos de riesgo de los *SNPs* en los genes *TNFA*, *F2* y *F5*, en el riesgo de IAM, ACV y TVP.

Grupo de estudio	1AR (<i>TNFA</i>)	2AR		3AR (<i>TNFA</i> + <i>F2</i> + <i>F5</i>)
		<i>TNFA</i> + <i>F2</i>	<i>TNFA</i> + <i>F5</i>	
IAM	n=30	n=0	n=1	n=0
TVP	n=16	n=0	n=0	n=0
ACV	n=10	n=1	n=0	n=0
Controles	n=13	n=0	n=1	n=0
IAM OR (IC 95 %)	2,71 (1,32-5,78)	-	0,89 (0,05-14,45)	-
TVP OR (IC 95 %)	1,28 (0,58-2,81)	-	-	-
ACV OR (IC 95 %)	1,06 (0,44-2,58)	-	-	-

Abreviaturas: n= número de individuos que presentan el AR, AR= alelo de riesgo, IC= intervalo de confianza.

En la Tabla 7, se reportan el número de individuos (paciente o controles) que presentaron uno, dos o tres alelos de riesgo para los diferentes *SNPs*, para posteriormente realizar el estimado de OR. Como se observa en la Tabla, en la mayoría de los casos no se encontraron individuos con la presencia de 2 o 3 alelos de riesgo, por lo que tanto para la evaluación del efecto combinado de la presencia del alelo de riesgo para los *SNPs* en los genes de *TNFA* y *F2*, así como para el efecto combinado de los tres alelos de riesgo (*F2*, *F5* y *TNFA*) no se pudo realizar los cálculos de OR respectivos. Por su parte, únicamente en el caso de la coexistencia de los alelos de riesgo para los *SNPs* presentes en los genes *TNFA* y *F5*, se pudo realizar un cálculo de OR con respecto al riesgo asociado a padecer un IAM,

determinando un no incremento en el riesgo (0,89, $p>0,05$), valor el cual no fue estadísticamente significativo (Tabla 7). Estos resultados, no permitieron sugerir un posible efecto aditivo asociado a la coexistencia de diferentes alelos de riesgo, con un incremento en el riesgo de desarrollo de las diferentes patologías cardiovasculares estudiadas.

VII. DISCUSIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECs), son conocidas por ser desde hace ya largos años la principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo, conllevando a un grave problema sanitario en la sociedad actual. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2004, un 28 % del total de muertes a nivel mundial fueron causadas por la presencia de una EC, dentro de las cuales el infarto agudo al miocardio (IAM) figuró como la principal manifestación de estas enfermedades con un 12 %, seguido por el accidente cerebrovascular (ACV) con un 11 % de prevalencia (OMS, 2004). Más aún, se ha observado a través de los años, como el número de casos de personas con algunas de estas ECs ha ido aumentando dramáticamente, afectando de manera creciente a poblaciones en edad laboral, contribuyendo a la pérdida de años potenciales de vida saludable y productiva, lo cual ha sido reconocido como un problema de salud pública por la Organización Panamericana de Salud (OPS).

En el caso de Venezuela, este país no se diferencia del resto, teniendo que al igual que la mayoría de los países, las ECs representan la principal causa de muerte registrada para el 2011, siendo en particular las enfermedades del corazón las responsables del 21,36 % del total de muertes en el país; dentro de las cuales el IAM representaron el 14,17 % (20.265 casos), mientras que las enfermedades cerebrovasculares se ubicaron como la tercera causa de mortalidad con un con un 7,73 % (11.052 casos registrados) (MPPS, 2014).

Debido a esto, el estudio de los diferentes factores que puedan estar relacionados con las ECs, ha sido de gran importancia en las últimas décadas, en la búsqueda de determinar las causas de estas patologías, para así poder aumentar la tasa de supervivencia de individuos que han padecido alguna de estas patologías, así como la manera para poder prevenirlas, con el fin de disminuir su incidencia.

Numerosos estudios han sido realizados por diferentes grupos de investigadores, en los cuales se ha revelado la etiología de tipo multifactorial de las ECs, siendo el resultado de la interacción de diferentes factores ambientales y genéticos. Así, las ECs son características por presentar un alto componente hereditario, siendo el resultado de la interacción entre múltiples genes con el medio ambiente (Frazier y col., 2005).

De esta forma, gracias al creciente mejoramiento de las técnicas de biología molecular, ha sido posible el estudio de aquellos factores genéticos que puedan estar asociados al padecimiento de las ECs, en donde la identificación de variantes génicas en aquellos genes candidatos que codifiquen para proteínas alteradas o modificadas que intervengan en procesos vasculares, como la inflamación y la coagulación sanguínea; ha sido uno de los principales genes blancos de interés de los investigadores (Navarro, 2003).

En este sentido, una gran cantidad de polimorfismos (variación en la secuencia de ADN en un lugar determinado en más del 1 % de los individuos de una población), han sido identificados en diferentes genes candidatos asociados al padecimiento de las ECs, Así, una vez identificada la variante polimórfica y el alelo de riesgo, diversos estudios, principalmente de tipo caso-control, han sido realizados con el fin de determinar la frecuencia del alelo de riesgo en ambos grupos de estudio y poder establecer una asociación o estimación del riesgo atribuible al desarrollo de la patología de interés, en presencia de dicho alelo patogénico. Todo ello, con el objetivo de dilucidar marcadores de riesgo genéticos y la toma de medida preventivas temprana en población sana portadora (Fortunato y Di Taranto, 2007).

Uno de los principales procesos fisiológicos más ampliamente estudiados es la respuesta inflamatoria, debido a su estrecha relación con el mantenimiento de la vasculatura y del sistema circulatorio en general, en donde intervienen un gran número de proteínas, principalmente aquellas de las familias de las quimioquinas y citoquinas. Estas proteínas se van a encargar de modular la activación y desactivación del proceso inflamatorio, así como también del proceso de coagulación sanguínea, siendo capaces de desencadenar un variado número de cascadas metabólicas. En este sentido, de haber alguna alteración presente, ello pudiese causar daños a los tejidos, disfunción endotelial, formación de ateromas o coágulos sanguíneos anómalos; eventos los cuales en última instancia pudiesen causar un IAM, un ACV o TVP (Prescott y col., 2002).

De esta manera, debido a la estrecha relación existente entre los procesos de inflamación y/o coagulación como eventos desencadenantes en el origen y progreso de las ECs; así como también, a la alta incidencia de las ECs en la población de Venezuela, este trabajo se basó en la detección del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen que codifica para la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , cuyo alelo de riesgo -308A ha sido asociado con un aumento en los niveles de la proteína. Ello fue realizado mediante el diseño

de un estudio tipo caso-control, el cual consistió de tres poblaciones de pacientes o casos clasificados según la patología cardiovascular (IAM, ACV y TVP) y una población de individuos sanos o controles; con el fin de determinar, al menos parcialmente, el perfil genético de una muestra de población Venezolana para el polimorfismo estudiado, y la posible relación del alelo de riesgo para este polimorfismo, como factor de riesgo genético asociado a un incremento en la susceptibilidad del desarrollo o padecimiento de estas enfermedades.

7.1 Características étnicas de la población estudiada.

En el presente estudio se realizó la detección del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* en una población venezolana constituida por 373 individuos, divididos en tres grupos: 100 pacientes sobrevivientes a un IAM, 73 pacientes sobrevivientes a un ACV, 100 pacientes que padecen TVP y 100 individuos controles; los cuales fueron provenientes de diferentes regiones del país, principalmente habitantes de la ciudad de Caracas.

La población venezolana está constituida por una amplia variedad de orígenes étnicos, producto de los diferentes grados de mezcla a través del tiempo entre diferentes grupos raciales (Rodríguez-Larralde y col., 2000), encontrándose según datos oficiales del Instituto Nacional de Estadística (INE) que nuestra población está compuesta principalmente por individuos mestizos (67 %), seguidos por individuos blancos (21 %), negroides (10 %) y aborígenes (2 %) (INE, 2010). De esta manera, la población venezolana se caracteriza por estar formada principalmente por individuos mestizos, los cuales se definen como cualquier persona nacida en Venezuela descendiente de habitantes indígenas del país y de individuos caucásicos, siendo principalmente de origen español (58,8 %) (Fernandez-Mestre y col., 2005).

Hasta la fecha, se han realizado diferentes estudios estadísticos con el fin de establecer al menos en parte, la composición étnica de la población venezolana; sin embargo; hoy en día es del conocimiento, la caracterización étnica de las poblaciones en base a la identificación de marcadores genéticos moleculares. En consecuencia, se han identificado una serie de marcadores genéticos de herencia ancestral (AIMs, por sus siglas en inglés: *Ancestry Inherited Markers*), propios de cada grupo étnico, los cuales permitirían determinar con mayor exactitud la composición étnica del grupo de estudio y poder determinar de

manera más objetiva, si la muestra considerada en estudio, realmente es una muestra representativa de la población venezolana en base a estos marcadores moleculares (Santos y col., 2010).

7.2 Polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* y su asociación con el desarrollo de las ECs.

La respuesta inflamatoria es un proceso que se produce en respuesta a algún daño en el tejido, que conlleva a la activación de una serie de mecanismos que van a tener como fin último, la eliminación del agente causante del daño, como por ejemplo microorganismos patógenos, células dañadas, complejos inmunes, entre otros (de la Fuente, 2004). En el proceso inflamatorio intervienen un gran número de proteínas, dentro de las cuales un grupo de gran importancia son las denominadas citoquinas, las cuales modulan diferentes puntos de este proceso (Opal, 2003). Estas citoquinas pueden dividirse según su papel en este proceso, en anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, siendo dentro de este último grupo, las citoquinas más importantes por su acción rápida, la interluquina 1 (IL-1), la interluquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Schoenmakers y col., 2005).

El TNF- α es una de la primeras citoquinas en ser liberadas al momento de iniciarse una respuesta inflamatoria, desencadenando una cascada metabólica que va a permitir la transcripción de diferentes genes que codifican para otras citoquinas, permitiendo así que se desarrollen los eventos propios del proceso inflamatorio en el lugar del daño o lesión (Weinberg, 2006). Debido a la gran importancia de la acción pro-inflamatoria del TNF- α , el estudio y análisis de secuencia del gen que la codifica ha sido ampliamente estudiado, con el fin de buscar e identificar alteraciones genéticas que puedan modificar los niveles transcripcionales y de expresión de la misma, lo cual pudiese estar asociado con una alteración en los niveles de esta proteína (Herrmann y col., 1998). Un ejemplo de ello, es el caso del polimorfismo -308 G>A (rs1800629), alteración genética en la cual se produce una transición de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición -308 de la región promotora del gen, cuya presencia del alelo -308A ha sido asociado con el aumento en la tasa transcripcional del gen y en consecuencia, a mayores niveles y producción de la proteína (Wilson y col., 1997). Debido a esto, diferentes estudios se han realizado con el fin de determinar la asociación de la variante de riesgo para este polimorfismo, con el desarrollo de

diferentes enfermedades, entre ellas las diferentes manifestaciones clínicas de las ECs, debido a la estrecha relación existente entre la presencia de estos procesos patológicos con la respuesta inflamatoria exacerbada y los eventos procoagulantes.

7.2.1 Infarto agudo al miocardio (IAM).

El IAM, es conocida por ser la principal causa de muerte tanto en Venezuela como en el resto del mundo, por lo que ha sido de gran importancia determinar los posibles factores que puedan aumentar el riesgo de padecer esta patología en particular (Tousoulis y col., 2003). El principal mecanismo fisiopatológico asociado al padecimiento de un IAM es la aterosclerosis, la cual se define como un proceso crónico e inflamatorio, en el cual debido a la activación e interacción de diversos procesos, se da la formación de una placa compuesta por células espumosas y células de la musculatura lisa; pudiendo complicarse aún más, conllevando a la formación de un trombo sanguíneo arterial (Rodríguez y col., 2009). Así, con el fin de determinar una posible asociación entre la presencia del alelo de riesgo -308A para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* con el desarrollo de esta patología, se procedió a la genotipificación de 100 individuos controles y 100 pacientes sobrevivientes diagnosticados con IAM.

En relación a los resultados obtenidos, se observó una mayor frecuencia del alelo de riesgo -308A en el grupo de los pacientes con IAM (0,163; Tabla 5, sección de resultados), siendo considerablemente mayor a la observada en el grupo control (0,065; Tabla 5, sección de resultados); valores los cuales, una vez realizado la determinación del riesgo (cociente de OR), correspondieron a un incremento de casi tres veces en el riesgo de padecer esta patología en presencia del alelo de riesgo -308A ($OR_{pac\ IAM + AR/CTRL + AR} = 2,713$ (1,319-5,579 IC 95%); $p < 0,05$), valor estadísticamente significativo (Tabla 5). Este resultado sugiere una fuerte asociación entre la presencia del alelo de riesgo -308A con el desarrollo de IAM.

Diversos estudios han sido realizados basados en la determinación de este polimorfismo en pacientes infartados como grupo de casos o pacientes; mientras que otros estudios han sido realizado con distintas patologías relacionadas directamente con el desarrollo del IAM, tal es el caso de las enfermedades coronarias del corazón y la hipertensión arterial (HTA). Igualmente, una gran cantidad de estudios involucrando este polimorfismo han sido realizados en diferentes poblaciones, evidenciando como resultados

relevantes, al igual que en este trabajo, una fuerte asociación entre la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de IAM, así como con otras enfermedades estrechamente relacionadas. Un ejemplo de ello, es el trabajo tipo caso-control realizado por George y colaboradores en el 2003, el cual incluyó un total de 171 pacientes con IAM y 333 individuos controles en población francesa, en donde se observó, similarmente al presente trabajo, un incremento en el riesgo de desarrollo de un IAM de hasta tres veces en presencia del alelo de riesgo -308A (OR= 3,3 (1,6-6,9 IC 95 %)); aunque dicho valor no fue estadísticamente significativo, sugiriendo así una fuerte tendencia con respecto a la relación de este alelo con el desarrollo de enfermedades del corazón (George y col., 2003).

Por su parte, en un estudio caso-control realizado por Vendrell y colaboradores en el mismo año (2003) en la población española, el cual incluyó un total de 341 pacientes con enfermedad coronaria y 200 individuos controles, se observó un aumento en el riesgo de padecer esta enfermedad de un 58 % en presencia del alelo de riesgo -308A para este polimorfismo, al considerar individuos portadores del mismo tanto en condición homocigota o heterocigota (OR_{pac IAM + AR/CTRL + AR}= 1,58 (1,04-2,39 IC 95%); $p < 0,05$), siendo este valor estadísticamente significativo. Adicionalmente, cuando en ese mismo estudio se subclasificó un grupo de 119 mujeres que presentaron enfermedad coronaria y diabetes *mellitus* tipo 2; se observó un aumento del riesgo de hasta cuatro veces con el desarrollo de estas patologías en mujeres portadores del alelo de riesgo -308A, resultado el cual fue estadísticamente significativo (Vendrell y col., 2003).

Por otro lado, varios estudios de meta-análisis han sido realizados para determinar la asociación del alelo de riesgo -308A con el desarrollo de enfermedades del corazón, con el fin de poder establecer una asociación estadística más robusta. Uno de los más completos fue el publicado por Zhang y colaboradores en el 2011, el cual incluyó 24 estudios de tipo caso-control realizados en diversas poblaciones, desde caucásicas hasta africanas; englobando un total de casi 10.000 pacientes con diferentes enfermedades del corazón y 8000 individuos controles. Estos autores determinaron que en presencia del alelo de riesgo -308A se obtuvo un aumento del 50 % en el riesgo de padecer una enfermedad coronaria del corazón en población caucásica (OR_{pac IAM + AR/CTRL + AR}= 1,50 (1,23-1,77 IC 95%); mientras que al considerar población asiática, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del alelo de riesgo y el desarrollo de alguna patología del corazón (Zhang

y col., 2011). Estos resultados son de particular interés, considerando la alta migración española presente en nuestro país, lo cual se refleja en el 58,8 % de la población caucásica que caracteriza la etnia venezolana; resultados los cuales podrían explicar al menos en parte, la asociación igualmente significativa encontrada en el presente trabajo.

Un año más tarde, fue publicado otro estudio de meta-análisis realizado por Li y colaboradores (2012), el cual incluyó un total de 7 estudios principalmente comprendidos por poblaciones asiáticas (China y Corea); con el fin de determinar la relación del alelo de riesgo -308A con el desarrollo de HTA, factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de IAM. Este estudio analizó un total de 1092 pacientes diagnosticado con HTA y 1152 individuos controles, en donde se realizó igualmente el análisis de OR mediante diferentes modelos, obteniendo que para el caso de un modelo dominante (GA+AA vs GG), se determinó un incremento en el riesgo de padecer HTA del 50 % en presencia del alelo de riesgo -308A, siendo este valor estadísticamente significativo. Cabe la pena destacar, que si bien dicho estudio no fue realizado directamente con pacientes que han sufrido un IAM, la HTA es definida como la principal causa y fenotipo clínico considerado como factor de riesgo independiente asociado al desarrollo de EC, resultados los cuales podrían inferir una aproximación indirectamente relacionada con el riesgo de padecer un IAM (Li y col., 2012).

De esta manera, si bien se han encontrado varios trabajos que determinan alguna relación entre la presencia del alelo de riesgo A en el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* y el desarrollo de EC, dichos resultados no evidenciaron un incremento en el riesgo de desarrollo de IAM tan alto (casi tres veces) como el encontrado en el presente trabajo. Ello, puede ser debido a la escasa publicación de estudios realizados sobre este polimorfismo y el desarrollo de EC en poblaciones latinoamericanas con un *pool* genético similar al encontrado en Venezuela, con el fin de poder realizar mayores comparaciones entre diferentes grupos poblaciones. Sin embargo, este estudio sugiere al alelo de riesgo -308A para el *SNP*-308 G>A en el gen *TNFA*, como un marcador de riesgo cardiovascular a ser considerado en la realización del perfil genético de riesgo para el desarrollo de estas patologías.

7.2.2 Accidente cerebrovascular (ACV).

El ACV se define como el deterioro del tejido cerebral, debido a la disminución del flujo sanguíneo al mismo, siendo esta patología la responsable de la tercera causa de mortalidad en el mundo. Al igual que con el IAM, uno de los principales factores que puede ocasionar un ACV es la aterosclerosis, así como un mal funcionamiento de los procesos de coagulación sanguínea; ambos eventos relacionados directamente con el proceso inflamatorio (Crepeau y col., 2005). Es por ello, que la presencia de alguna modificación en algunas de las proteínas que intervienen en los procesos pro-inflamatorios, así como de alteraciones en las secuencias regulatorias de estas proteínas, pueden afectar la actividad o producción de las mismas, pudiendo ocasionar como evento clínico final el desarrollo de un ACV (Ginsburg, 2005).

Al analizar los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la asociación del alelo de riesgo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* con el desarrollo de ACV, no se logró determinar un incremento del riesgo en el padecimiento de un ACV en presencia del alelo de riesgo -308. Sin embargo, se obtuvo un valor de $OR > 1$ ($OR_{PAC-ACV+AR/CTRL+AR} = 1,062$ (0,438-2,576 IC 95%; $p > 0,05$), indicativo a un aumento en el riesgo de un 6 %, valor el cual no fue estadísticamente significativo. Este valor obtenido, presenta concordancia con la baja frecuencia que presentó el alelo -308A en el grupo de pacientes, siendo muy similar a la encontrada en el grupo de controles (0,068 vs. 0,065, respectivamente; Tabla 5, sección de resultados).

La mayoría de los estudios publicados en relación al polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* y el desarrollo de ACV isquémico, no han demostrado resultados que muestren una asociación significativa entre la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de la enfermedad. Un ejemplo de ello, es el trabajo publicado por Karahan en 2006, en donde analizaron el genotipo de este polimorfismo y su relación en niños diagnosticados con ACV isquémico de origen turco (entre 0 y 14 años), comprendiendo un total de 86 pacientes y 83 individuos sanos. Los resultados obtenidos por estos investigadores, no evidenciaron alguna asociación significativa entre este factor de riesgo genético y el desarrollo de la patología (Karahan y col., 2005).

Por su parte, en otro estudio publicado en el mismo año (2005), realizado en población italiana (Roma), por Robattu y colaboradores, el cual incluyó un total de 115 pacientes

hipertensos y 180 individuos controles; este grupo de investigadores encontraron un incremento significativo en el riesgo de padecer un ACV de casi dos veces, en pacientes con presencia de HTA (OR= 1,80 (1,01-3,3 IC 95 %)) (Robattu y col., 2005).

Más recientemente, un estudio de meta-análisis fue publicado por Pereira y colaboradores en el 2007, en donde estudiaron la asociación entre las variantes alélicas para este polimorfismo y el riesgo de padecer un ACV. Este estudio, incluyó un total de 8 estudios de tipo caso-control, de los cuales 5 fueron hechos en población europea y 3 en población asiática abarcando un total de 1606 pacientes y 2213 individuos controles. Con respecto a los resultados obtenidos, estos investigadores determinaron que no existe asociación entre la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de ACV isquémico (OR=0,99 (0,70-1,41 IC 95 %)) (Pereira y col., 2007).

El ACV como el resto de las demás manifestaciones de las ECs, es una enfermedad de tipo multifactorial, en donde intervienen una gran número de factores, tanto ambientales como poligénicos, en donde si bien no se ha encontrado en general una asociación directa entre la presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* y el desarrollo de ACV, algunos estudios sugieren que si podría estar relacionado con el desarrollo de HTA, el cual pudiese modular como fenotipo clínico intermedio el desarrollo de un ACV como fenotipo clínico final .

7.2.3 Trombosis venosa profunda (TVP).

La trombosis venosa es un trastorno vascular multifactorial que ocurre cuando se da la formación de un trombo por efecto de la activación inapropiada del sistema hemostático, provocando la obstrucción total o parcial del interior del vaso sanguíneo (Quezada, 2001). La TVP es una patología que por sí misma en la mayoría de los casos, no presenta una alta mortalidad, aunque el principal riesgo asociado a esta patología viene dado cuando un fragmento de este trombo se desprende y comienza a viajar por el torrente sanguíneo, siendo capaz de obstruir los vasos sanguíneos de órganos principales como los pulmones, causando por ejemplo un tromboembolismo pulmonar (TEP), pudiendo este causar la muerte del individuo (Mckenzie, 1999). Debido a que los mecanismos de coagulación son en gran parte modulados por las células y proteínas inflamatorias, el estudio de alteraciones en los genes que codifican para las distintas citoquinas, principales proteínas presentes en la respuesta

inflamatoria, podría permitir igualmente identificar factores de riesgo genéticos asociados a esta patología; y con ello, poder desarrollar formas y toma de medidas de prevención en población sana portadora.

Los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la asociación del polimorfismo -308 G>A con el desarrollo de TVP, mostraron una baja frecuencia del alelo de riesgo -308 A en el grupo de pacientes (0,091; Tabla 5, sección de resultados), valor ligeramente mayor a la frecuencia observada en el grupo control (0,065; Tabla 5, sección de resultados). Estos resultados, fueron asociados, según el análisis de OR, a un aumento en el riesgo a padecer TVP de un 27 % en presencia del alelo de riesgo -308 A ($OR_{PAC-TVPA+AR/CTRL+AR} = 1,275$ (0,578-2,811 IC 95%; $p>0,05$), aunque no estadísticamente significativo; resultados los cuales sugieren una tendencia al aumento del riesgo al desarrollo de TVP como patología clínica.

Pocos estudios han sido publicados con el objetivo de relacionar la presencia de los diferentes alelos para el polimorfismo-308 G>A en el gen *TNFA* con el desarrollo de TVP particularmente; siendo más ampliamente estudiado o relacionado con patologías asociadas a la trombosis del tipo arterial. Una de las investigaciones más completas publicadas es el estudio BRATROS (por sus siglas en inglés: *Brazilian Thrombosis Study*), realizado por Pieroni y colaboradores (2007) en Brasil, en donde se detectaron 6 polimorfismos en cuatro genes diferentes que codifican para distintas citoquinas relacionadas principalmente con el proceso inflamatorio: IL6 -174 G>C (rs1800795), IL10 -1082 G>A (rs1800896) el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*. En ese estudio fueron analizados 420 pacientes diagnosticado con TVP y 420 individuos controles, donde no encontraron ningún tipo de asociación entre la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de TVP, referente a un valor de OR=1. Así mismo, en dicho estudio no se logró determinar alguna asociación génica importante con el riesgo de desarrollo de TVP, al considerar los otros alelos de riesgo para los otros polimorfismos incluidos en este estudio (Pieroni y col., 2007).

Otro estudio interesante, fue el realizado por Unal y colaboradores en el 2008 en una población de niños con un promedio de edad de 5 años con presencia de TVP, en donde se analizaron los polimorfismo -174 G>C (rs1800795) en el gen que codifica para la IL6 y el polimorfismo -308 G>A en el gen que codifica para el TNF- α . En el estudio, no se encontró

relación entre la presencia del alelo de riesgo -308A con el desarrollo de TVP en niños; resultados los cuales fueron sugeridos no solo mediante el análisis genético y estimaciones de riesgo, sino también mediante los valores obtenidos de la cuantificación de los niveles TNF- α a partir de muestras de suero provenientes de los pacientes e individuos controles; en donde no se encontró diferencias significativas en los niveles de esta citoquina entre ambos grupos de estudio (Unal y col., 2008).

Un estudio más reciente fue publicado en el 2012 por Harakova y colaboradores en población de Republica Checa, el cual incluyó 67 pacientes diagnosticados con TVP y 62 individuos sin historia personal ni familiar de TVP con una edad promedio de 50 años. Estos investigadores, determinaron un aumento en el riesgo de casi tres veces de padecer de una TVP en presencia del alelo de riesgo -308A (OR=2,64 (1,18-5,87 IC 95 %), valor estadísticamente significativo.

Cabe la pena destacar, que si bien no existe un gran número de trabajos publicados en donde se busque una relación entre el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* y el desarrollo de TVP, en aquellos donde se investigó se ha observado en la mayoría de los ellos al igual que en el presente trabajo, una asociación no significativa entre la presencia del alelo de riesgo -308A y el desarrollo de esta patología en particular. Sin embargo, es importante ampliar el tamaño de la muestra analizada, al igual que el número de estudios en otros grupos poblacionales para poder obtener resultados más concluyentes al respecto. Por su parte, estos resultados sugieren, que dicha variante génica ha sido más ampliamente relacionada con patologías trombóticas arteriales.

Por último, se investigó el efecto en el riesgo de desarrollo de IAM, ACV y TVP, en presencia de la coexistencia de múltiples alelos de riesgo en un mismo individuo, por lo que se realizó el análisis del efecto aditivo de tres alelos de riesgo para tres *SNPs* en genes diferentes: el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, el polimorfismo 20210 G>A (rs1799963) en el gen que codifica para el factor 2 o protrombina y el polimorfismo c.1691 G>A (rs6025) en el gen que codifica para el F5 de la coagulación sanguínea. Debido a que no se encontraron individuos que presentaran el alelo de riesgo en dos o en los tres polimorfismos considerados, no fue posible realizar los cálculos de OR respectivos. Por esta razón, no se pudo determinar la existencia de un incremento en la susceptibilidad génica en

presencia de más de un alelo de riesgo y establecer así, una relación entre marcadores genéticos coexistentes asociados a procesos procoagulantes e inflamatorios.

7.3 Efecto de diferentes factores de riesgo en el desarrollo de las ECs.

Las ECs como ya ha sido mencionado anteriormente, están asociadas a una gran variedad de factores, que clásicamente han sido divididos en dos grandes grupos, los de tipo modificable, como el hábito tabáquico, el estrés, entre otros; y los no modificables, como la edad, el sexo o la herencia. Es por esto, que para lograr desarrollar estrategias efectivas para la prevención de estas enfermedades, es importante el conocimiento de la prevalencia de estos factores en diferentes regiones geográficas, así como en los diferentes grupos étnicos (Yusuf y col., 2004).

Con el fin de evaluar el efecto de los factores de riesgo clásico y el riesgo de desarrollo de las diferentes patologías cardiovasculares, en el presente estudio se determinó una correlación positiva entre la presencia del género masculino, edad e HTA con el desarrollo de IAM. Por su parte, únicamente se observó una correlación positiva entre la edad y el desarrollo de TVP.

Uno de los estudios más importantes que tuvo como objetivo determinar el riesgo de diversos factores con el desarrollo de las ECs, principalmente en relación al IAM, fue el estudio *INTERHEART*, en el cual se analizó el riesgo asociado a diferentes factores de riesgos como la HTA, la *diabetes mellitus*, hábito tabáquico, la edad, el género y el origen étnico. Entre los resultados más relevantes obtenidos en este estudio, se obtuvo que en relación al desarrollo del IAM, en individuos con edades superiores a los 40 años los principales factores de riesgo asociados de manera significativa fueron la HTA con un riesgo de casi tres veces (OR= 2,95 (2,57-3,39 IC 95 %)) y la *diabetes mellitus* con un riesgo de más de 4 veces (OR=4,26 (3,51-5,18 IC 95 %)) en población femenina. Por su parte, el hábito tabáquico fue asociado con un incremento en el riesgo de hasta tres veces en población masculina (OR=3,05 (2,78-3,33 IC 95 %)). De esta manera, ese estudio sugiere el impacto de la presencia de la HTA, diabetes y hábito tabáquico como tres de los principales factores de riesgo clásicos asociados con el padecimiento de un IAM, particularmente en individuos mayores de los 40

años (Yusuf y col., 2004). Más aún, estos investigadores determinaron que en presencia de los tres factores de riesgo antes mencionados (tabaquismo, diabetes y HTA), se obtuvo un incremento de hasta 13 veces en el riesgo de padecer un IAM (OR=13,0 (10,7-15,8 IC 95 %)); demostrando así, la influencia de la coexistencia de múltiples factores en el incremento del riesgo de desarrollo de este tipo de enfermedades, característico de su etiología multifactorial (Yusuf y col., 2004).

De esta manera, la presencia de factores de riesgo como el género, la edad avanzada, la diabetes, la HTA y el hábito tabáquico, han sido algunos de los principales responsables del desarrollo de las ECs, tales como el IAM, ACV y TVP, debido a diferentes mecanismos de acción, factores los cuales van a conllevar de una u otra forma al desarrollo de disfunción endotelial.

En relación a la edad, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un aumento en el riesgo de padecer IAM y TVP a medida que se aumenta la edad. Los efectos de edad en el desarrollo de muchas enfermedades está relacionado en gran medida con el denominado envejecimiento celular, en donde por ejemplo, se presentan una mayor cantidad de glóbulos rojos con propiedades mecánicas subóptimas (Kameneva y col., 1998). Además, con la edad la actividad del corazón tiende a deteriorarse, puede aumentar el grosor de sus paredes, las arterias pueden endurecerse y perder su flexibilidad (aterosclerosis), y cuando esto sucede, el corazón no bombea eficientemente la sangre a los diferentes músculos del cuerpo. Adicionalmente, a medida que aumenta la edad, el ejercicio físico va disminuyendo, es decir, el tipo de vida es más sedentario, de tal forma que la sangre se mueve más lentamente y está más propensa a coagular, sumado a esto, la posible deposición de grasa, que resulta en posibles complicaciones cardíacas (Kameneva y col., 1998).

Con respecto al género, los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un aumento de riesgo de padecer un IAM en individuos de género masculino. Estos resultados son concordantes con los resultados publicados por Doggen y colaboradores en 1998, en donde se ha reportado que los hombres presentan la mayor incidencia de IAM, con 60 individuos afectados por cada 10.000 hombres, principalmente en edades comprendidas entre los 55 y 59 años; mientras que en las mujeres la incidencia es de 1,5 individuos afectados por cada 10.000 mujeres (Doggen y col., 1998). En cuanto a la relación del género con el desarrollo de ACV, si bien no se pudo observar asociación entre el género y el desarrollo de

esta patología en este trabajo, ha sido determinado que en la mayor parte de grupos etarios, los hombres presentan una mayor incidencia de la enfermedad; sin embargo, en edades superiores a los 85 años las mujeres son las que presentan un mayor riesgo de padecer de un ACV (Roy-O'Railly y McCullough, 2014). Adicional a ello, en un estudio realizado por Petrea y colaboradores en 2009, en donde se evaluaron 1.136 pacientes con ACV (638 mujeres), también se determinó que las mujeres eran más propensas a encontrarse discapacitadas para realizar tareas cotidianas después de sufrir de un ACV isquémico (Petrea y col., 2009).

EL IAM afecta en mayor medida a hombres, lo cual ha sido atribuido al hecho de que el género femenino está sujeto a una protección estrogénica en su edad fértil, debido a que los estrógenos aumentan la actividad de los receptores de lipoproteínas de baja densidad, actividad que disminuye con la edad, lo que podría explicar además el aumento de colesterol plasmático con la edad. Además, los estrógenos aumentan la concentración de lipoproteínas de alta densidad (colesterol bueno, HDL), las cuales brindan protección sobre las cardiopatías coronarias y son anti-aterogénicas (Rodríguez y col., 1998).

Ahora bien, con respecto al desarrollo de TVP y el riesgo asociado con el género, en un estudio publicado en el 2010 por Bauersachs y colaboradores, en donde analizaron 4.777 pacientes diagnosticados con TVP, determinaron que el padecimiento de TVP es más frecuente en mujeres que en hombres (2.998 vs. 1.779). Sin embargo, la prevalencia de la enfermedad fue mayor en hombres (37 % vs. 24,3 %). Más aún, estos investigadores concluyen que dependiendo del rango de edades, el riesgo de padecer una TVP puede ir variando entre hombre y mujeres (Bauersachs y col., 2010). En general, las mujeres en edad fértil y principalmente durante el embarazo, presentan mayores niveles plasmáticos de factores de coagulación F7, F8, F10 y FI (fibrinógeno), así como menor actividad fibrinolítica; razón por lo cual el riesgo de sufrir una TVP sea mayor bajo estas condiciones (Peeters, 2001).

En relación a la HTA, diferentes investigadores han encontrado un estrecha relación entre altos valores de presión arterial (a partir de 115/75 mmHg) con el desarrollo de las ECs (Lewington y col., 2002). En este sentido, la HTA ha sido asociada como una de las principales causas del desarrollo de patologías como el IAM, el ACV y TVP. Con respecto a este punto, en el presente trabajo únicamente se determinó una correlación positiva entre

este factor de riesgo con el desarrollo de IAM, resultado el cual se apoya a los obtenidos por numerosos estudios, en particular el estudio *INTERHEART* mencionado anteriormente, donde estimaron un riesgo incrementado de sufrir un IAM en presencia de HTA de casi tres veces (Yusuf y col., 2004). Por su parte, en relación al padecimiento de un ACV, el estudio *INTERSTROKE*, realizado por O'Donnell y colaboradores en el 2010, el cual incluyó 3000 pacientes con ACV y 3000 individuos controles, se encontró igualmente un aumento de riesgo de casi tres veces de padecer un ACV en presencia de HTA (OR=2,64 (2,26-3,08 IC 95 %)), siendo también un importante factor de riesgo en el desarrollo de esta patología (O'Donnell y col., 2010). Por último, con respecto al desarrollo de TVP, al igual que para el caso de ACV, en este trabajo no se encontró asociación significativa entre la HTA y esta enfermedad. En comparación con la bibliografía, la HTA no se encuentra dentro de los factores de riesgo asociados comúnmente a esta patología, por lo que no se han realizado trabajos extensos en la búsqueda de una relación entre la HTA y el desarrollo de TVP (Heit y col., 2000).

Adicionalmente, se decidió evaluar la relación entre la presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, con el desarrollo de HTA, encontrando que para el grupo de pacientes con ACV y TVP, no se encontró un aumento de riesgo significativo (OR=1,002 vs. 1,005, respectivamente). Sin embargo, en el caso del grupo de pacientes infartados, se obtuvo un incremento en el riesgo de 2,5 veces de padecer HTA en presencia del alelo de riesgo -308A. Estos resultados, son consistentes con un estudio realizado por Skookoian y colabores en el 2005 en donde determinaron que la presencia del alelo de riesgo -308A está asociado a una mayor presión sistólica que en individuos no portadores de dicho alelo (Skookoian y col., 2005).

También existen otras patologías que pueden estar asociadas al riesgo de padecer una EC, tal es el caso de la diabetes *mellitus*, en donde la hiperglicemia asociada a esta conlleva a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), disfunción endotelial y al desarrollo de aterosclerosis, incrementando así el riesgo a sufrir una EC (Tébar y Escobar, 2009). Ello fue evidenciado en el estudio *INTERHEART*, el cual determinó un riesgo asociado a la diabetes con el desarrollo de IAM de poco más de cuatro veces. Por su parte, en un estudio realizado en el 2007 por Janghorbani y colaboradores, encontraron que en mujeres diabéticas de entre 30 y 35 años de edad existe un riesgo aumentado de entre 2 a

6 veces de padecer un ACV. Sumado a ello, estos autores evaluaron el efecto combinado de la diabetes y la HTA con el desarrollo de ACV, encontrando un aumento de más de cuatro veces de padecer esta enfermedad en presencia de la coexistencia de ambos factores de riesgo (Janghorbani y col., 2007). En el caso de su asociación o relación con la TVP, se ha encontrado que en pacientes con presencia de diabetes existe un riesgo incrementado de casi tres veces (OR=2,71) de padecer una TVP, en comparación con individuos sanos, sin importar el género o la edad (Zhao y col., 2014).

Otro factor de riesgo ampliamente estudiado ha sido el hábito tabáquico, el cual es conocido como uno de los principales factores de riesgo modificables asociado al desarrollo de las ECs, teniendo un efecto predominante en los eventos coronarios agudos y aterogenesis, en donde los principales mecanismos involucrados son: la trombosis, disfunción endotelial e inflamación. Ello se atribuye a que el tabaco está asociado a la activación plaquetaria, ya sea por disfunción endotelial, como por el efecto directo de oxidantes químicos; generando así una mayor agregación plaquetaria y por ende un estado de hipercoagulabilidad, afectando la trombogenicidad de las placas de ateroma establecidas. Sumado a ello, el cigarrillo genera una respuesta inflamatoria crónica asociada a un incremento en los niveles de fibrinógeno y a un aumento en los glóbulos rojos, producto de compensar la hipoxia relativa producida por el monóxido de carbono, incrementando la viscosidad de la sangre y la trombogénesis (Benowitz, 2003).

En el presente trabajo no se logró encontrar asociación entre el hábito tabáquico y el desarrollo de ninguna de estas enfermedades, aunque es bien conocido que individuos fumadores poseen el doble de riesgo a desarrollar una EC en comparación a los individuos no fumadores. Adicionalmente, se ha encontrado que aquellos individuos expuestos habitualmente al humo de tabaco (conocidos como fumadores pasivos) también presentan un riesgo incrementado a padecer alguna EC, aunque en menor proporción (Torrades y Perez, 2006).

De esta forma, se puede decir que un análisis de los diferentes factores que pueden estar contribuyendo al aumento del riesgo cardiovascular en un individuo es de gran importancia, ya sea para el desarrollo de tratamientos más efectivos, así como la toma de medidas de prevención que puedan contrarrestar el efecto de estos factores; todo ello unido al conocimiento de la presencia de alteraciones genéticas que puedan actuar negativa o

positivamente al desarrollo de patologías como la aterosclerosis. Así, el conocimiento de manera integral de todos estos factores permite ayudar a mejorar la etiopatogénesis y diagnóstico de estas enfermedades, y así desarrollar técnicas más efectivas para combatirlas.

7.4 Implicaciones e importancia del conocimiento genético del polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* en el riesgo cardiovascular

En la actualidad, conocer las causas que ocasionan las diferentes enfermedades es de gran importancia para así poder tratarlas y prevenirlas eficientemente. En el caso de las ECs, se ha determinado que éstas son causadas por una gran variedad de factores, tanto adquiridos por el individuo como aquellos propios de estos (Yusuf y col., 2004). Uno de estos factores inherentes no modificables es el genético, el cual se basa en aquellas alteraciones presentes en el genoma que puedan alterar en primera instancia la producción, actividad o acción de proteínas, que a su vez aumenten o disminuyan el riesgo a padecer una EC (Navarro, 2003).

Así, el conocimiento de variantes alélicas para ciertos polimorfismos que puedan afectar las diferentes rutas relacionadas con la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la respuesta inflamatoria podría permitir el desarrollo de nuevos medicamentos y técnicas para tratar las enfermedades (Whitfield, 2014).

En el caso particular del polimorfismo -308 G>A ubicado en el gen *TNFA*, se ha determinado que la presencia de la variante alélica -308A genera un aumento en los niveles transcripcionales del gen y por ende en los niveles de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (Wilson y col., 1997). Esta citoquina tiene un papel importante en la iniciación de la respuesta inflamatoria, teniendo así que niveles muy altos de esta proteína podría causar una respuesta inflamatoria exacerbada y causar la manifestación de una EC (Goldsby y col., 2001). Actualmente, el estudio de este polimorfismo ha estado enfocado principalmente en la determinación de su relación con el padecimiento de diversas enfermedades, que puedan estar relacionadas directa o indirectamente con la respuesta inflamatoria, por lo que las ECs han sido una de las principales patologías de interés para diversos investigadores, en la búsqueda de encontrar una relación directa entre la presencia del alelo de riesgo -308A como marcador genético y el desarrollo de EC (Navarro, 2003).

En cuanto a las maneras de prevención y tratamiento de las ECs que involucren el conocimiento del riesgo genético, en la actualidad se han desarrollado nuevas ramas de la medicina y genética como la nutrigenética y la nutrigenómica. La primera se encarga de estudiar las variaciones genéticas en la respuesta del organismo a los nutrientes y/o componentes de la dieta, permitiendo personalizar la dieta en función de la constitución genética del individuo; mientras que la nutrigenómica estudia la influencia de los nutrientes en la expresión de los genes, por lo que pretende proporcionar un conocimiento de aquellos componentes de la dieta que contribuyen a la salud mediante la alteración de la expresión de diferentes genes (Subbiah, 2007).

Algunos estudios como el realizado por Arkadianos y colaboradores en 2007, se han dedicado a determinar las posibles mejoras a la salud que puede presentar la implementación de una dieta personalizada basada en el conocimiento de la constitución genética del individuo. Este estudio tuvo como objetivo determinar si estas dietas personalizadas, en base al conocimiento de riesgo genético para ciertos marcadores considerados, presentan una mejor eficiencia en la pérdida de peso de individuos obesos (Índice de masa corporal: 32 Kg/m²), en comparación de la implementación de una dieta convencional. Para ello, este estudio determinó 24 variantes genéticas presentes en 19 genes relacionados con diferentes metabolismos o procesos biológicos, dentro de los cuales se incluyó el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*. Así para el caso particular de la variante en el gen *TNFA*, aquellos individuos que presentaron el alelo de riesgo -308A para este polimorfismo, su modificación dietética consistió a la ingesta como suplemento de omega 3 como recomendación (700-1.400 mg); esto debido a que se ha visto que la presencia de ciertos ácidos grasos como el omega 3, tienen la capacidad de disminuir la producción de TNF- α ; aunque no se conoce el mecanismo preciso por el cual se produce esta acción (Grimble y col., 2002).

De esta manera, en base a las recomendaciones o modificaciones de la dieta particulares realizadas a cada individuo según su perfil genético, estos investigadores observaron que luego de realizar un seguimiento por 300 días, se observó que aquellos individuos sujetos a la dieta personalizada fueron más propensos a perder peso (73 %) que aquellos expuestos a una dieta normal (32 %), demostrando que una dieta diseñada tomando en cuenta la carga genética del individuo permite no sólo una más rápida reducción del peso, sino también un mejoramiento de la salud de las personas (Arkadianos y col., 2007)

Otra disciplina que ha tomado gran importancia gracias a los conocimientos cada vez más especializados en el campo de la genética es la farmacogenética. Esta es una rama de la farmacología que se encarga de estudiar las variaciones genéticas que determinan la acción de drogas, determinando su eficacia, seguridad y/o toxicidad. Por otra parte, se tiene la farmacogenómica que se encarga del estudio de los genes farmacológicamente relevantes, con el fin de definir nuevos blancos terapéuticos, basados en el estudio del efecto de la administración de distintos fármacos, sobre la expresión de genes en un tejido determinado (Arnett y col., 2006).

La importancia del desarrollo de medicamentos que puedan contrarrestar los daños ocasionados por las ECs, con blancos de acción específicos a proteínas o a sistemas que estén relacionados con estas enfermedades, ha sido un campo de creciente interés. Para el caso de problemas con la respuesta inflamatoria, la administración de medicamentos, están basados principalmente en anticuerpos monoclonales como el infliximab y el adalimumab, los cuales son anticuerpos anti-TNF, que actúan inhibiendo su acción (Kooloos y col., 2007). En este sentido, estos medicamentos podrían tener la capacidad de ayudar a contrarrestar los efectos de la presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA*, observando una mejor respuesta anti-inflamatoria en individuos portadores del mismo.

De esta manera, en base a lo anteriormente expuesto, es importante que todos estos estudios realizados en pacientes con EC y la aplicación de tratamientos, venga acompañada por el consejo genético adecuado, que no es más que la rama de la medicina que se encarga de informar, educar y dar soporte a aquellas personas que presentan una enfermedad genética o que pueda tener un alto riesgo según su componente genético; teniendo que un consejo genético adecuado servirá para disminuir el estrés y mejorar la visión de los pacientes hacia las posibles formas de tratamiento de su enfermedad (Hershberger, 2008). Además, al momento de realizar estos estudios se debe tener siempre presente las consideraciones éticas, las cuales son muy específicas en cuanto a la confidencialidad de la información obtenida, la manera de obtención de las muestras y la forma como son expuestos los resultados a los pacientes. Además, es importante resaltar el manejo consciente de las implicaciones comerciales y el impacto que puedan tener estas investigaciones para el individuo y la sociedad en general. Debido a ello, con respecto a los estudios en el área de la genética humana, la organización mundial de la salud desde 1999, ha publicado las bases éticas sobre

las cuales debe estar cualquier investigación en este ámbito, dentro de las que se incluye la solidaridad (beneficio individual y social), autonomía (independencia de los pacientes de poder tomar una decisión propia, ausencia de daño (que la investigación no incurra en daños para el individuo ni la sociedad) y justicia (principio de equidad); así mismo, el tomar en cuenta factores como la cultura de los pacientes de manera imparcial y la protección de la información genética, siendo esta de carácter reservado (OMS, 1999).

En resumen, se ha determinado que las ECs, son enfermedades multifactoriales en donde se relacionan una extensa cantidad de factores, ya sean aquellos propios del individuo como la edad, el sexo, el origen étnico y la herencia, así como aquellos adquiridos como el hábito tabáquico, la diabetes o el estrés, que pueden alterar diferentes mecanismos de regulación de la hemostasia, función endotelial, inflamación, coagulación sanguínea, que en última instancia podrían ocasionar un IAM, ACV o TVP. Es por esto, que el estudio de alteraciones genéticas que puedan estar afectando de alguna manera el estado natural del sistema circulatorio e inflamatorio, representa una importante herramienta para la creación de nuevos tratamientos y maneras de prevención cada vez más efectivas, y así reducir el número de casos y muertes por ECs a nivel mundial.

Para el caso del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* se ha encontrado que tiene una importante relación con el aumento de los niveles de TNF- α y por ende con una acción exacerbada de la respuesta inflamatoria, teniendo una marcada influencia en el desarrollo de las ECs, principalmente como se demostró en este trabajo, con el desarrollo de IAM, pudiendo convertirse en un importante marcador genético a ser considerado para la estimación o determinación de riesgo asociado a esta enfermedad; con el fin último de crear nuevas y mejores formas de tratamiento, ya sea la implementación de herramientas de nutrigenética de manera individualizada, ramas que cada vez presentan mayor importancia en el tratamiento de las ECs en la actualidad. Asimismo y no menos importante, poder realizar una estimación de riesgo genético en población sana para implementar las modificaciones y recomendaciones necesarias en el estilo de vida y realizar el estudio de seguimiento necesario en el tiempo, con el fin último de la prevención.

VIII. CONCLUSIONES

- La distribución de los alelos para el polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA* se encontró bajo los postulados de equilibrio de Hardy-Weinberg.
- La mayor frecuencia para el alelo de riesgo -308 para el polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* se obtuvo en el grupo de los pacientes con IAM (0,163), seguido por los pacientes con TVP (0,090), y el grupo de pacientes con ACV (0,068) y por último, en el grupo de individuos controles (0,065).
- Se determinó un incremento de casi tres veces en el desarrollo de IAM en presencia del alelo de riesgo -308A del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*. Por su parte, se determinó un incremento de 2,5 veces en el riesgo de desarrollo de HTA.
- Se observó un aumento del riesgo de un 27 % (OR= 1,275) de padecer una TVP en presencia del alelo de riesgo -308A del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, aunque el resultado no fue estadísticamente significativo.
- Se detectó un incremento de un 6 % (OR=1,062) en el riesgo de padecer un ACV en presencia del alelo de riesgo -308A del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, aunque el resultado no fue estadísticamente significativo.
- Se determinó una correlación positiva entre las variables edad, género masculino e HTA con el desarrollo de IAM. Con respecto al desarrollo de TVP, únicamente se determinó una correlación positiva con la variable edad.
- No se encontró correlación positiva entre la presencia de ninguno de los factores de riesgo evaluados y el desarrollo de ACV.
- Se observó que la presencia del alelo de riesgo -308A del polimorfismo -308 G>A (rs1800629) en el gen *TNFA*, está fuertemente relacionado con el desarrollo de IAM, pudiendo servir como un marcador genético importante para esta patología en particular. Además se evidencia la importancia del diagnóstico molecular, con el fin de mejorar el conocimiento de las ECs unido a la utilización de nuevas disciplinas como la nutri y farmacogenética, y así mejorar el tratamiento de las personas con alguna de estas patologías y en el caso de la población sana mejorar la prevención y así disminuir la alta tasa de mortalidad de estas enfermedades.

- No se pudo determinar el efecto aditivo de la presencia de los polimorfismo -308 G>A en el gen *TNFA* (rs1800629), el polimorfismo 20210 G>A (rs1799963) en el gen que codifica para el Factor II y el polimorfismo c.1691 G>A (rs6025) en el gen que codifica para el Factor V, debido que no se encontraron individuos con los él alelo de riesgo para los tres polimorfismo.

IX. FINANCIAMIENTO

El presente Trabajo de Grado fue financiado por el proyecto FONACIT PEI 2012000796 titulado: “*Influencia genética en el desarrollo de patologías aterotrombóticas en la población de Venezuela*”, bajo la responsabilidad de la Prof. Antonietta Porco (USB).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso, A., Richiardi, P. 1994. Apolymorphic variation in a putative regulation box of the *TNFA* promoter region. *Immunogenetics*. **39**:150-154. *Lancet*. **372**:570-584.
- Arkadianos, I., Valdes, A. M., Marinos, E., Florou, A., Gill, R. D. y Grimaldi, K. A. 2007. Improved weight management using genetic information to personalize a calorie controlled diet. *Nutr J*, **6**:29.
- Arnett, D., Claas, S., Glasser, S. 2006. Pharmacogenetics of antihypertensive treatment. *Vasc Pharmacol*. **44**:107-118.
- Bauersachs, R., Riess, H., Hach-Wunderle, V., Gerlach, H., Carnarius, H., Eberle, S., Rabe, E y colaboradores. 2010. Impact of gender on the clinical presentation and diagnosis of deep-vein thrombosis. *ThrombHaemost*. **103(4)**:710-717.
- Benowitz, N. 2003. Hábito de fumar y enfermedades cardiovasculares. *Progress in Cardiovascular Disease*. **46**:91-111.
- Bird, D., Gillette, K., Horkko, S., Firedman, P., Dennos, E., Witztum, J., Steinberg, D. 1999. Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implication with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *P Natl A Sci*. **96**:6347-6352.
- Boersman, E., Mercado, N., Poldermans, D., Gardien, M., Vos, J., Simoons, M. 2003
- Bowen, D y Keeney, S. 2003. Unleashing the long-distance PCR for detection of the intron 22 inversion of the factor VIII gene in severe haemophilia A. *Thromb Haemostasis*. **89**:201-202.
- Brown, K., Luddington, R., Baglin, T. 1998. A common polymorphism in the tuour necrosis factor-alpha gene associated with high TNF levels is not a risk factor for venous thromboembolism. *Brit J Haematol*. **101**:480-482.
- Carrillo, R., Salderón, P., Carvajal, R., Contreras, V., Hernández, C. 2004. Rompiendo un paradigma: del modelo humoral al modelo celular de la coagulación. *Rev Asoc Mex Crit y Ter Int*. **18(1)**:17-23.

- Casas, J., Cooper, J., Millar, G., Hingonari, A., Humphries, S. 2006. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association studies. *Ann Hum Genet.* **109**:1359-1365.
- Chechi, K., Dubey, P., Cheema, S. 2006. Biochemistry of atherosclerosis. Springer, Primera edicion, New York, USA.
- Chu, H., Yang, J., Mi, S., Bhuyan, S., Li, J., Zhong, L., Liu, S y colaboradores. 2012. Tumor necrosis factor-alpha G-308^a polymorphism and risk of coronary heart disease and myocardial infarction: A case-control study and meta-analysis. *J Cardiovasc Dis Res.* **3(2)**:84-90.
- Corrella, D., Ordovás, J. M. 2007. Genética: genes, dieta y enfermedades cardiovasculares. Investigación y Ciencia. **374**:74-83.
- Crepeau, E., Cohn, E., Schell, B. 2005. Terapia ocupacional. Editorial Médica Panamericana. Décima edición. Buenos Aires, Argentina.
- Doggen, C., Manger, V., Bertina, R., Rosendal, F. 1998. Interactions of coagulation defects and cardiovascular risk factors. *Circulation.***97**:1037-1041.
- Dvorkin, M., Cardinali, D., Lermoli, R., 2010. Bases fisiológicas de la práctica médica. Editorial medica panamericana, Decima cuarta edición, Buenos Aires, Argentina.
- Endler, G., Mannhalter, C. 2003. Polymorphism in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin chim Acta.* **330**:31-55.
- Fernandez-Mestre, M., Castro, Y., Montagnani, S., Balbas, O., Layrisse, Z. 2005. Genetic variability of apolipoprotein E in different populations from Venezuela. *Dis Markers.* **21**:15-19.
- Fortunato, G., Di Taranto, M. 2007. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular disease. *ChinChim Acta.* **381**:21-25.
- Fox, E., Kahn, S. 2005. The relationship between inflammation and venous thrombosis. *Thromb Haest.* **94**:362-365.
- Frazier, L., Johnson, R., Sparks, E. 2005. Genomics and cardiovascular disease. *J NursScholarship.* **37(4)**:315-321.

- Frostegard, J. 2013. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* **11**:117-129.
- Gaudens, L. 1984. Manual de hemostasia y coagulacion sanguinea. Ediciones Biblioteca de Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Geordes, J., Rupprecht, H., Blankenberg, S., Poirier, O., Bickel, C., Hafner, G., Nicaud, V. y colaboradores. 2003. Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines. *Am J Cardiol.* **92**:515-521.
- George, S. J., Johnson, J. 2010. Atherosclerosis: Molecular and cellular mechanisms. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Primera edicion, Alemania.
- Ginsburg, D. 2005. Genetic risk factors for arterial thrombosis and inflammation. *Hematology.* **734**:442-444.
- Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B. 2001. Kuby: Immunology. W. H. Freeman and Company, Cuarta Edicion, New York, USA.
- Grimble, R., Howell, W., O'Reilly, G., Turner, S., Markovic, O., Hirrell, S., East, J. y colaboradores. 2002. The ability of fish oil suppress tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells in healthy men is associated with polymorphisms in genes that influence tumor necrosis factor alpha. *Am J Clin Nutr.* **76(29)**:454-459.
- Harakova, K., Chylkova, A., Kolorz, M., Bartosova, L., Pechacek, V., Starostka, D., Wroblowa, K. 2012. Polymorphism G-308A in the promoter of the tumor necrosis factor- α gene and its association with the risk of venous thromboembolism. *Blood Coagul Fibrinolysis.* **23**:316-319.
- Heit, J., Silverstein, M., Mohr, D., Petterson, T., O'Fallon, W., Melton, L. 2000. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med.* **160(6)**:809-815.
- Herrmann, S. M., Ricard, S., Nicaud, V., Mallet, C., Arveiler, D., Evans, A., Ruidavent, J. B y colaboradores. 1998. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest.* **28(1)**:59-66.

- Hershberger, R. 2008. Cardiovascular genetic medicine: evolving concepts, rationale, and implementation. *J Cardiovasc Transl Res.* **1(2)**:137-143.
- Hoffman, M. 2003. A Cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev.* **5**:1-5.
- Hoffman, M., Monroe, D. 2001. A cell-based model of haemostasis. *Thromb Haemostasis.* **58**:958-965.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., Shimoda, T. 2010. Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology.* **49**:1215-1228.
- Humphries, S. E. y Morgan, L. (2004). Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. **Lancet neurology.** **3(4)**: 227–235.
- Janghorbani, M., Hu, F. B., Willett, W. C., Li, T. Y., Manson, J. E., Logroscino, G. y Rexrode, K. M. 2007. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. *Diabetes care.* **30(7)**:1730–1735.
- Janghorbani, M., Hu, F. B., Willett, W. C., Li, T. Y., Manson, J. E., Logroscino, G. y Rexrode, K. M. 2007. Prospective study of type 1 and type 2 diabetes and risk of stroke subtypes: the Nurses' Health Study. *Diabetes care,* **30(7)**:1730–1735.
- Kameneva, M., Garrett, K., Watach, M., Borovetz, H. 1998. Red blood cell aging risk cardiovascular diseases. *Clin Hemorheol Micro.* **18(1)**:67-74.
- Kantake, M., Tanabe, N., Sugiura, T., Shigeta, A., Yanagawa, N., Jujo, T., Kawata, N y colaboradores. 2013. Association of Deep vein thrombosis type with clinical phenotype of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Cardiol.* **165(3)**:474-477.
- Karahan, Z., Deda, G., Sipahi, T., Elhan, A., Akar, N. 2005. TNF- α -308G/A and IL-6 -174G/C polymorphisms in the Turkish pediatric stroke patients. *Thromb Res.* **115**:393-398.
- Keavney, B. 2002. Genetic epidemiological studies of coronary heart disease. *Int J Epidemiol.* **31**:730-736.

- Knight, J., Keating, B., Rockett, K., Kwiatkowski, D. 2003. In vivo characterization of regulatory polymorphism by allele-specific quantification of ARN polymerase loading. *Nat Genet.* **33(4)**: 469-475.
- Kooloos, W., de Jong, D., Huizinga, T., Guchelaar, H. 2007. Potential role of pharmacogenetics in anti-TNF treatment of rheumatoid arthritis and crohn´s disease. *Drug Discov Today.* **12(3)**:125-131.
- Levi, M., van der Poll, T. 2005. Two-way interactions between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.***15**:254-259.
- Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R. 2002. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *TheLancet*, **360(9349)**:1903–1913.
- Li, Y. 2012. Tumor necrosis factor-alpha G308 α gene polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis involving 2244 participants. *PLoS ONE.* **7(4)**:1-7.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaria, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L y colaboradores. 2005. *Biología Celular y Molecular*. W. H. Freeman and Company, Quinta Edición, New York, USA.
- Mckenzie, S. 1999. *Hematología Clínica*. Editorial Manual Moderno, S. A. Edicion en Español. Caracas, Venezuela.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2012. Anuario de mortalidad Venezuela 2010. Dirección de Información y Estadística de la Salud, adscrita a la dirección General de Epidemiología y Análisis Estratégico. Caracas, Venezuela.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). 2014. Anuario de mortalidad Venezuela 2011. Dirección de Información y Estadística de la Salud, adscrita a la dirección General de Epidemiología y Análisis Estratégico. Caracas, Venezuela.
- Mitchell, B., Kammerer, C., Blangero, J., Mahaney, M., Rainwater, D., Dyke, B., Hixson, J y colaboradores. 1996. Genetic and environmental contributions to cardiovascular risk factors in Mexican Americans. *Circulation.* **94**:2159-2170.
- Montoya, W. 2004. *Inmunología*. Corporación de Investigacion Biológica, Decima Tercera Edicion, Medellín, Colombia.

- Navarro, F. 2003. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Revista Española de Cardiología*. **55(4)**:413-431.
- Nedospadov, S., Shakhov, A., Turetskaya, R., Mett, V., Azizov, M., Georgiev, G., Korobko, V y colaboradores. 1986. Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) in the human genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **51**:611-624.
- O'Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S y colaboradores. 2010. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet*, **376(9735)**:112–123.
- Opal, S. 2003. Interactions between coagulation and inflammation. *Scand J Infect Dis*. **35**:545-554.
- Organización mundial de la Salud (OMS). 1999. Servicios para la prevención y el tratamiento de los trastornos genéticos y los defectos congénitos en los países en desarrollo. Informe de una reunión conjunta OMS/WAOPBD. La Haya, Países Bajos.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2008. Las 10 causas principales de defunción. Las 10 causas principales de defunción por grandes grupos de ingresos (2004). Nota descriptiva nº 310.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2009. Situación de salud en las Américas. Indicadores Básicos 2009. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud Oficina del Subdirector Vigilancia de la Salud y Prevención y Control de Enfermedades Información y Análisis de Salud
- Peeters, L. 2001. Thrombophilia and fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. **95**:202-206.
- Pereira, T., Rudnicki, M., Franco, R., Pereira, A., Krieger, J. 2007. Effect of the G-308^a polymorphism of the tumor necrosis factor α gene on the risk of ischemic heart disease and ischemic stroke: A meta-analysis. *Am Heart J*. **153**:821-830.

- Petrea, R., Beiser, A., Seshadri, S., Kelly-Hayes, M., Kase, C., Wolf, P. 2009. Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham Heart Study. *Stroke*. **40(4)**:1332-1337.
- Pieroni, F., Lourenco, D., Morelli, V., Maffei, F., Zago, M., Franco, R. 2007. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). *Thromb Res*. **120**:221-229.
- Prescott, S., McIntyre, T., Zimmerman, G., Stefforini, D. 2002. Molecular events in acute inflammation. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. **22**:727-733.
- Quezada, N. 2001. Trombosis venosa. *Bol Sociedad Peruana Med Inter*. **14(2)**:
- Rodríguez, G., Mago, N., Rosa, F. 2009. El papel de la inflamación en la aterogénesis . Revisión. *Investigacion Clinica*. **50(1)**:109–129.
- Rodríguez, L., Herrera, V., Dorta, E. 1998. Algunos factores de riesgo que favorecen la aparición del infarto agudo al miocardio. *Rev Cubana Med Gen Integr*. **14**:243-249.
- Rodriguez-Larralde, A., Castro, D., Gonzáles-Coira, M., Morales, J. 2000. Frecuencia génica y porcentajes y porcentajes de mezcla en diferentes áreas geográficas de Venezuela, de acuerdo a los grupos RH y AOB. *Interciencia*. **26(1)**: 8-12.
- Roy-O'Railly, M y McCollough, L. 2014. Sex differences in stroke: The contribution of coagulation. *Exp Neurol*. 1-12.
- Rubattu, S., Speranza, R., Ferrari, M., Evangelista, A., Beccia, M., Stanzione, R., Assenza, G. y colaboradores. 2005. A role of TNF- α gene variant on juvenile ischemic stroke: a case-control study. *Eur J Neurol*. **12**:989-993.
- Ruef, J., Peter, K., Nordt, T., Runge, M., Kuber, W., Bode, C. 1999. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to grown factor, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemostasis*. **82**:32-37.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Russel, D. 2001. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Tercera Edition, USA.
- Santos, N., Ribeiro-Rodrigues, E., Ribeiro-Dos-Santos, A., Pereira, R., Gusmão, L.,

Amorim, A., Guerreiro, J. F., Zago, M., Matte, C., Hutz, M. H., Santos, S. E. 2010. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *HumMutat*, **31(2)**:184–190.

- Schoenmakers, S., Reitsma, P., Spek, A. 2005. Blood coagulation factor as inflammatory mediators. *Blood Cell Mol Dis*. **34**:30-37.
- Sookoian, S., Gonzales, C., Pirola, C. 2005. Meta-analysis on the G-308^a tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic síndrome. *Obes Res*. **13(12)**:2122-2131.
- Subbiah, J. 2007. Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine. *Transl Res*. **149(2)**:55-61.
- Swords, N., Mann, K. 2000. Chapter 1. Coagulation Cascade: An overview. W. Kelley: Coagulation and Fibrinolysis. Lippincott S. A. USA.
- Tébar, M. F. y Escobar, T. F. 2009. La Diabetes Mellitus En La Práctica Clínica. Médica panamericana, Madrid, España.
- Thijs, L., Cavalion, J., Cohen, J., Fourrier, F. 2000. Relationships between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med*. **28**:81-82.
- Tousoulis, D., Davies, G., Stefanadis, C., Toutouzas, P., Ambrose, J. 2003. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*. **89**:993-997.
- Unal, S., Gumruk, F., Aytac, S., Yalmzoglu, D., Gurgey, A. 2008. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels and IL-6, TNF-polymorphisms in children with thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. **30(1)**:26-31.
- Vega, C. 2006. Participación de la lipoproteína de baja densidad oxidada en el desarrollo de la placa aterosclerótica. *Angiologia*. **58(1)**:51-56.
- Vendrell, J., Fernandez-Real, J., Gutierrez, C., Zamora, A., Simon, I., Bardaji, A., Ricart, W. y colaboradores. 2003. A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor- α gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. **167**:257-264.

- Weinberg, J., Buchholz, R. TNF-alpha inhibitors. 2006 Birkhauser Verlag, Berlin, Alemania.
- White, H., Chew, D. 2008. Acute myocardial infarction. *Lancet*. **361**:847-858.
- Whitfield, J. 2014. Genetic insights into cardiometabolic risk factors. *Clin Biochem Rev*. **35(1)**:5-36.
- Wilson A. G., de Vries, N., Pociot, F., di Giovine, F. S., van der Putte, L. B., Duff, G. W. 1993. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med*. **177**:557-560.
- Wilson, A. G., di Giovine, F. S., Blakemore, A. I., Duff, G. W. 1992. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF α) gene detectable by *Nco*I restriction of PCR product. *Hum Mol Genet*. **5(1)**:353.
- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., Duff, G. W. 1997. Effects of polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **94**:3195-3199.
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avesum, A., Lanas, F., McQueen, M. y colaboradores. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. **364**:937-952.
- Zhang, H., Xie, S., Wang, J., Chen, Y., Wang, Y., Huang, T. 2011. Tumor necrosis factor-alpha G-308A gene polymorphism and coronary heart disease susceptibility: An updated meta-analysis. *Thromb Res*. **127**:400-405.
- Zhao, Z., Wang, S., Ma, W., Konf, S., Zhang, S., Tang, Y., Zhao, Y. 2014. Diabetes mellitus increases the incidence of deep vein thrombosis after total knee arthroplasty. *Arch Orthop Trauma Surg*. **134(1)**:79-83.

Consultas en línea:

- http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/9326.htm.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007462.1.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NT_007592.15?report=graph&db=nucleotide&v=31482980:31483080&content=5/7m=31483031!&mn=rs1800629
- http://www.companiamedica.com/images/ataque_cerebrovascular2.jpg
- Instituto Nacional de Estadística (INE). 2010. Available at [http:// www.ine.gov.ve](http://www.ine.gov.ve).

XI. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado

CONFIDENCIAL

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

(Hoja 1 de 3)

Título del Estudio: DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Objetivos de la investigación:

Usted está invitado a participar, donando una muestra de su sangre, en un estudio donde mediante análisis genéticos y bioquímicos se detectará la presencia de alteraciones o polimorfismos en genes candidatos para el desarrollo de EC (EC), y por ende con un aumento en riesgo de padecer un infarto agudo del miocardio (IAM).

Procedimientos:

El estudio tendrá una duración de tres años. Si usted acepta participar necesitaremos:

1. De una muestra de sangre (20 cc).
2. Que le suministre al médico tratante la información requerida para rellenar la historia médica.
3. Que podamos contactarlo en caso de requerir una segunda muestra o datos adicionales que complementen dicho estudio.

Con su muestra de sangre se procederá única y exclusivamente al análisis genético y bioquímico que permitan determinar si usted posee algunas de las alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo de EC, en particular IAM.

Los análisis genéticos serán realizados mediante técnicas de biología molecular que permitan identificar las alteraciones en genes relacionados con el metabolismo de los lípidos, disfunción endotelial, sistema renina-angiotensina-aldosterona, coagulación y fibrinólisis. Sumado a ello, las pruebas bioquímicas permitirán corroborar el fenotipo clínico asociado a la presencia de dicha alteración, mediante ensayos que permitan determinar los niveles de las diferentes moléculas involucradas en los distintos procesos.

Las muestras serán almacenadas en el Laboratorio de Genética Molecular Humana bajo la responsabilidad de la Dra. Antonietta Porco y el resto de la muestra será conservada hasta finalizar la investigación después de la cual será desechada.

CONFIDENCIAL

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

(Hoja 2 de 3)

Importancia y beneficios de su participación:

Mediante este estudio, que podrá realizarse gracias a su valiosa colaboración con sólo proporcionar una muestra de su sangre, se podrá avanzar en la comprensión de las causas a nivel genético del desarrollo de la EC. Asimismo, estos resultados permitirán al médico responsable, la aplicación de tratamientos más efectivos para su mejoría y permitirá aplicar los correctivos necesarios para evitar que sufra complicaciones en un futuro.

Por otra parte, además de los beneficios mencionados anteriormente que podrá proporcionarle a corto plazo este estudio, los resultados obtenidos con su muestra a su vez permitirán obtener datos que serán utilizados para establecer una estadística de las causas de la EC en nuestro país. Los resultados obtenidos una vez finalizado este estudio serán publicados en revistas científicas especializadas.

Riesgos:

Su participación no implica riesgo ni inconveniente para su salud ni la de sus familiares.

Confidencialidad:

Todos los datos obtenidos de la investigación serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será solo accesible a los investigadores y médicos involucrados en el estudio. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones que se realicen en eventos científicos.

Derecho a negarse a participar:

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede negarse a participar en el estudio o interrumpir su participación en cualquier momento. Si usted se niega a participar en el estudio, esto no afectará el tipo de atención que recibirá por parte de su médico.

Preguntas:

Debido a que se utilizaron algunos términos técnicos en este formulario de consentimiento, si existe algo que usted no entienda, por favor pregunte sobre esto a su médico.

Por favor tome su decisión de participar en este estudio sólo después de haber examinado detenidamente el contenido de este formulario.

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

(Hoja 3 de 3)

En caso de emergencia o que tenga cualquier pregunta, en cualquier momento sobre el estudio por favor contacte al investigador principal:

Investigador Principal:

Antonietta Porco G.

Centro de Investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Humana B

Universidad Simón Bolívar

Tlfs: 0412 9525180, 02129064217

Correo electrónico: aporco@usb.ve

Médico Responsable:

Centro de Investigación:

Hospital Militar.

Tlfs:

Correo electrónico:

Consentimiento:

Yo, _____ portador(a) de la cédula de identidad _____ he sido informado(a) de manera amplia, clara y sencilla y mis preguntas han sido contestadas en relación al estudio sobre el “Detección de polimorfismos en genes candidatos para el desarrollo de enfermedad cardiovascular”, que se llevará a cabo en forma conjunta entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana B de la Universidad Simón Bolívar (USB, el Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo, coordinado por la Dra. Antonietta Porco y por lo tanto manifiesto estar de acuerdo en participar en él, por lo que autorizo me sean tomadas las muestras sanguíneas necesarias para tal fin. He recibido una copia de este consentimiento.

Nombre y apellido: _____

Firma: _____

Fecha: //

Firma del investigador principal

Testigos:

Nombre y apellido C.I. Firma

1. _____

2. _____

Anexo 2. Planilla de recolección de datos



Registro N° _____

Universidad Simón Bolívar
 División de Ciencias Biológicas
 Departamento de Biología Celular
 Laboratorio de Genética Molecular Humana B

Detección de polimorfismos en genes candidatos para el desarrollo de enfermedad cardiovascular

VI. Datos de identificación del paciente
 Apellidos: _____, Nombres: _____,

F.N _____, Sexo: F ___ M ___, Edad: _____, Referido por: HMPC ___ BMS ___,

Lugar de nacimiento _____, Teléfono _____ / _____, Dirección _____,

Fecha de Ingreso _____, N° Historia Hospital: _____,

Diagnóstico Clínico: IAM ___ IAM(2) ___ CIC ___ Control: ___ Otro _____,

(IAM: infarto agudo del miocardio, CIC: cardiopatía isquémica crónica)

Polimorfismosa determinar: apoB (c.7673C>T) _____, apoE(E₂-E₃-E₄) _____, LPL (c.1595 C>G) _____, CETP (-629 C>A) _____, eNOS (c.984 G>T) _____; MTHFR (c.677C>T) _____; FII (20210 G>A) _____; FV (c.1691G>A) _____, PAI-1-675_674ins _____, Otros _____,

II. Antecedentes Personales

Hábito Tabáquico		Hiperinsulinismo	
Asma		Hipercolesterolemia	
Hipertensión		Hipertrigliceridemia	
Dibetes Mellitus		Hiperhomocisteinemia	
Cateterismo		Hiperhomocisteinuria	
Enfermedad Arterial Periférica		Hipotiroidismo	
Infarto Agudo del Miocardio previo		Hipertiroidismo	
Histria familiar de EC (Padres o Abuelos)		Condición Postmenopáusica	
Trombosis miembros inferiores		Proteinuria	
Historia familiar de Trombosis venosa		Enfermedades ginecológicas de base	
C. Post Bypass		Cirugía Previa	
Angina de Pecho		Nefropatía (Insuficiencia Renal)	
Angina de esfuerzo		Proteinuria	
ACV		Insuficiencia Hepática	
Hemorragias		Anzalthaimer	

Abortos		Parkinson	
Enfermedad ginecológica		Uso Anticonceptivos Orales	
Cirugía Previa		Cáncer	

Obesidad		Otros	
----------	--	-------	--

III.

Bioquímica

Proteínas Totales	PT
	PTT
	INR
Hierro	Niveles de Fibrinógeno (FI)
Albúmina	Actividad de FII
Globulinas	Niveles de FV
Colesterol Total	Proteína S
Triglicéridos Totales	Proteína C
HDLc	Niveles de FIX
LDLc	AT III
IDLc	CKT
VLDLc	CKMB
Glicemia	Troponina T
Úrea	Niveles peroxidación lipídica (MDA)

Creatinina		Otros	
Proteína C Reactiva			
Antifosfolípidos			
Folato, B12			

IV. Tratamiento

Aspirina		Beta Bloqueante:	
		Tipo:	
Clopidogel		Estatina:	
		Tipo:	
Ticlodipina		Antihipertensivos	
Heparina BPM		Otros	
Tipo:			
Anticoagulantes orales:			
Tipo:			

Nitratos:
Nitratos VEV (horas)
Nitratos VO

VI.Observaciones: _____

Anexo 3. Concentraciones y purezas de los ADNg aislados.

Muestra	Concentración (mg/ml)	Pureza (A₂₆₀/A₂₈₀)	Muestra	Concentración (mg/ml)	Pureza (A₂₆₀/A₂₈₀)
Control			Paciente		
0-2c	248,65	1,60	A001	154,00	1,48
0-3c	168,46	1,87	A002	138,00	1,34
0-4c	174,35	1,65	A003	40,00	1,34
0-8c	168,74	1,73	A004	239,00	1,53
0-10c	245,76	1,71	A005	275,00	1,62
0-11c	215,21	1,65	A006	359,00	1,67
0-13c	250,14	1,40	A007	404,00	1,73
0-14c	301,81	1,71	A008	20,00	0,59
0-15c	251,23	2,12	A009	132,00	1,41
0-16c	213,54	1,67	A010	360,00	1,59
0-18c	187,25	1,65	A011	111,00	1,88
0-19c	321,52	1,98	A012	90,00	1,52
0-20c	430,54	2,11	A013	133,00	1,26
0-21c	168,46	1,65	A014	244,00	1,75
0-22c	168,74	1,47	A015	229,00	1,75
0-23c	251,23	1,78	A016	192,00	1,59
0-25c	213,54	1,98	A017	306,00	1,68
0-26c	317,24	2,34	A018	214,00	1,38
0-28c	117,98	1,78	A019	262,00	1,57
0-29c	122,02	1,53	A020	327,00	1,70
0-30c	119,12	1,76	A021	301,00	1,76
0-31c	100,52	1,89	A022	127,00	1,60
0-32c	80,01	1,67	A023	40,00	1,34
0-33c	114,2	1,64	A024	196,00	1,60
0-34c	215,67	1,82	A025	30,00	1,51
0-35c	104,1	1,59	A026	193,00	1,44
0-37c	375,33	1,67	A027	114,00	0,00
0-38c	102,69	1,59	A028	80,00	0,00
0-39c	169,15	2,87	A029	285,00	0,00
0-40c	371,78	1,68	A030	453,00	3,87
0-41c	186,34	1,85	A031	105,00	0,00
0-42c	238,76	1,72	A032	272,00	0,00
0-43c	557,02	1,44	A033	254,00	0,00

0-44c	179,76	2,73	A034	537,00	3,04
0-45c	298,89	1,52	A035	307,00	4,28
0-46c	179,67	1,65	A036	339,00	4,36
0-47c	211,56	1,36	A037	587,00	3,03
0-48c	187,78	1,60	A038	324,00	4,78
0-49c	149,23	1,87	A039	255,00	0,00
0-50c	136,78	1,65	A040	124,00	0,00
0-51c	213,67	1,73	A041	90,00	0,00
0-52c	152,56	1,71	A042	104,00	0,00
0-53c	243,12	1,65	A043	113,00	0,00
0-54c	164,78	1,40	A044	195,00	0,00
0-55c	390,78	1,71	A045	117,00	2,97
0-56c	286,64	1,49	A046	101,00	0,82
0-57c	212,89	1,59	A047	131,00	2,09
0-59c	299,67	1,60	A048	80,00	2,71
0-60c	420,65	1,68	A049	600,00	1,74
0-61c	345,45	1,01	A050	50,00	1,01
0-62c	170,98	1,47	A051	90,00	1,30
0-63c	173,43	1,56	A052	80,00	4,11
0-64c	203,78	1,44	A053	21,00	1,80
0-65c	174,32	1,38	A054	81,00	1,63
0-66c	124,87	1,90	A055	20,00	1,01
0-68c	197,67	1,55	A056	60,00	0,00
0-70c	182,11	1,47	A057	80,00	2,71
0-72c	165,9	1,4	A058	517,00	1,64
0-74c	112,67	1,19	A059	30,00	0,75
0-77c	123,01	1,48	A060	50,00	0,84
0-78c	499,78	1,86	A061	20,00	0,00
0-79c	102,98	1,29	A062	20,00	0,00
0-80c	397,67	1,90	A063	21,00	0,59
0-81c	213,87	1,70	A064	202,00	1,48
0-82c	356,87	1,53	A065	10,00	0,00
0-83c	116,15	1,68	A066	30,00	0,00
0-85c	271,56	1,56	A067	60,00	0,00
0-86c	230,23	1,70	A068	90,00	0,00
0-87c	136,00	1,56	A069	100,00	0,00
0-88c	231,45	1,49	A070	104,00	0,00
0-89c	102,98	1,47	A071	188,00	0,00

0-90c	247,78	1,70	A072	209,00	0,00
0-91c	141,22	1,58	A073	51,00	0,59
0-92c	121,76	1,52			
0-93c	225,65	1,51			
0-94c	334,76	1,51			
0-96c	211,87	1,51			
0-97c	187,78	1,67			
0-98c	287,91	1,40			
0-99c	240,78	1,50			
100c	210,78	1,52			
104c	384,92	1,60			
107c	219,67	1,80			
109c	450,43	1,25			
110c	199,67	1,55			
111c	321,45	1,82			
112c	412,67	1,46			
113c	234,56	1,78			
114c	267,54	2,10			
115c	321,67	2,31			
116c	211,34	1,87			
117c	323,04	1,67			
118c	213,56	1,59			
119c	345,12	1,52			
120c	118,56	1,78			
121c	198,34	2,01			
122c	345,45	1,98			
123c	267,11	1,56			
124c	156,87	1,78			
125c	198	1,67			
PROMEDIO	230,34	1,88	PROMEDIO	182,23	1,29
DESVEST	96,78	0,27	DESVEST	141,27	1,21

Muestra	Concentración (mg/ml)	Pureza (A₂₆₀/A₂₈₀)	Muestra	Concentración (mg/ml)	Pureza (A₂₆₀/A₂₈₀)
Paciente			Paciente		
I-5	150,23	1,49	T-001	83.93	1,87
I-6	138,53	1,68	T-002	69.77	1,89
I-7	154,23	1,62	T-003	208.32	1,85
I-8	458,56	1,84	T-004	93.36	1,87
I-9	315,46	1,45	T-005	93.85	1,87
I-10	581,64	1,55	T-006	101.9	1,85
I-11	324,56	1,78	T-007	166.98	1,87
I-12	215,32	1,67	T-008	59.09	1,85
I-13	274,51	1,59	T-009	48.79	2,3
I-14	68,95	1,64	T-010	64.78	2,14
I-15	158,93	1,91	T-011	87.26	1,87
I-16	147,79	1,82	T-012	136.55	1,86
I-17	493,32	1,56	T-013	81.83	1,86
I-18	374,78	1,78	T-014	64	1,86
I-19	285,92	1,67	T-015	148.59	1,85
I-20	320,76	1,94	T-016	128.77	1,87
I-21	295,45	2,11	T-017	39.51	1,84
I-22	305,21	2,89	T-018	68.23	1,88
I-23	154,25	1,42	T-019	16.49	1,96
I-24	206,29	1,69	T-020	26.75	1,94
I-25	457,12	1,58	T-021	211	1,83
I-26	225,24	1,72	T-022	19.37	1,89
I-27	117,98	1,81	T-023	190.68	1,84
I-28	464,65	1,8	T-024	126.02	1,82
I-29	344,9	1,56	T-025	14.63	2,09
I-30	154,51	1,76	T-026	22.95	1,93
I-31	450,21	1,79	T-027	4.6	1,92
I-32	295,45	2,22	T-028	50.79	1,9
I-33	110,65	1,45	T-029	27.27	2,04
I-34	305,21	1,67	T-030	72.1	1,86
I-35	154,25	1,94	T-031	35.55	1,93
I-36	457,12	1,63	T-032	91.4	1,89
I-37	280,78	1,56	T-033	29.86	2,01
I-38	225,24	1,83	T-034	70.79	1,89
I-39	177,01	1,45	T-035	37.26	1,92

I-40	117,98	1,59	T-036	50.37	1,89
I-41	464,65	1,65	T-037	12.66	2
I-42	154,51	1,31	T-038	91.13	1,89
I-43	450,21	2,12	T-039	118.31	1,89
I-44	150,23	1,87	T-040	41.8	1,94
I-45	450,08	1,73	T-041	68.88	1,88
I-46	839,36	1,79	T-042	72.76	1,87
I-47	138,53	1,54	T-043	85.06	1,86
I-48	154,23	1,72	T-044	163.83	1,87
I-49	458,56	1,39	T-045	78.19	1,54
I-50	315,46	1,59	T-046	141.46	1,8
I-51	581,64	1,78	T-047	124.65	1,72
I-52	324,56	1,67	T-048	118.25	1,81
I-53	215,32	1,81	T-049	48.95	1,55
I-0.2	174,51	1,66	T-050	79.33	1,67
I-0.3	68,95	1,61	T-051	80.46	1,9
I-0.4	158,93	1,73	T-052	112.21	1,6
I-0.5	174,79	1,88	T-053	69.02	1,86
I-0.6	493,32	1,51	T-054	96.54	1,8
I-0.7	374,78	1,67	T-055	49.12	1,87
I-0.8	285,92	1,84	T-056	59.40	1,83
I-0.9	320,76	1,48	T-057	112.78	1,92
I-0.10	323,89	1,72	T-058	37.15	1,88
I-0.11	123,78	1,36	T-059	131.81	1,76
I-0.12	189,78	2,22	T-060	31.99	1,9
I-0.13	411,76	2,1	T-061	61.25	2,05
I-0.14	254,56	2,01	T-062	34.13	1,7
I-0.15	287,78	1,96	T-063	53.10	1,86
I-0.16	267,43	1,89	T-064	59.04	1,93
I-0.17	221,76	1,39	T-065	84.62	1,78
I-0.18	261,34	1,78	T-066	93.58	1,99
I-0.19	342,54	1,49	T-067	86.44	1,84
I-0.20	312	1,83	T-068	79.36	1,88
I-0.21	276,86	1,81	T-069	78.81	1,87
I-0.22	156,86	1,72	T-070	25.78	1,96
I-0.23	186,43	1,66	T-071	24.20	1,94
I-0.24	224,76	1,59	T-072	111.96	1,64
I-0.25	278,54	1,73	T-073	16.78	1,59

I-0.26	298,13	1,68	T-074	126.32	1,83
I-0.27	71,75	1,59	T-075	86.88	2,09
I-0.28	187,86	1,51	T-076	34.47	1,9
I-0.29	154,87	1,67	T-077	66.33	1,89
I-0.30	229,23	1,69	T-078	17.16	1,75
I-0.31	375,67	1,83	T-079	96.00	2,1
I-0.32	317,71	1,59	T-080	98.29	1,89
I-0.33	422,24	1,65	T-081	113.77	1,93
I-0.34	298,56	1,41	T-082	34.46	1,82
I-0.35	276,54	1,78	T-083	131.11	2,1
I-0.36	217,53	1,83	T-084	41.27	1,88
I-0.37	267,62	1,63	T-085	97.00	1,92
I-0.38	286,91	1,6	T-086	59.65	1,85
I-0.39	381,57	1,82	T-087	83.80	1,69
I-0.40	145,35	1,69	T-088	30.04	1,74
I-0.41	176,71	1,8	T-089	23.86	1,6
I-0.42	198,01	1,62	T-090	66.67	1,72
I-0.43	256,67	1,58	T-091	116.34	1,88
I-0.44	273,23	1,71	T-092	114.28	1,93
I-0.45	256,34	1,62	T-093	126.34	2,09
I-0.46	198,97	1,41	T-094	46.17	1,87
I-0.47	179,67	1,86	T-095	64.20	1,55
I-0.48	167,78	1,74	T-096	59.49	1,76
I-0.49	287,54	1,76	T-097	77.62	1,98
I-0.50	311,87	1,71	T-098	140.91	1,82
I-0.51	266,72	1,86	T-099	110.51	1,6
I-0.52	276,56	1,54	T-100	126.87	1,92
PROMEDIO	274,86	1,71	PROMEDIO	78.67	1,87
DESVEST	126,47	0,19	DESVEST	43.59	0,12