

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio de los polimorfismos de los genes de
interleucina-1 (*IL 1*) y del antagonista del receptor de
interleucina-1 (*IL 1RM*) en pacientes mexicanos con
infarto agudo del miocardio**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Biología Experimental

Presenta:

Biol. Exp. Nadia Mabel Pérez Vielma

Co-directores:

**José Luis Gómez Olivares
Gilberto Vargas Alarcón**

Asesor:

Héctor Fernando Serrano

Comité Tutorial

CO-DIRECTOR

Dr. José Luis Gómez Olivares

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
gool@xanum.uam.mx

CO-DIRECTOR

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Laboratorio de Biología Molecular
Departamento de Fisiología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
gvargas63@yahoo.com

ASESOR

Dr. Héctor Fernando Serrano

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
hser@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

La maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT, con número de registro UAM-I: 309-0 y con clave: C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 198086.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "**Estudio de los polimorfismos de los genes de interleucina-1 (*IL1*) y del antagonista del receptor de interleucina-1 (*IL1RN*) en pacientes mexicanos con infarto agudo del miocardio**" con fecha **28 de mayo de 2008**.

Jurado de Examen

Presidente

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario

Dr. Héctor Fernando Serrano

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal

Dr. Samuel Canizales Quinteros

Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica
Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

Vocal

Dr. David Cruz Robles

Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo brindado a la investigación en México y sobre todo a la formación de nuevos investigadores.

A la Maestría en Biología Experimental por haberme recibido en sus aulas y laboratorios.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares, primero que nada por haberme recibido en su laboratorio desde hace 6 años. Por sus enseñanzas tanto de biología celular e inmunología como de la vida. Y sobre todo por impulsarme a seguir en la investigación cuando más lo he necesitado.

Al Dr. Héctor F. Serrano, por las facilidades brindadas para utilizar su laboratorio y el kit de extracción de ADN.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por su apoyo brindado para realizar la parte correspondiente a haplotipos de riesgo.

Al laboratorio de Biomembranas de la UAM-Iztapalapa por el apoyo para conseguir el kit de ELISA para cuantificar la IL-1 β sérica.

Al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología por haberme permitido realizar el estudio molecular de este proyecto.

A todos los profesores de la Maestría en Biología Experimental, especialmente al Dr. Pablo Matzumura y a la Dra. Mina Konigsberg por todo su apoyo, interés y dedicación para cada uno de los alumnos de la Maestría.

Dedicatorias

A mis padres y a mi hermana por todo su apoyo, sin ustedes no habría podido concluir esta parte tan importante de mi vida.

A mí querido Alfonso por su apoyo y comprensión, especialmente durante estos últimos años.

A mis compañeros de la maestría Oreth, Karla, Gloria, Martha, Luis Antonio, Mario Fernando y Gerardo; por la convivencia, el apoyo y la amistad que me brindaron.

A mis amigos de toda la vida Guadalupe y Jorge, por los consejos y la ayuda para seguir por el camino de la Biología Experimental.

A mis queridos compañeros del laboratorio de Biomembranas Guille, Juanita, Faride, Sinuhé, Benjamín, Gustavo y Jorge; por su amistad pero sobre todo por su apoyo en estos últimos años para la realización de este trabajo.

A mi querida amiga Lupita por su amistad, por su apoyo en los tiempos difíciles y por enseñarme a luchar y a seguir adelante siempre.

A mis amigas Samantha y Varenka por su amistad y su comprensión que a perdurado a través de los años.

Índice General

	Página
Lista de figuras y tablas	XI
Abreviaturas	XIV
Resumen	XVI
Abstract	XVII
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Aterosclerosis: Respuesta inflamatoria ante la retención de lipoproteínas	3
2.2. Síndromes coronarios agudos	13
2.3. Citocinas	22
2.3.1. Sistema de moléculas de interleucina-1	23
2.4. Genes <i>IL1</i> e <i>IL1RN</i>	27
2.4.1. Gen <i>IL1B</i>	30
2.4.2. Gen <i>IL1F10</i>	32
2.4.3. Gen <i>IL1RN</i>	33
3. Antecedentes	37
4. Justificación	38
5. Objetivos	39
5.1. Objetivo General	39
5.2. Objetivos Particulares	39

6. Hipótesis	40
7. Materiales y Métodos	41
7.1. Diseño del estudio	41
7.2. Estrategia general	41
7.3. Sujetos de estudio	43
7.3.1. Criterios de inclusión	44
7.3.2. Criterios de exclusión	45
7.4. Estudio bioquímico	46
7.4.1. Cuantificación de IL-1 β	46
7.4.2. Análisis de resultados	47
7.5. Estudio molecular	49
7.5.1. Extracción de ADN	49
7.5.2. Análisis de sitios polimórficos	50
7.5.3. Determinación de los polimorfismos	50
7.5.3.1. Polimorfismo IL-1B-511	51
7.5.3.2. Polimorfismos IL1F10.3, IL1RN.6/1C>T e IL1R/N.4T>C	53
7.5.3.3. Polimorfismo IL1RN.6/2C>G	54
7.5.3.4. Polimorfismo IL1RNVNTR	55
7.5.4. Haplotipo de Riesgo	57
7.5.5. Análisis de resultados	58

8. Resultados	59
8.1. Estudio bioquímico	59
8.1.1. Cuantificación de IL-1 β sérica	59
8.2. Estudio molecular	61
8.2.1. Polimorfismo IL-1B-511	61
8.2.2. Polimorfismos IL-1F10.3, IL1RN.6/1C>T e IL1R/N.4T>C	63
8.2.3. Polimorfismo IL1RN.6/2C>G	66
8.2.4. Polimorfismo IL1RNVNTR	67
8.2.5. Haplotipo de riesgo	70
9. Discusión	72
10. Conclusiones	83
11. Perspectivas	84
12. Bibliografía	86
Glosario	94
Anexo I	97
Descripción de las técnicas del estudio bioquímico	97
I.1. Técnica de ELISA	97

Cuantificación de la proteína IL-1 β mediante la técnica de ELISA	97
 Anexo II	 100
Descripción de las técnicas del estudio molecular	100
II.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
II.2. Fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's)	102
II.3. PCR en tiempo real	103
Agentes intercalantes	103
Sondas de hibridación específicas	104
1. Sondas de hidrólisis	105
2. Molecular beacons	107
3. Sondas FRET	108
II.4. Mapas genómicos	109

Lista de Figuras y Tablas

FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.	Etapa inicial de la formación de una placa arteriosclerótica.	8
2.	Papel de la respuesta inflamatoria durante el inicio de la aterosclerosis.	10
3.	Reclutamiento y activación de linfocitos T en la formación de un ateroma.	12
4.	Inicio, progresión y complicación de una placa arteriosclerótica.	13
5.	Formación y rompimiento de la placa arteriosclerótica culminando en IAM.	20
6.	Moléculas pertenecientes a la familia de IL-1.	26
7.	Localización de los genes de la familia de IL-1 en el cromosoma 2.	28
8.	Síntesis y procesamiento de IL-1 β .	31
9.	Síntesis de IL-1ra.	34
10.	Estrategia general empleada en el presente estudio.	42
11.	Curva de estandarización de la técnica de ELISA y ecuación de la recta obtenida por regresión lineal.	47
12.	Producto de PCR del polimorfismo IL-1B-511.	52
13.	Patrón de restricción del polimorfismo IL-1B-511 utilizando la enzima Ava I.	52
14.	Mapa de discriminación alélica para el polimorfismo IL1R/N.4T>C.	53
15.	Producto de PCR del polimorfismo IL1RN.6/2C>G.	54

16.	Patrón de restricción del polimorfismo IL1RN.6/2C>G con la enzima Fok I.	55
17.	Alelos 1 y 2 del polimorfismo IL1RNVNTR.	56
18.	Alelos 1 y 5 del polimorfismo IL1RNVNTR.	57
19.	Mapa de haplotipos del grupo de pacientes con IAM y del grupo de individuos sanos.	70
20.	Esquematización de la técnica de ELISA	99
21.	Mecanismo de las sondas de hidrólisis o sondas Taqman.	107
22.	Mecanismo de los molecular beacons.	108
23.	Sondas FRET.	109
24.	Meiosis informativa y no informativa.	111
25.	Marcador RFLP's.	113

Tablas

Tabla	Descripción	Página
1.	Nomenclatura para la familia IL-1.	29
2.	Alelos, repeticiones y características del polimorfismo IL1RNVNTR del gen <i>IL1RN</i> .	35
3.	Relación entre polimorfismos y enfermedades que han sido previamente reportados en diferentes poblaciones.	37
4.	Polimorfismos incluidos en el presente estudio, nombre oficial de éstos, técnica empleada para su determinación e iniciadores específicos utilizados.	51
5.	Designación de alelos de acuerdo con los pesos moleculares correspondientes al polimorfismo IL1RNVNTR.	56
6.	Estadística descriptiva de la cuantificación sérica de IL-1 β en los grupos de pacientes e individuos sanos.	60
7.	Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IL-1B-511 en los grupos de pacientes con IAM y de individuos sanos.	62
8.	Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IL-1F10.3 en el grupo de pacientes con IAM y en el grupo de individuos sanos.	64
9.	Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IL1RN.6/1C>T.	65
10.	Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo R/N.4T>C.	65
11.	Comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IL1RN.6/2C>G.	66
12.	Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo IL1RNVNTR.	69
13.	Frecuencia del diplotipo 2/T en el grupo de pacientes e individuos sanos.	71
14.	Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR-TR	106

Abreviaturas

A	Adenina	icIL-1raI	IL-1ra intracelular no glicosilada I
AcP IL-1R	Proteína accesoria del complejo del receptor de IL-1	icIL-1raII	IL-1ra intracelular no glicosilada II
C	Citosina	IFN-γ	Interferón- gama
células NK	Linfocitos citolíticos naturales	Ig	Inmunoglobulinas
cM	Centimorgans	IL-1	Interleucina 1
CRP	Proteína C reactiva	IL-1α	Interleucina-1 alfa
DL	Desequilibrio de ligamiento	IL1A	Gen que codifica para la proteína IL-1 alfa
ELISA	Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas	IL1B	Gen que codifica para la proteína IL-1 beta
EMA	Enfermedad de las arterias coronarias afectando múltiples arterias	IL1F10	Gen que codifica para la proteína IL-1F10
ESA	Enfermedad de las arterias coronarias afectando una sola arteria	IL-1ra	Antagonista del receptor de interleucina 1
FRET	Transferencia de energía fluorescente mediante resonancia.	IL1RN	Gen que codifica para la proteína IL-1ra
FT	Factor tisular	IL1RN*2	Alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR
G	Guanina	IL1RN*2*2	Alelo 2 en del polimorfismo IL1RNVNTR en forma homocitogota
HSP60	Proteína de choque térmico	IL-1β	Interleucina-1 beta
IAM	Infarto agudo del miocardio	INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IC	Intervalo de confianza	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
ICE	Enzima convertidora de IL-1 beta		

LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas	sIL-1ra	IL-1ra soluble glicosilada
LPS	Lipopolisacárido	STR	Repeticiones cortas en tandem
mARN	Ácido ribonucleico mensajero	T CD4+	Subpoblación de linfocitos T cooperadores que expresan CD4
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1	T CD8+	Subpoblación de linfocitos T citotóxicos que expresan CD8
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos	T	Timina
MMPs	Metaloproteasas de matriz	TGF-β	Factor transformante de crecimiento beta
MPM	Marcador de peso molecular	Th1	Subpoblación de linfocitos T cooperadores, secretan IFN-gama
NF-κB	Factor nuclear- κB	Th2	Subpoblación de linfocitos T cooperadores, secretan IL-4 e IL-5
OMS	Organización Mundial de la Salud	TIMPs	Inhibidores de tejido de metaloproteasas
pb	Pares de bases	TLRs	Receptores tipo "Toll"
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TNF-α	Factor de necrosis tumoral-alfa
PCR-TR	PCR en tiempo real	VCAM-1	Molécula de adhesión al endotelio vascular 1
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
RFLP's	Fragmentos de restricción polimórfica	VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
rhIL-1ra	IL-1ra recombinante humana	VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
RM	Razón de momios		
ScRs	Receptores "basureros" o scavenger		
SICA	Síndromes isquémicos coronarios agudos		
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido		

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son el principal problema de salud a nivel mundial, en nuestro país las enfermedades isquémicas del corazón son la segunda causa de muerte. El infarto agudo del miocardio es un padecimiento isquémico coronario agudo que se caracteriza por una interrupción abrupta del flujo arterial coronario, generalmente relacionado a lesiones causadas por placas arterioscleróticas.

Desde principios de los 90s se hizo énfasis en el papel prominente de la inflamación en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis y del IAM. Se han realizado diversos estudios tratando de dilucidar el papel de las moléculas relacionadas con la inflamación en la patogenia de la enfermedad. Tal es el caso de las citocinas como la IL-1 β e IL-1ra. En el presente estudio se investigó la relación entre los polimorfismos de los genes que codifican para estas proteínas (*IL1B*, *IL1F10* e *IL1RN*) y la propensión hacia el IAM, en una muestra de la población mexicana.

En el estudio se incluyeron al menos 100 individuos mestizos mexicanos con diagnóstico de IAM, ingresados a la unidad coronaria del INC, y al menos 100 individuos mestizos mexicanos libres de síntomas y sin antecedentes clínicos o familiares de enfermedad cardiovascular.

Se determinó la frecuencia de los polimorfismos IL-1B-511, IL1F10.3, IL1RNVNTR, IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G en las muestras de pacientes y de individuos sanos. Posteriormente, se obtuvo el haplotipo de riesgo con los polimorfismos del gen *IL1RN*. Así mismo, se cuantificó la proteína IL-1 β sérica en ambos grupos de estudio.

El alelo 2 ($p=0.0000201$; RM=3.560, IC al 95% de 1.957 – 6.473) y el genotipo 1/2 ($p=0.0000631$; RM= 4.04, IC al 95% de 1.89 – 8.81) del polimorfismo IL1RNVNTR mostraron una asociación con la propensión al IAM. Al analizar los resultados del polimorfismo IL-1B-511 se observó una tendencia entre el grupo de pacientes y el de individuos sanos en el genotipo CC ($p=0.053$; RM=2.58 IC al 95% de 0.89-7.82), por lo que dicho genotipo podría considerarse de propensión hacia el padecimiento de la enfermedad. En el análisis del polimorfismo IL1F10.3, se utilizó un modelo dominante para evaluar el genotipo TT contra los genotipos TC y CC (TT vs TC + CC) obteniéndose un valor de *p dominante* de 0.05815 (RM=1.699, IC al 95% de 0.980-2.943), lo cual indica que existe una tendencia hacia que los genotipos TC y CC confieran un mayor riesgo hacia el padecimiento, mientras que el genotipo TT confiere un riesgo menor. Los polimorfismos IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el de individuos sanos.

El alelo 2 y el genotipo 1/2 del polimorfismos IL1RNVNTR están asociados con la susceptibilidad hacia el desarrollo del IAM en pacientes mexicanos. El genotipo CC del polimorfismo IL-1B-511 podría considerarse de propensión al IAM mientras que el genotipo TT del polimorfismo IL1F10.3 puede ser considerado como de protección hacia el desarrollo de la patología. El polimorfismo IL1RN.6/1(T) se encuentra en DL con el polimorfismo IL1RNVNTR (2) en el grupo de pacientes y los individuos portadores de este diplotipo son aproximadamente 4 veces más susceptibles de padecer IAM. Los resultados de la cuantificación de la IL-1 β sérica indican que no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de dicha citocina entre el grupo de pacientes y el de individuos sanos, ni en relación con los diferentes genotipos analizados.

Abstract

Cardiovascular diseases are the first health problem around the world and cardiac ischaemic disease is the second major death cause in Mexico. Myocardial infarction (MI) is an acute coronary syndrome characterized by an interruption of the blood flow through the coronary artery, which is normally associated with coronary lesions caused by atherosclerotic plaques.

Since the early 90s a consensus has emerged that inflammation plays a decisive role in the pathophysiology of atherosclerosis and MI. Several studies have tried to elucidate the role of inflammation molecules in the pathogenesis of the disease, including cytokines such as IL-1 β and IL-1ra. Our purpose was to investigate the relationship between the polymorphisms of the genes coding for the *IL1B*, *IL1F10* and *IL1RN* proteins and the propensity to MI in a Mexican population sample.

At least 100 Mexican Mestizos with MI diagnosis and 100 healthy Mexican Mestizos without cardiovascular disease history were included in this study.

The frequency of the IL-1B-511, IL1F10.3, IL1RNVNTR, IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T and IL1RN.6/2C>G polymorphisms was determined in DNA samples from patients and healthy individuals along with the seric protein IL-1 β from both groups. The risk haplotype was obtained with the gene *IL1RN* polymorphisms.

The 2 allele ($p=0.0000201$; OR=3.560, 95% CI: 1.957 – 6.473) and the 1/2 genotype ($p=0.0000631$; OR= 4.04, 95% CI: 1.89 – 8.81) from the IL1RNVNTR polymorphism showed an association with the propensity to MI. A tendency in the CC genotype ($p=0.053$; OR=2.58, 95% CI: 0.89-7.82) between patients and healthy individuals was observed when the results of IL-1B-511 polymorphism were analyzed, such genotype could indicate propensity to MI. A dominant model was used for the analysis of the IL1F10.3 polymorphism, the TT genotype was compared against the TC and CC genotypes (TT vs TC + CC). The *p dominant* value ($p=0.05815$; OR=1.699, 95% CI: 0.98-2.94) indicates that TC and CC genotypes provide a major risk to MI, while the TT genotype confers a minor risk. The IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T and IL1RN.6/2C>G polymorphisms did not show statistical significant differences between patients and healthy individuals.

The 2 allele and the 1/2 genotype from the IL1RNVNTR polymorphism are associated with susceptibility to MI in Mexican patients. The CC genotype from the polymorphism IL-1B-511 could be considered of propensity to MI, while the TT genotype from the polymorphism IL1F10.3 could be accounted for protection against that pathology. The polymorphisms IL1RN.6/1(T) and IL1RNVNTR (2) are in LD (linkage disequilibrium) in the patients group, the diplotype carriers are almost 4 times more susceptible to MI. The results of the quantification of the seric IL-1 β showed no significant statistical differences between patients and healthy individuals, nor with the analyzed genotypes.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares representan el principal problema de salud a nivel mundial. Cada 4 segundos ocurre un síndrome isquémico coronario agudo y cada 5 segundos un infarto cerebral provocando la muerte de 17 millones de personas anualmente. En la actualidad, dichas patologías son la quinta causa de muerte en el mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2020 serán la primera causa de mortalidad (Pavia y Lara, 2005).

En México se ha registrado un cambio epidemiológico en las últimas décadas; las enfermedades infecciosas han dejado de ocupar los primeros lugares de morbilidad y mortalidad, y en su lugar las enfermedades cronicodegenerativas son la primera causa de muerte después de los 20 años de edad. Existe un incremento en la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares de 20.3 por cada 100 000 habitantes en 1960 a 69.4 en 1970, misma que se ha mantenido hasta la actualidad (Pavia y Lara, 2005).

En el año 2000, las enfermedades del corazón, la diabetes mellitus, los tumores malignos y los padecimientos cerebrovasculares, fueron las principales causas de muerte entre la población adulta mayor. De cada 100 individuos, casi 23 mueren por enfermedades cardíacas (INEGI, 2004) mientras que, en la población en edad productiva (15 a 64 años), las enfermedades isquémicas del corazón son la tercera causa de muerte en dicho grupo y la segunda causa en la población general. Así mismo, este tipo de enfermedades son la principal causa de muerte en la población

masculina y la segunda en la población femenina (INEGI, 2003). El 78% de las muertes por cardiopatía isquémica se deben a infarto agudo del miocardio (Pavia y Lara, 2005).

Existen diversas enfermedades cardíacas, las cuales pueden clasificarse en: arritmias, valvulopatías o trastornos de las válvulas mitral, tricúspide y aórtica; así como endocarditis, pericarditis, miocarditis, miocardiopatías, cardiopatías, insuficiencia cardíaca y tumores del corazón. Dentro de las cardiopatías se encuentra la cardiopatía isquémica, en la que se distinguen, a su vez los síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA) representados por el infarto agudo del miocardio (IAM) y la angina de pecho (Guadalajara, 1997).

El IAM se caracteriza por una interrupción abrupta y súbita del flujo arterial coronario, generalmente relacionada con fenómenos trombóticos agudos asociados con lesiones coronarias causadas por placas arterioscleróticas (Fuster *et al.*, 1992; Libby, 2002; Hansson, 2005; Hansson *et al.*, 2006). Dependiendo del tiempo de duración de la obstrucción trombótica y de la pérdida de irrigación miocárdica, se desencadenan una serie de alteraciones las cuales se pueden observar inicialmente en los miocitos y promueven el deterioro, con consecuencias desastrosas, en la anatomía regional y parietal del corazón (Fuster *et al.*, 1992 y Fuster *et al.*, 1999).

2. Marco Teórico

2.1. Aterosclerosis: Respuesta inflamatoria ante la retención de lipoproteínas

La aterosclerosis se define como una enfermedad caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias grandes; dicha enfermedad es el principal factor responsable del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Libby, 2002).

La visión de la fisiopatología de esta importante enfermedad ha evolucionado sustancialmente. En el siglo XIX, la hipótesis de incrustación y la de los lípidos explicaban la patogénesis de la aterosclerosis. La primera de éstas, propuesta por von Rokitansky en 1852, sugería que el engrosamiento de la intima se debía a la acumulación de fibrina, con una subsecuente organización de fibroblastos y a un depósito secundario de lípidos. La hipótesis de los lípidos propuesta en 1856 por Virchow sugería que los lípidos de la pared arterial provenían de los lípidos de la sangre y que posteriormente formaban complejos con los mucopolisacáridos, dichos complejos se acumulaban debido a que el mecanismo de acumulación predominaba sobre el de remoción (Fuster *et al.*, 1992). La conexión existente entre los lípidos y el desarrollo de la enfermedad dominó hasta 1970; basada en las relaciones experimentales y clínicas entre la hipercolesterolemia y el ateroma. Entre 1970 y 1980 el conocimiento emergente de la biología vascular puso énfasis en los factores de crecimiento y la proliferación del músculo liso. La fusión de conocimientos llevó al concepto del ateroma

como un cementerio de residuos lipídicos acelulares envueltos por una cápsula de células de músculo liso en proliferación (Libby, 2002).

Durante la década pasada, se comenzó a apreciar el papel prominente de la inflamación en la aterosclerosis y sus complicaciones; especialmente con la integración de las observaciones dentro de una hipótesis más compleja denominada "hipótesis de respuesta al daño". Ésta plantea el daño al endotelio como el paso que provoca la interacción de macrófagos, plaquetas, células del músculo liso y células endoteliales culminando en el desarrollo de la lesión arteriosclerótica. Dicha interacción se lleva a cabo mediante la síntesis o liberación de quimioatrayentes y factores de crecimiento provenientes de las células antes mencionadas. El daño endotelial puede inducir la liberación de factores de crecimiento que estimulan a las células presentes en la arteria de manera autocrina y paracrina (Ross, 1986).

Anteriormente, el ateroma era considerado como una sencilla acumulación de lípidos; hoy en día la noción de que la inflamación y la respuesta inmune contribuyen a la arteriogénesis ha generado un creciente interés. Esto ha impulsado un gran número de investigaciones que han aportado evidencias clínicas que demuestran que la inflamación desempeña un papel clave en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, a tal grado que actualmente es considerada como una enfermedad inflamatoria (Ross, 1986 y 1999; Becker *et al.*, 2001; Libby, 2001 y 2002; Carrillo y Bear, 2004; Hansson *et al.*, 2006).

La histopatología de la aterosclerosis revela un proceso inflamatorio activo. Las lesiones arterioscleróticas, denominadas ateromas o placas arterioscleróticas, se presentan de manera general como adelgazamientos centrales de la íntima; la capa más profunda de

la arteria. Las lesiones se componen de células, elementos del tejido conectivo, lípidos y desechos celulares. La mayoría de las células que se encuentran en el ateroma son células inflamatorias derivadas de la sangre y las restantes son células endoteliales y de músculo liso. El ateroma es precedido cronológicamente por las estrías grasas, las cuales son sitios de acumulación de gotas de lípidos y células del sistema inmune. Los macrófagos llenos de lípidos, llamados células espumosas, predominan en las estrías grasas; éstas también contienen linfocitos T, células dendríticas y células cebadas. Las estrías grasas prevalecen en individuos jóvenes, nunca causan síntomas y pueden progresar hacia ateromas o bien desaparecer (Fuster *et al.*, 1992; Hansson *et al.*, 2006).

El ateroma es estructuralmente más complejo que la estría grasa. En el centro del ateroma, las células espumosas, las células muertas y las gotas lipídicas extracelulares forman un núcleo, rodeado por una capa de células de músculo liso y una matriz rica en colágeno. Linfocitos T inmunocompetentes y macrófagos infiltran la lesión y son particularmente abundantes en la región del ateroma que se encuentra en crecimiento y en la interfase entre la capa de músculo liso y el núcleo. La mayoría de las células del sistema inmune que se encuentran en el ateroma muestran signos de activación y producen citocinas pro-inflamatorias (Fuster *et al.*, 1992; Hansson, 2005; Hansson *et al.*, 2006).

La fase inicial de la aterosclerosis es una respuesta de tipo inflamatoria inducida por la retención de lipoproteínas en la intima de la arteria. Cuando los niveles plasmáticos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) aumentan, infiltran la pared arterial a un grado que excede la capacidad de su eliminación y son por tanto retenidas en la matriz extracelular, como se ilustra en la figura 1 (Ross, 1999; Carrillo y Bear; 2004; Hansson *et al.*, 2006).

La modificación de las proteínas LDL por ataque enzimático u oxidación no-enzimática en donde se engloban procesos como oxidación, glucosilación, agregación, asociación con proteoglicanos o incorporación a complejos inmunes en la íntima; provocan la liberación de fosfolípidos que activan a las células endoteliales, que a su vez expresan diversos tipos de moléculas de adhesión a leucocitos, las cuales causan la adhesión al sitio de activación de las células sanguíneas que circulan y tienen contacto con la superficie vascular. Debido a que la molécula de adhesión al endotelio vascular 1 (VCAM-1) se sobre-expresa en respuesta a este estímulo, las células con receptores a esta molécula, como los monocitos y los linfocitos, se adhieren a estos sitios de activación. Adicionalmente a los leucocitos mononucleares, las plaquetas también se adhieren a las células endoteliales activas (Ross, 1999; Hansson *et al.*, 2006).

De igual forma, se ha observado que las selectinas P y E, además de VCAM-1, contribuyen al reclutamiento de leucocitos en ratones susceptibles a la aterosclerosis. Se ha observado que los constituyentes de las lipoproteínas modificadas, como algunos fosfolípidos oxidados y aldehídos de cadena corta, producto de la oxidación de las lipoproteínas, pueden inducir la transcripción del gen VCAM-1 mediada en parte por el factor nuclear- κ B (NF- κ B). Las citocinas pro-inflamatorias tales como la interleucina-1 β (IL-1 β) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) inducen la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales a través de esta vía. Por lo tanto, las citocinas pro-inflamatorias pueden ligar la hipercolesterolemia con la expresión de VCAM-1 (García-Moll y Kaski, 1999; Libby, 2002).

La activación endotelial ocurre preferentemente en sitios de tensión hemodinámica. El flujo hemodinámico típico en los segmentos propensos a la aterosclerosis causa un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y de genes inflamatorios en las

células endoteliales y, al igual que la acumulación de LDL, promueve la inflamación (Hansson *et al.*, 2006).

Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos migran hacia la intima, mediante diapédesis, a través de las células endoteliales y sus uniones (figura 1). La migración ocurre en respuesta a los estímulos quimioatrayentes, incluyendo quimiocinas. Diversos tipos de quimiocinas participan en el reclutamiento de varias clases de leucocitos, entre éstas se encuentra la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), que atrae monocitos y linfocitos T y B; así como la quimiocina IP-10 inducida por interferón- γ (IFN- γ). También se ha observado que la IL-8 juega un papel similar en la quimioatracción de leucocitos durante la arteriogénesis (Libby, 2002; Hansson *et al.*, 2006).

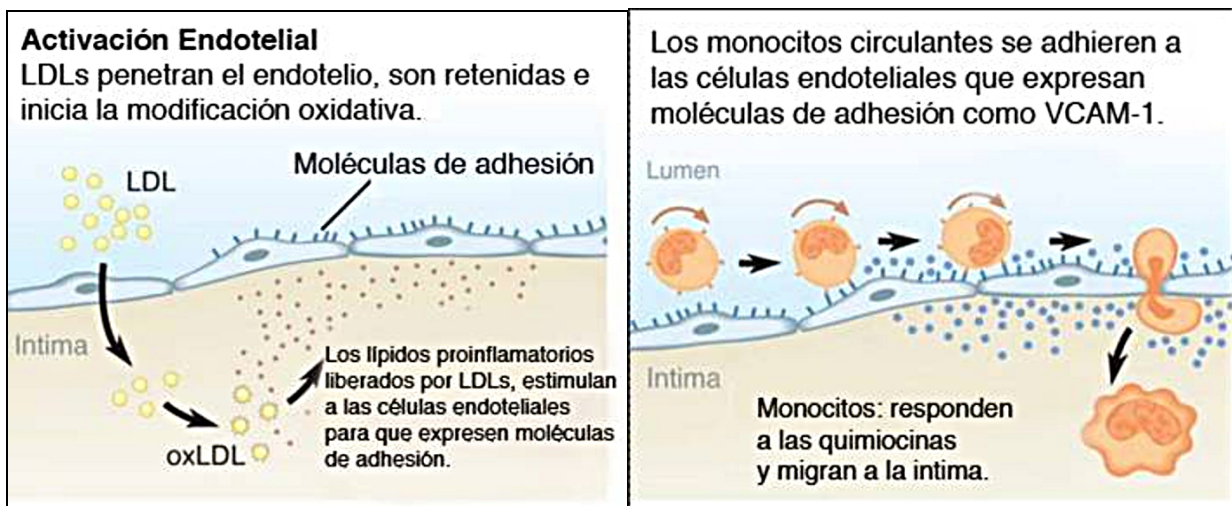


Figura 1. Etapa inicial de la formación de una placa arteriosclerótica. En la figura se observa la activación del endotelio por las LDLs oxidadas y el reclutamiento posterior de los monocitos por las moléculas de adhesión y otras quimiocinas. Abreviaturas: LDL-Lipoproteínas de baja densidad, LDLox-Lipoproteínas de baja densidad oxidadas. (Traducido de Hansson *et al.*, 2006).

El factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), producido en la íntima inflamada, induce la diferenciación de los monocitos entrantes hacia macrófagos. La diferenciación de los macrófagos es un paso necesario para la aterosclerosis y está asociada con la sobre-regulación de los receptores de reconocimiento de patrones de la inmunidad innata. Estos receptores incluyen a los receptores "basureros" o scavenger (ScRs) y a los receptores tipo "toll" (TLRs), como puede observarse en la figura 2. Los ScRs internalizan una amplia gama de moléculas y partículas con patrones moleculares semejantes a patógenos; entre éstas se encuentran las endotoxinas bacterianas, los fragmentos de células apoptóticas y partículas de LDL oxidadas (LDLox), que son fagocitadas y degradadas por esta vía. Si el colesterol derivado de la fagocitosis de las LDLox no puede ser movilizado hacia afuera de la célula de manera eficiente, éste se

acumula en forma de gotas citosólicas (figura 2). Dicho proceso aumenta en la inflamación, ya que las citocinas pro-inflamatorias y las endotoxinas inhiben la expresión de ABCA1 y ABCG1, proteínas transportadoras con secuencias de unión a ATP, que exportan el colesterol fuera de la célula. En consecuencia, el macrófago se transforma en una célula espumosa, célula prototípica de la aterosclerosis. La formación de dichas células dentro de la íntima del vaso sanguíneo dispone el escenario para que el ateroma se convierta en una placa fibrosa (Carrillo y Bear, 2004; Hansson *et al.*, 2006).

En cambio, cuando los TLRs se unen a ligandos con patrones moleculares semejantes a patógenos, inician una cascada de señalización que lleva a la activación del macrófago. Las toxinas bacterianas, las proteínas de estrés y los motivos de ADN son reconocidos por varios TLRs; adicionalmente la proteína HSP60 y las LDLox activan estos receptores. En las lesiones arterioscleróticas las células poseen un espectro amplio de TLRs, y dado que la mayoría activan al NF- κ B, es posible que la inflamación en la placa dependa parcialmente de esta vía de señalización (Hansson *et al.*, 2006).

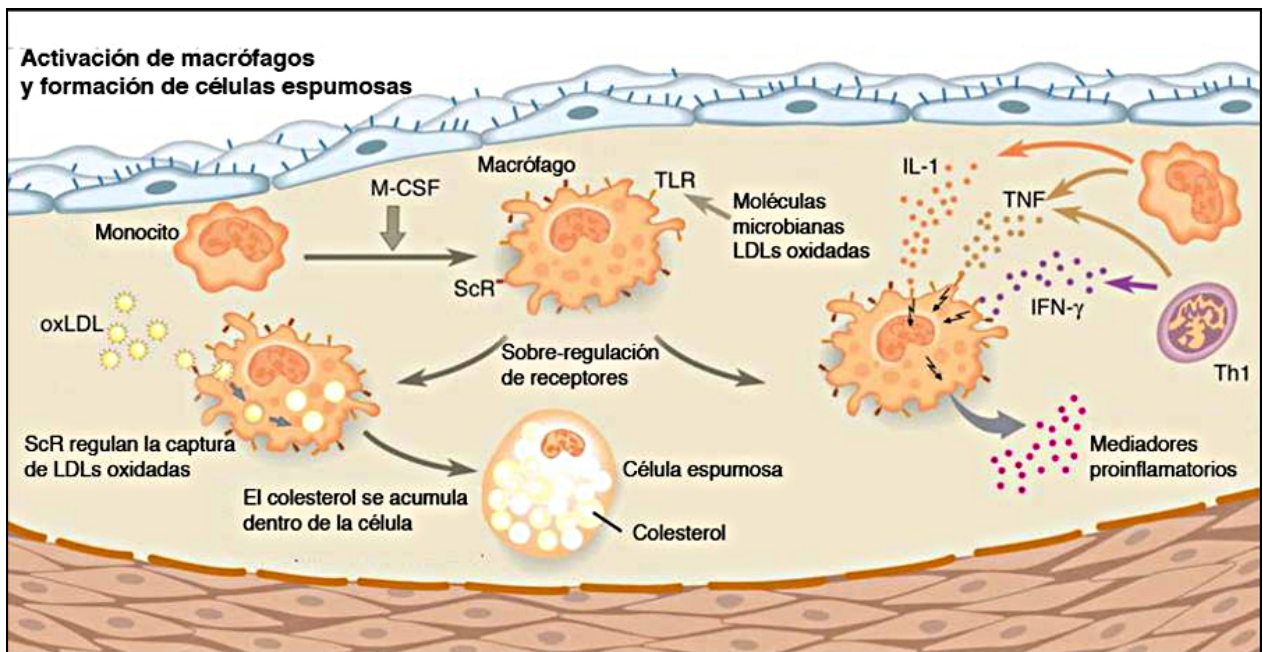


Figura 2. Papel de la respuesta inflamatoria durante el inicio de la aterosclerosis. Activación de monocitos hacia macrófagos y células espumosas. Abreviaturas: IL-1-Interleucina 1, TNF-Factor de Necrosis Tumoral, IFN- γ -Interferon Gamma, Th1-Subpoblación de linfocitos T cooperadores cuya función principal es estimular la fagocitosis, ScR-Receptores de tipo "scavenger", TLR-Receptores tipo "toll", M-CSF-Factor estimulante de colonias de macrófagos (Traducido de Hansson *et al.*, 2006).

La activación de los macrófagos en el ateroma provoca la liberación de moléculas vasoactivas como óxido nítrico, endotelinas y varios eicosanoides, así como la producción de especies reactivas de oxígeno. La producción de estas últimas tiene consecuencias importantes en la oxidación de las lipoproteínas y la citotoxicidad. Finalmente, los macrófagos activados secretan enzimas proteolíticas que pueden degradar los componentes de la matriz extracelular. La pérdida de éstos provoca la desestabilización de la placa y un incremento en el riesgo de su ruptura con la subsiguiente trombosis (Carrillo y Bear, 2004).

Las células T son reclutadas en la lesión en formación mediante mecanismos similares a los de los monocitos (figura 3). Sin embargo, su patrón de activación depende del reconocimiento de antígenos específicos y el ligamiento simultáneo de receptores de coestimulación. En las placas arterioscleróticas humanas, las células T CD4+ predominan sobre las CD8+. Las células T CD4+ se diferencian en varios subtipos, las células efectoras Th1, las células Th2 y varios tipos de células T reguladoras. Las células Th1 producen IFN γ y TNF e inducen la activación de macrófagos y la hipersensibilidad retardada; mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13, promueven la inflamación mediada por eosinófilos y reacciones alérgicas. Las células T reguladoras suprimen las funciones efectoras de otras células del sistema inmune (Hansson *et al.*, 2006).

La evidencia proveniente de estudios en humanos y en animales, sugiere que en la aterosclerosis se favorece la respuesta inmune de tipo Th1, caracterizada por la producción local de IFN γ . El IFN γ es una citocina pro-arteriogénica, promueve la activación endotelial y de macrófagos con la producción subsiguiente de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas, radicales, proteasas y factores de coagulación. Adicionalmente, inhibe la proliferación celular, la producción de colágeno y el flujo hacia el exterior del colesterol. Esta citocina también puede ser producida por células T CD8+, linfocitos citolíticos naturales (células NK) y células del músculo liso estimuladas por IL-18. Las células Th1 también producen TNF, al igual que los macrófagos y las células NK. Esta citocina actúa a través de la vía de NF- κ B, es pro-inflamatoria, citotóxica e inhibe enzimas metabólicas clave como la lipoproteína lipasa. La IL-1, producida por las células vasculares y por los macrófagos, tiene un espectro de acción que se traslapa parcialmente con TNF y los ligandos de TLR. Esta citocina provoca la

inducción de metaloproteinasas, de la sintasa de óxido nítrico y moléculas de adhesión (Hansson, 2005).

Activación de los linfocitos T y sus respuestas efectoras

Los linfocitos T se adhieren a la superficie vascular a través de moléculas de adhesión y migran hacia la intima.

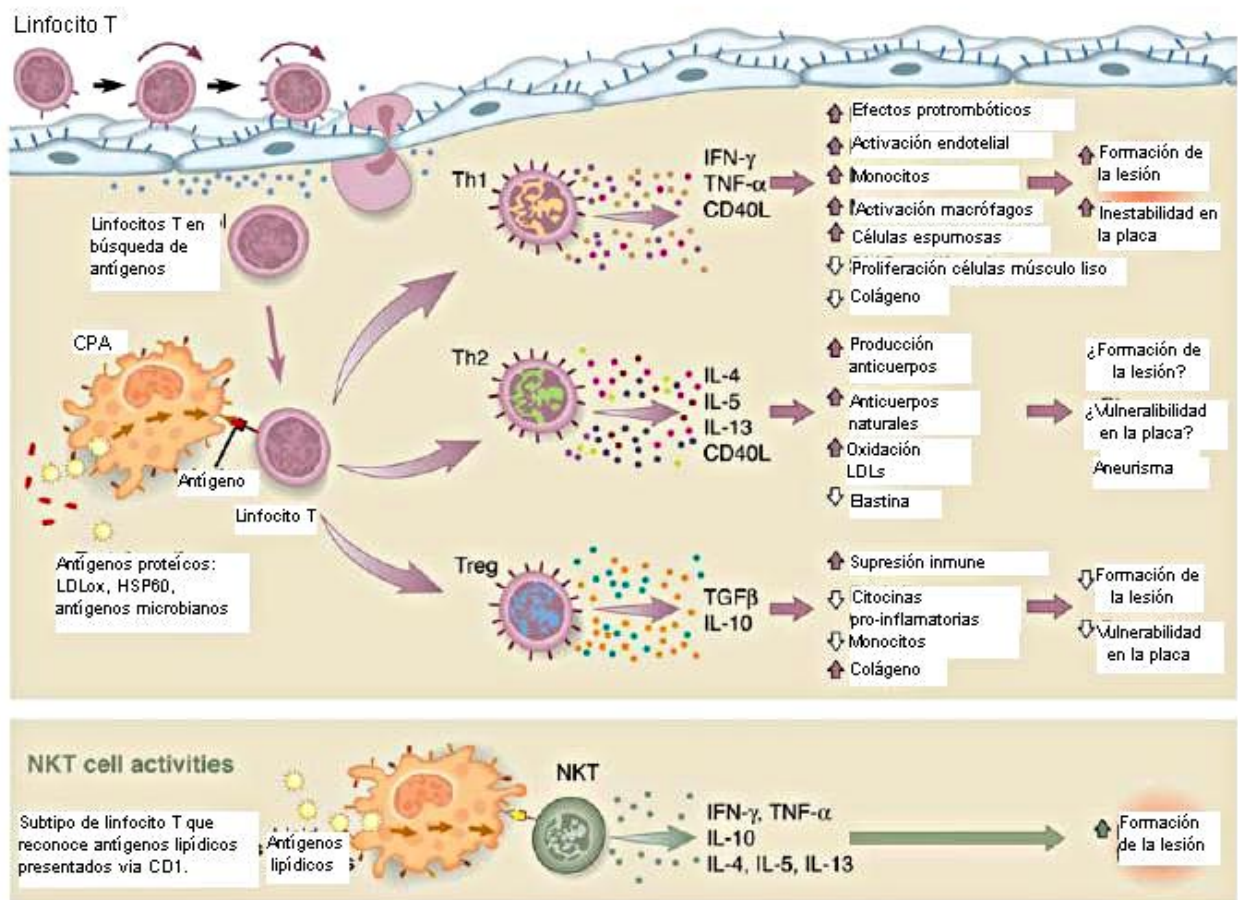


Figura 3. Reclutamiento y activación de linfocitos T en la formación de un ateroma (Traducido de Hansson *et al.*, 2006).

2.2. Síndromes coronarios agudos

Cada vez más datos sugieren que la activación de tipo inflamatoria de la placa provoca la trombosis coronaria, lo cual conlleva a la isquemia del miocardio y al infarto. Es probable que un proceso similar provoque el infarto en otras regiones altamente vascularizadas como el cerebro (Hansson *et al.*, 2006). Las etapas del desarrollo y complicación de la placa arteriosclerótica se ilustran en la figura 4.

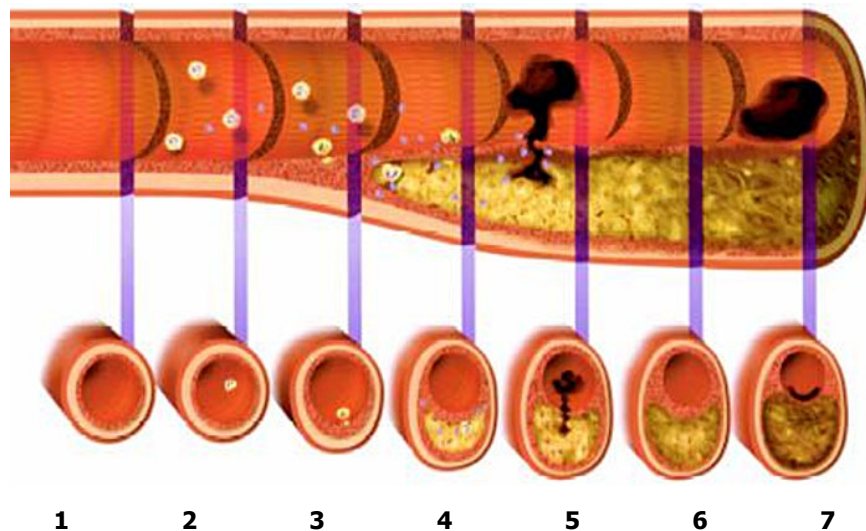


Figura 4. Inicio, progresión y complicación de una placa arteriosclerótica. Arriba se muestra la sección longitudinal de una arteria ilustrando una línea de tiempo desde la arteriogénesis de una arteria normal (1) hasta la evolución de un ateroma que causa manifestaciones clínicas por trombosis o estenosis (5,6,7). Abajo, secciones transversales de la arteria durante varios estados de la evolución del ateroma. 1, arteria normal. 2, inicio de la lesión. Las células endoteliales expresan moléculas de adhesión, lípidos extracelulares comienzan a acumularse. 3, los monocitos se transforman en macrófagos y fagocitan a las lipoproteínas convirtiéndose en células espumosas. 4, se secretan proteasas de matriz que debilitan la capa fibrosa de la placa. 5, rompimiento de la placa arteriosclerótica y salida del trombo. 6, recuperación de la placa. 7, en algunos casos ocurren lesiones superficiales que complican la lesión. (Tomado de Libby, 2001).

La reducción progresiva del diámetro del lumen arterial puede provocar síndromes clínicos como la angina y la claudicación intermitente. Las complicaciones clínicas agudas como el IAM y el infarto isquémico, son causadas por la formación de un trombo en la placa. A su vez, para la formación del trombo es necesario que ocurra un daño en la superficie de la placa. Aproximadamente el 70% de los trombos coronarios aparecen en sitios donde existe la fisura de la placa y el 30% parece ser causado por la erosión superficial del endotelio. Los pacientes con síndromes coronarios agudos muestran signos de inflamación con niveles elevados de citocinas circulantes, reactantes de la fase aguda (como la proteína C reactiva) y células T activadas. Estos niveles elevados pueden reflejar la inflamación exacerbada de la placa, lo cual promueve o causa la ruptura de ésta y la trombosis (Carrillo y Bear, 2004).

Los mecanismos involucrados en la ruptura de la placa son diversos. En los sitios de ruptura de la placa se han encontrado macrófagos activados, células T y células cebadas. Estas células producen diversos tipos de moléculas capaces de desestabilizar la lesión, como las citocinas pro-inflamatorias, proteasas, factores de coagulación, radicales libres y moléculas vasoactivas. Dichos agentes inhiben la formación del casquete fibroso estable, atacan la capa de colágeno e inician la formación del trombo. Todas estas reacciones promueven y posiblemente disparan la activación de la placa, con la posterior ruptura, trombosis e isquemia (Hansson *et al.*, 2006). De igual forma, existen evidencias que sugieren que la disrupción física de la placa puede disparar la trombosis y promover la expansión espontánea de las lesiones ateromatosas. Pueden ocurrir tres tipos de disrupción física; la primera de ellas es la erosión superficial o la descamación de áreas microscópicas de células endoteliales que forman la monocapa que cubre la íntima. Las áreas de descamación normalmente forman el centro o nido de

un trombo plaquetario, ya que descubren el colágeno del tejido subendotelial y el factor von Willebrand que promueven la adhesión y la activación plaquetaria (Libby, 2002).

La disrupción de los microvasos, los cuales se forman en la placa arteriosclerótica es otro escenario para la progresión espontánea de la placa. Como resultado de la angiogénesis se forman nuevos canales microvasculares en esta placa, estos nuevos vasos sanguíneos son particularmente frágiles y susceptibles a una microhemorragia. Los depósitos intra-placa de fibrina y sus productos, proveen evidencia de la hemorragia en el interior de la placa. La trombosis *in situ* provoca la generación de trombina, la cual además de escindir al fibrinógeno, estimula la migración y proliferación de músculo liso a través de la liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). De igual forma, las plaquetas activadas producen el factor transformante de crecimiento β (TGF- β), un potente estímulo para la síntesis de colágeno intersticial por las células de músculo liso. De esta manera, una hemorragia microvascular silenciosa dentro de la intima con aterosclerosis, provoca la evolución de la placa (Libby, 2002).

El tercer mecanismo y el más común es la fractura del casquete fibroso de la placa, el cual también involucra la inflamación. El casquete fibroso normalmente sirve para secuestrar al centro trombogénico rico en lípidos, que está presente en el ateroma, del torrente circulatorio por el cual circulan proteínas de coagulación. La fisura del casquete fibroso permite que las proteínas de coagulación entren en contacto con factores tisulares, lo que constituye el principal estímulo pro-trombótico presente en el núcleo lipídico de la lesión. Los eventos trombóticos amplifican la cascada inflamatoria en la placa y, como consecuencia de la fisura de ésta, su volumen aumenta súbitamente (García-Moll y Kaski, 1999).

Se sabe poco acerca de los mecanismos de erosión superficial de las placas arterioscleróticas. Dos procesos relacionados con la inflamación pueden participar en la descamación endotelial. El primero, la muerte celular endotelial (mediante apoptosis o necrosis), puede ser resultado de la producción local de mediadores de la inflamación o por un ataque citolítico por células T activadas. Adicionalmente, los mediadores inflamatorios y las lipoproteínas oxidadas pueden estimular la expresión y la activación de metaloproteasas de matriz (MMPs) especializadas en la degradación de componentes sub-enteliales de la membrana basal. Por lo tanto, el estímulo inflamatorio puede promover la producción, en las células endoteliales, de enzimas que degradan los constituyentes de la matriz extracelular a los cuales se adhieren en circunstancias normales. Por ejemplo, la MMP-2 promueve la descamación endotelial mediante la lisis de los contactos con la membrana basal causando la erosión superficial de las placas arterioscleróticas y provocando la trombosis coronaria. Es así como la inflamación puede promover la pérdida del endotelio, lo que constituye la característica principal de la erosión superficial (Ross, 1986; Rajavashisth *et al.*, 1999; Libby, 2002).

Los mecanismos de formación de la microvasculatura en el ateroma, son semejantes a los de angiogénesis en otros sitios. Además de la secreción de factores de crecimiento para la estimulación de las células del músculo liso, las células inflamatorias (incluyendo macrófagos) presentes en la placa, producen mediadores de la angiogénesis como los factores de crecimiento para fibroblastos y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La microvasculatura en la placa no sólo es un sitio para la hemorragia *in situ* y la trombosis, también desempeña una función de nutrición que promueve el crecimiento de la placa (Libby, 2002).

Dentro de los distintos mecanismos de disrupción de la placa, el mejor entendido es el de fisura del casquete fibroso. Las moléculas de colágeno intersticial confieren la mayor parte de la fuerza de tensión del casquete fibroso, varios procesos finamente regulados determinan su nivel crucial para la estabilidad del casquete. Algunas citocinas pro-inflamatorias, como el IFN- γ , pueden inhibir la producción de colágeno en las células del músculo liso, las cuales son la fuente principal de esta macromolécula de la matriz extracelular en la pared arterial. Las fibras de colágeno intersticial usualmente resisten la degradación proteolítica; únicamente un número limitado de colagenasas intersticiales pueden hacer un corte proteolítico inicial en sus cadenas que forman la triple hélice característica de la fibra de colágeno. En las placas arterioscleróticas son abundantes las formas activas de las colagenasas intersticiales MMP-1, 8 y 13. Después del rompimiento limitado realizado por las colagenasas intersticiales, las gelatinasas continúan con el catabolismo de esta molécula. En las placas arterioscleróticas se ha observado la actividad aumentada de dos gelatinasas: MMP-12 y MMP-9. En las arterias se ha observado la expresión endógena de los antagonistas de las MMPs, los inhibidores de tejido de metaloproteasas (TIMPs); aunque la evidencia de colagenolisis *in situ* indica un exceso en las formas activas de colagenasas intersticiales sobre las TIMPs en las placas humanas arterioscleróticas. Los estudios *in vitro* indican que las moléculas mediadoras de la inflamación presentes en el ateroma, como la IL-1 β , el TNF- α y el ligando CD40 (CD154), aumentan la expresión de MMPs en los macrófagos y en las células del músculo liso. De igual forma, las células cebadas presentes en la lesión pueden secretar la MMP que induce al TNF- α , así como serin-proteasas que son capaces de activar las formas pro-enzimáticas latentes de MMPs (Becker *et al.*, 2001; Carrillo y Bear, 2004; Hansson, 2005).

Evidencias convergentes indican que la regulación de los niveles de colágeno en el casquete fibroso de la placa arteriosclerótica es un proceso dinámico. Cuando la inflamación prevalece en la íntima, la producción de novo de colágeno por las células del músculo liso requerido para la reparación y el mantenimiento del casquete fibroso disminuye. Mientras tanto, la degradación del colágeno se incrementa debido a la sobre-expresión de las MMPs activas. El resultado neto es la disminución de la matriz de colágeno del casquete fibroso, tornándola en una estructura débil, frágil y susceptible a la fractura cuando es sometida a estrés hemodinámico. De hecho, las placas pueden clasificarse en estables si exhiben signos de estabilidad como un casquete fibroso grueso y en placas inestables, susceptibles a la ruptura, cuando poseen un casquete fibroso delgado y un esqueleto de colágeno escaso como se esquematiza en la figura 4 (Ross, 1999; Libby, 2002).

Cuando la placa sufre una ruptura, la sangre que entra en contacto con los diferentes factores del tejido se coagula. Las plaquetas activadas por la trombina generada por la cascada de coagulación y también por el contacto con el compartimiento de la íntima provocan la formación del trombo. Si éste ocluye al vaso de forma persistente, un IAM ocurrirá como se ilustra en la figura 5. El trombo puede reabsorberse eventualmente como resultado de una trombolisis endógena o terapéutica (figura 4, etapa 6). De cualquier forma, una respuesta para curar la herida iniciada por la trombina generada durante la coagulación de la sangre, puede estimular la proliferación de células del músculo liso. El PDGF liberado por las plaquetas activadas, estimula la migración de las células del músculo liso, mientras que el TGF- β secretado por las mismas plaquetas, estimula la producción de colágeno intersticial. El incremento en la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por las células del músculo liso provoca el adelgazamiento del casquete fibroso y consecuentemente la expansión de la íntima

causando la constricción del lumen arterial. Las lesiones de estenosis producidas por la disminución del diámetro del lumen restringen el flujo sanguíneo, particularmente en situaciones de demanda cardíaca, provocando la isquemia del tejido y causando síntomas tales como la *angina pectoris*. Las placas con estenosis avanzada, siendo más fibrosas, son menos susceptibles a la ruptura y a la trombosis repetida. La disminución de los lípidos normalmente reduce su contenido y disminuye la respuesta inflamatoria inicial dando como resultado una placa más estable con un casquete fibroso grueso y un lumen preservado, como se observa en la figura 5 (Libby, 2002).

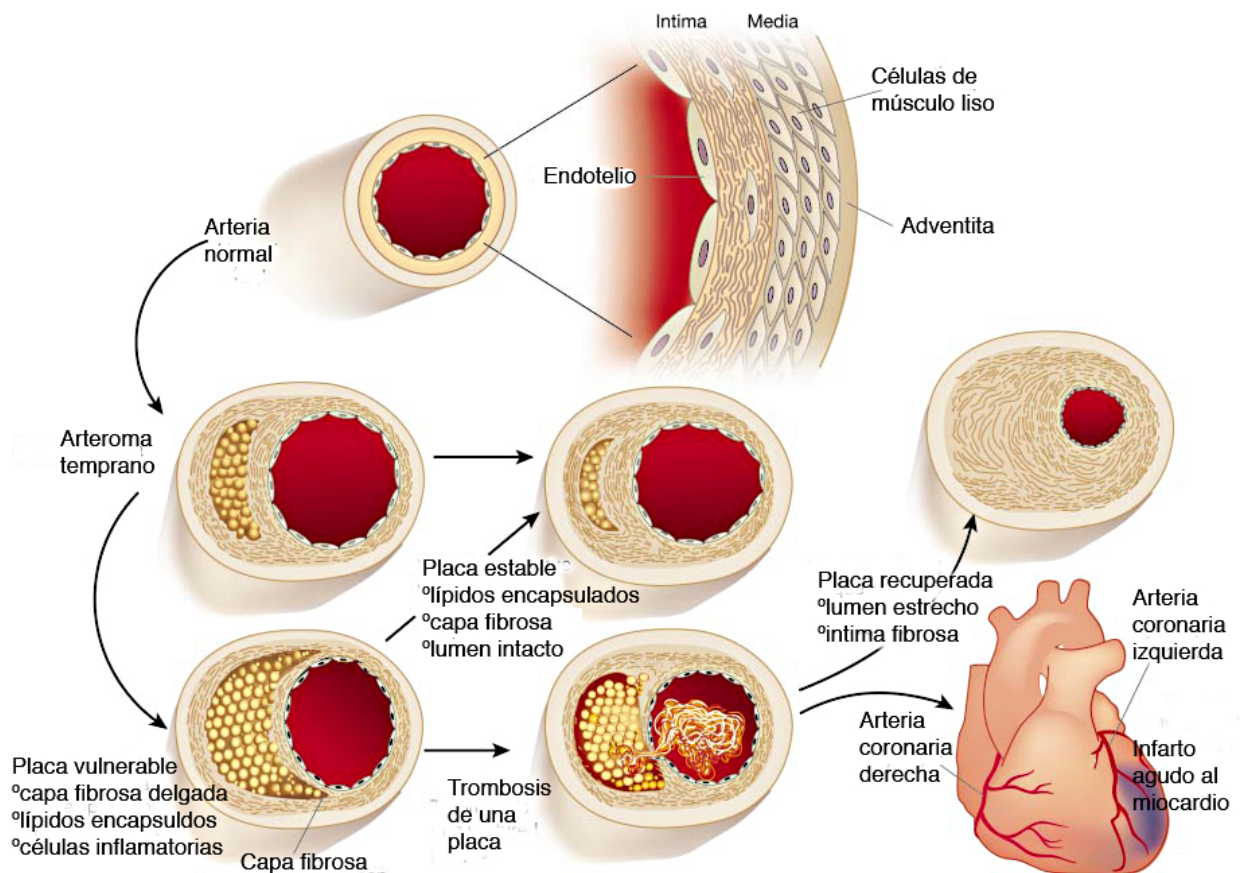


Figura 5. Formación y rompimiento de la placa arteriosclerótica culminando en IAM (Traducido de Libby, 2002).

Sin lugar a dudas, el fenómeno inflamatorio desempeña un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria y probablemente constituye el factor de transformación de un síndrome coronario de estable a inestable (García-Moll y Kaski, 1999; Lopes *et al.*, 2002; Corti *et al.*, 2003). Además, como se explicó anteriormente, la respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso arteriosclerótico sino

que también contribuye al posterior crecimiento del ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos, como el IAM (Ross, 1999; Libby, 2001).

Los factores que desencadenan la inflamación en la aterosclerosis son hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, obesidad, hiperhomocisteinemia, tabaquismo y diversas infecciones bacterianas comúnmente causadas por *C. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Helicobacter pylori*; así como infecciones causadas por virus de la familia de los Herpes como citomegalovirus, Epstein-Barr y herpes-simple tipo I (Ross, 1999; Becker *et al.*, 2001; Hansson *et al.*, 2006). Dichos estímulos provocan un daño en la pared vascular y, de acuerdo con la teoría de respuesta al daño propuesta por Ross, la aterosclerosis se puede considerar como el resultado de una respuesta exagerada de tipo inflamatorio-fibroproliferativa.

Estudios realizados en pacientes con cardiopatías isquémicas estables y en aquellos con síndromes coronarios agudos muestran concentraciones altas de marcadores circulantes de inflamación, como las citocinas pro-inflamatorias y otros indicadores de la fase aguda como la IL-6 y la proteína C reactiva (CRP); de manera inequívoca, estas alteraciones se deben al proceso inflamatorio en la arteria arteriosclerótica. Cuando los niveles de estos factores son altos, predicen un mal diagnóstico (García-Moll y Kaski, 1999; Libby, 2002; Carrillo y Bear, 2004; Hansson, 2005; Hansson *et al.*, 2006).

Además del IAM, se ha observado el incremento de marcadores inflamatorios en pacientes con angina estable crónica, angina inestable e IAM; dicho incremento ha sido corroborado por varios estudios *in vitro* y en animales experimentales (Ridker *et al.*, 1998a, 1998b, 2000; Willerson y Ridker, 2004). Otros marcadores de la inflamación que se encuentran elevados en estos pacientes incluyen IL-7, IL-8, ligando CD40 soluble y la pentrexina-3, relacionada con la CRP. De igual forma, es posible detectar células T

activas; la proporción del subconjunto CD4⁺CD28⁻ de células T pro-inflamatorias aumenta en la sangre de estos pacientes. El repertorio inmune TCRBV⁺/DR⁺ de dichas células se encuentra perturbado en dichos pacientes; ciertas clonas se encuentran expandidas de forma preferencial, como las clonas BV3, BV5, BV12, BV17 y BV20 que sufren una expansión monotípica, mientras que las clonas BV9, BV14 y BV18 sufren una expansión oligotípica. También existe reactividad incrementada hacia las LDLox, lo cual sugiere que podría existir algún tipo de respuesta autoinmune en el desarrollo de los síndromes coronarios agudos (Caligiuri *et al.*, 2000; Hansson *et al.*, 2006).

2.3. Citocinas

Entre las moléculas que participan en el proceso inflamatorio, las citocinas son las que parecen orquestar el desarrollo crónico de la aterosclerosis. Estas moléculas pueden llevar a la formación de las placas de ateroma, las cuales provocan complicaciones trombóticas agudas, tales como el IAM. En las placas arterioscleróticas se han detectado varias citocinas pro-inflamatorias, entre las que destacan la IL-1, IL-6 e IL-10, así como TNF- α e INF- γ . Estas moléculas desempeñan un papel fundamental ya que están involucradas en la regulación de la hematopoyesis y linfopoyesis, además de que afectan la función de todos los tipos celulares involucrados en el proceso inflamatorio. (Becker *et al.*, 2001; Abbas y Lichtman, 2004; Carrillo y Bear, 2004; Hansson *et al.*, 2006).

2.3.1. Sistema de moléculas de interleucina-1

Existen dos formas de IL-1, denominadas IL-1 α e IL-1 β , con una homología inferior al 30% entre ellas pero capaces de unirse a los mismos receptores de superficie celular y mediar las mismas actividades biológicas. Las moléculas que integran la familia de IL-1 se esquematizan en la figura 6. Los dos polipéptidos de IL-1 se sintetizan en forma de precursores de 31 kD y se secretan como proteínas maduras de 17 kD. La forma activa de IL-1 β es el producto escindido, mientras que la molécula de IL-1 α es activa en ambas formas, como el precursor de 33 kD y como el producto escindido más pequeño. La mayor parte de IL-1 que se encuentra en la circulación es IL-1 β (Abbas y Lichtman, 2004).

La IL-1 β es producida por macrófagos, plaquetas y endotelio dañado, promueve la interacción de las células endoteliales con los leucocitos circulantes, induce la activación y proliferación de monocitos/macrófagos y estimula la proliferación de células del músculo liso y la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno (Dinarello, 1991; Ikonomidis *et al.*, 1999). Diversos estudios sugieren que esta citocina juega un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis y la trombosis (Libby, 2002; Auer *et al.*, 2003; Vohnout *et al.*, 2003; Latkovskis *et al.*, 2004; Iacoviello *et al.*, 2005) y su efecto biológico lo ejerce a través de la unión con el receptor de IL-1 tipo I. Dicha unión induce la activación de una cascada de fosforilación que, a su vez, provoca la activación de factores de transcripción de diversos genes. Este receptor se expresa en casi todos los tipos celulares y desempeña una función preponderante en las respuestas mediadas por IL-1.

Existe un segundo receptor para la IL-1 denominado receptor de IL-1 tipo II, el cual se expresa en los linfocitos B, aunque puede inducirse en otros tipos celulares. Éste no desencadena respuesta alguna cuando se une la IL-1 ya que es estructuralmente incapaz de activar la cascada de señalización. La función principal del receptor de tipo II es actuar como un "señuelo", ya que actúa como una trampa molecular para la IL-1 y, por lo tanto inhibe de forma competitiva la unión de IL-1 al receptor de tipo I; por tal motivo se le ha considerado como un regulador negativo del sistema de IL-1 (Mantovani *et al.*, 2001; Abbas y Lichtman, 2004).

Dentro de las moléculas que integran a la familia de IL-1 existe una que se denomina antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1ra), la cual se une también al receptor de IL-1 tipo I pero no induce respuesta intracelular alguna. Esta actividad se considera clave en la regulación de la respuesta a esa citocina (Arend, *et al.*, 1998; Worrall *et al.*, 2003). Se han descrito tres variantes estructurales del IL-1ra: la primera isoforma de 17 kD es secretada por monocitos, macrófagos, neutrófilos y otras células. Una segunda variante de 18 kD se mantiene en el citoplasma de queratinocitos, monocitos, fibroblastos y otras células epiteliales. Finalmente, una isoforma adicional intracelular que se encuentra en neutrófilos, monocitos y células hepáticas. Las dos primeras isoformas se transcriben del mismo gen a través del uso alternativo de los primeros exones. La producción de IL-1ra es estimulada por diversas sustancias como la IgG, otras citocinas y componentes bacterianos o virales. Se ha observado que el IL-1ra endógeno es producido tanto en animales de experimentación como en humanos durante enfermedades autoinmunes y en inflamaciones crónicas. Se ha demostrado, mediante el uso de anticuerpos neutralizantes anti-IL-1ra, que el IL-1ra endógeno es

una proteína anti-inflamatoria natural y se ha observado que es un inhibidor competitivo de la IL-1 (Arend *et al.*, 1998).

Los dos tipos de receptores de la IL-1 existen también en forma soluble. Ambos tipos son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y poseen tres dominios semejantes a Ig en las porciones extracelulares, los cuales son procesados enzimáticamente y se presentan como receptores solubles, tanto en el ambiente pericelular como en la circulación. Los receptores solubles de tipo II se unen a la IL-1 β con mayor avididad que al IL-1ra y pueden funcionar como inhibidores de la acción *in vivo* de la IL-1 β . Los receptores solubles de tipo I se unen de forma selectiva al IL-1ra producido *in vivo*, de forma tal que pueden bloquear o neutralizar su acción anti-inflamatoria natural (Arend *et al.*, 1998). Lo anterior se ejemplifica en la figura 6.

Los resultados de diversos estudios indican que las proteínas IL-1 β e IL-1ra poseen hojas β plegadas idénticas y que los residuos en la cara de la superficie de ambas moléculas se unen al mismo sitio en el receptor de tipo I. Sin embargo, la IL-1 β posee dos sitios adicionales de interacción con el receptor: entre las regiones 4 y 5 un asa β en forma de listón y una región alrededor del ácido aspártico en el residuo 145. Se considera que estas interacciones son responsables de la diferencia entre la actividad biológica de la IL-1 β y el IL-1ra. Estudios de mutagénesis dirigida confirman que existen dos sitios en los cuales se pueden unir ligandos: el sitio A y el sitio B. El primero, se localiza en el lado de la estructura de barril β en los receptores de tipo I y participa en la unión con los tres ligandos. El sitio B se encuentra al final de la estructura de barril β y es capaz de unirse tanto a la IL-1 α como a la IL-1 β . La interacción entre ambos agonistas de IL-1 con el sitio B se considera responsable de la inducción de las respuestas biológicas en las células blanco (Arend *et al.*, 1998).

La identificación y caracterización de una segunda subunidad del complejo de receptor de IL-1, la proteína accesoria de IL-1 (AcP IL-1R), ha clarificado la bioquímica y la biología del sistema IL-1. La AcP IL-1R es una molécula de 570 aminoácidos de la superfamilia de las Ig y posee una homología limitada con ambos tipos de receptores. Esta proteína accesoria forma un complejo tanto con la IL-1 α como con la IL-1 β y el receptor de tipo I, pero la proteína IL-1ra no participa en la formación de este complejo, mismo que permite la inducción de las respuestas biológicas señaladas. Se ha observado que las líneas celulares que no expresan la AcP IL-1R no pueden responder a la IL-1, pero la respuesta se restaura cuando se transfecta el cADN de este complejo. Así mismo, la transducción requiere los dominios citoplásmicos intactos, tanto del receptor como de la proteína AcP IL-1R (Arend *et al.*, 1998).

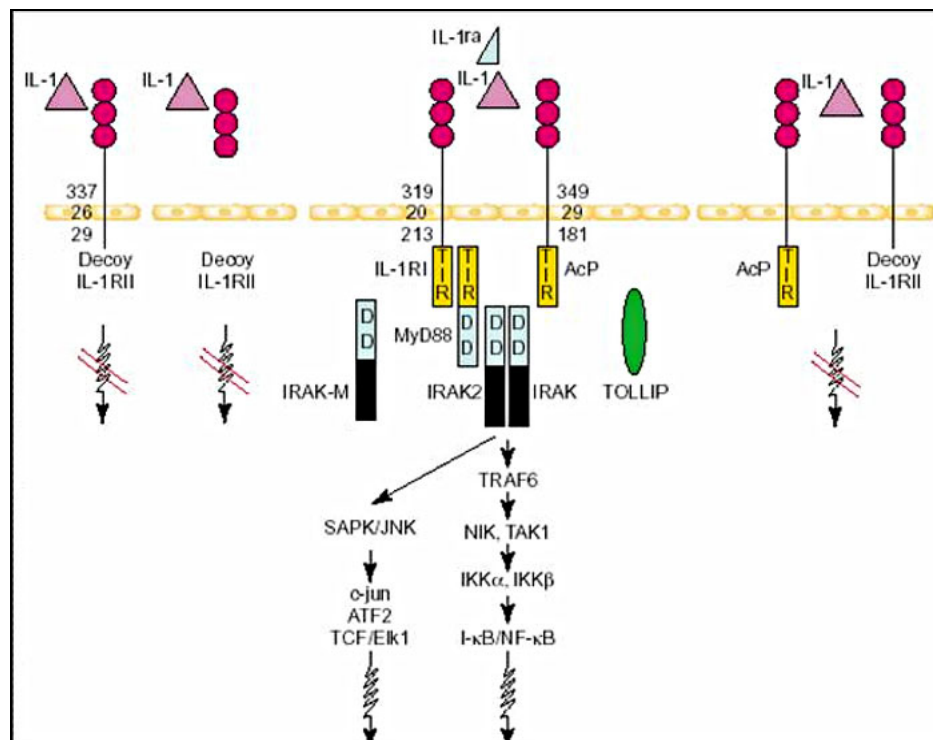


Figura 6. Moléculas pertenecientes a la familia de IL-1 (Tomado de Mantovani *et al.*, 2001).

2.4. Genes *IL1* e *IL1RN*

Los genes *IL1* (*IL1A*, *IL1B* e *IL1F10*) e *IL1RN* humanos se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, en las regiones q14, q13-q21, q13 y q14.2, respectivamente y abarcan aproximadamente una región de 360,000 pb. Se distribuyen de la siguiente manera: el gen *IL1A* entre las regiones 113,248,000 - 113,259,500 pb; el gen *IL1B* entre las regiones 113,303,800 - 113,310,800 pb; el gen *IL1F10* entre las regiones 113,542,000 - 113,549,900 pb y el gen *IL1RN* entre las regiones 113,591,900 - 113,608,100 pb (NCBI Map Viewer, disponible en el URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=2&query=uid\(730173,12720912\)&QSTR=3552%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=2&query=uid(730173,12720912)&QSTR=3552%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus)).

Los genes de los receptores humanos de tipo I y II también se localizan en el brazo largo del cromosoma 2, pero no se encuentran próximos a los genes de los tres ligandos (Arend *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2006).

De manera reciente, se han descrito 6 secuencias de genes que codifican para proteínas homólogas a la IL-1. Estos nuevos genes descritos, que codifican para los miembros de la familia de IL-1 se localizan en un cluster en el brazo largo del cromosoma 2, como se observa en la figura 7 (Dunn *et al.*, 2001; Timms *et al.*, 2004).

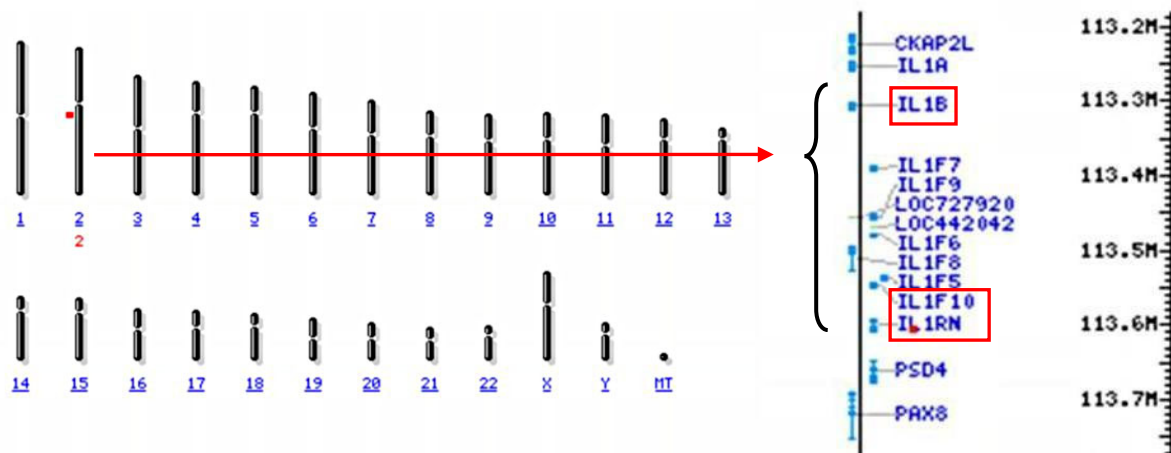


Figura 7. Localización de los genes de la familia de IL-1 en el cromosoma 2 (Disponible en URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=2&MAPS=ideogr,cntgr,ugHs,genes\[113522345.17%3A113765296.41\]&QUERY=IL1A&ZOOM=1.0000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=2&MAPS=ideogr,cntgr,ugHs,genes[113522345.17%3A113765296.41]&QUERY=IL1A&ZOOM=1.0000)).

Estos 6 genes se clasifican dentro de la familia de IL-1 ya que conservan la secuencia de aminoácidos, la identidad de la estructura del gen y la probable forma tridimensional de las proteínas que formaban parte en un principio de esta familia de citocinas (Sims *et al.*, 2001). Las similitudes reportadas entre la secuencia de aminoácidos de las proteínas homologas a la IL-1 humana van desde el 52% (entre IL-1F5 e IL-1ra) hasta 13% (entre IL-1F5 e IL-18, la cual también se considera como miembro de la familia de IL-1). Es probable que los miembros de la familia de IL-1 hayan surgido de un gen ancestral común, el cual pudo duplicarse varias veces (Dunn *et al.*, 2001).

Debido al descubrimiento de los genes arriba descritos, Sims y colaboradores, han propuesto una nueva nomenclatura para dichos genes y sus proteínas correspondientes. Tal sistema se ilustra en la Tabla 1 (Sims *et al.*, 2001).

Nombre de la proteína	Nombres previos	"Splicing" alternativo	Símbolo del gen humano
IL-1F1	IL-1 α	-	<i>IL1A</i>
IL-1F2	IL-1 β	-	<i>IL1B</i>
IL-1F3	IL-1ra	IL-1F3b IL-1F3c	<i>IL1RN</i>
IL-1F4	IL-18, IGIF, IL-1 γ	-	<i>IL-18</i>
IL-1F5	IL-1Hy1, FIL1 δ , IL-1H3, IL-1RP3, IL-1L1, IL-1 δ	IL-1F5b	<i>IL1F5</i>
IL-1F6	FIL1 ϵ	-	<i>IL1F6</i>
IL-1F7	FIL1 ζ , IL-1H4, IL-1RP1, IL-1H	IL-1F7b IL-1F7c	<i>IL1F7</i>
IL-1F8	FIL1 η , IL-1H2	IL-1F8b	<i>IL1F8</i>
IL-1F9	IL-1H1, IL-1RP2, IL-1 ϵ^b	-	<i>IL1F9</i>
IL-1F10	IL-1Hy2, FKSG75	IL-1F10b	<i>IL1F10</i>

Tabla 1. Nomenclatura para la familia IL-1 (Traducido de Sims *et al.*, 2001).

Existen diversos estudios en los que se han descrito varios polimorfismos para los genes *IL1* e *IL1RN*, por lo que cabe mencionar que un polimorfismo se define como la existencia de dos o más formas alternativas de un gen particular que se encuentra en la población en una frecuencia significativa mayor del 1%; cada variante común de un gen recibe el nombre de alelo. Por lo tanto, un individuo puede tener dos alelos diferentes de un gen, cada uno heredado de un progenitor (Clarke, 1999; Lewin, 2000; Sudbery, 2004).

2.4.1. Gen *IL1B*

El gen *IL1B* se localiza específicamente en la región 2q13-q21; está formado por 7 exones y 6 intrones y posee un tamaño de 9,700 pb. El producto de este gen es una proteína de 269 aminoácidos, la cual recibe el nombre de IL-1 β o bien IL1F2; como se observa en la Tabla 1 (Sims *et al.*, 2001; Vélez-Catrillon *et al.*, 2004).

En cuanto a la estructura proteica y la secreción de la IL-1 β , ésta es secretada sin péptido señal, con un peso molecular del precursor de 31 kD. Después de sintetizada permanece en el citosol hasta que sufre un rompimiento y es transportada fuera de la célula. Posteriormente, la proIL-1 β debe ser procesada por la enzima convertidora de IL-1 β (ICE) o caspasa-1 para ser funcional. La proIL-1 β (aminoácidos 1-116) sufre la agregación de residuos de lisina, no tiene forma membranal y es sólo marginalmente activa. La liberación de la IL-1 β madura parece estar asociada al rompimiento entre los residuos de ácido aspártico-alanina (aminoácidos 116-117) por la ICE (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004). La síntesis y procesamiento de IL-1 β se ilustra en la figura 8.

Se han reportado 82 polimorfismos de cambio de un solo nucleótido en este gen; sin embargo, 5 han sido los más estudiados: +3953 (nt5887) C \rightarrow T, -31 C \rightarrow T, -511 C \rightarrow T, nt3263 C \rightarrow T y nt5810 A \rightarrow T. En el presente estudio se incluyó el polimorfismo que se encuentra en la posición -511 (rs16944), el cual se encuentra en la región promotora del gen. En dicho polimorfismo hay un cambio de citosina (C) por timina (T), donde la presencia de C se considera como el alelo silvestre, también denominado alelo 1, y el de la T como el alelo mutante o alelo 2. Las células mononucleares de portadores del alelo T muestran un decremento, aproximadamente 5 veces menor, en la liberación de IL-1 β

después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS); comparado con la secreción de dicha proteína en homocigotos CC (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004; Iacoviello *et al.*, 2005; ENTREZ SNP, disponible en el URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

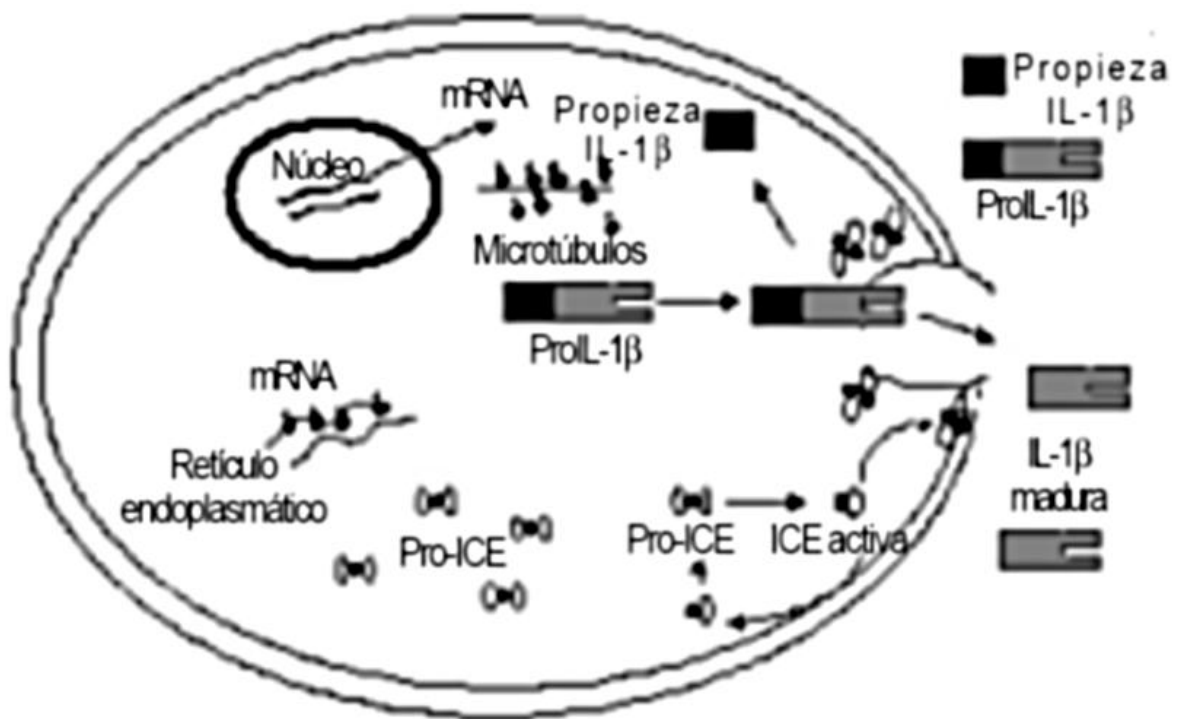


Figura 8. Síntesis y procesamiento de IL-1β (Tomado de Vélez-Castrillón *et al.*, 2004).

2.4.2. Gen *IL1F10*

El gen *IL1F10* se localiza en la región 2q13 y su organización genómica es altamente conservada en relación con los otros genes de la misma familia. Dicho gen posee 4 exones, 3 intrones y un tamaño de 7,900 pb. La proteína IL-1F10 es altamente homóloga a la proteína IL-1ra, ya que poseen 37% de similitud en la secuencia de aminoácidos, mientras que comparte una homología menor (14-30%) con la proteína IL-1 β y otras pertenecientes a la familia IL-1 (Lin *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2006).

El análisis del cADN de la proteína IL-1F10, muestra que está compuesta por 152 aminoácidos y una masa molecular cercana a los 17kDa. El modelo estructural de dicha proteína muestra una estructura de hojas β plegadas formando un trébol, la cual es altamente similar a la estructura cristalina de la proteína IL-1ra y comparte similitudes con la estructura de la proteína IL-1 β . Existen evidencias que sugieren que la proteína IL-1F10 actúa como un ligando de secreción que se une al receptor soluble de IL-1 tipo I, esta proteína se une a dicho receptor con una menor avididad que las proteínas IL-1 β e IL-1ra (Lin *et al.*, 2001).

Existen 114 polimorfismos de un solo nucleótido reportados para el gen *IL1F10* (ENTREZ SNP, disponible en el URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). En este estudio se incluyó al polimorfismo IL1F10.3 (rs3811058), el cual se encuentra en el exón 2 del gen y es también un polimorfismo de cambio de base de C por T; en ambos casos codifica para el aminoácido asparagina. Su acción a nivel transcripcional no ha sido descrita. (Timms *et al.*, 2004; Rahman *et al.*, 2006).

2.4.3. Gen *IL1RN*

El gen *IL1RN* se localiza en la región 2q14.2, está formado por 5 exones y 4 intrones y su tamaño es de 19.6 kb. Existen 3 isoformas conocidas de IL-1ra: IL-1ra soluble glicosilada (sIL-1ra) y dos formas intracelulares no glicosiladas (icIL-1raI e icIL-1raII). sIL-1ra e icIL-1raI provienen del mismo gen, mediante transcripción alternativa del primer exón. La expresión de sIL-1ra e icIL-1raI está regulada por 2 promotores distintos localizados corriente arriba de cada uno de los primeros exones alternativos con diferentes elementos reguladores de la transcripción. La regulación de la expresión de icIL-1ra es específica de cada tipo de célula (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004).

De igual forma que los miembros agonistas de la familia de IL-1, IL-1ra tiene una estructura cristalina de hojas β -plegadas. El sIL-1ra es traducido como una proteína de 17-kDa de 177 aminoácidos con una secuencia líder de 25 aminoácidos. Después del procesamiento, que incluye rompimiento de la secuencia líder y glicosilación, ésta es secretada por la vía clásica de retículo endoplasmático – Golgi – vesículas secretoras, al ambiente extracelular, como se muestra en la figura 9. Las formas intracelulares del IL-1ra no son glicosiladas, no poseen secuencia líder y permanecen en un comportamiento intracelular. El icIL-1raII se deriva de la iniciación alternativa de la traducción a partir del mRNA de sIL-1ra o a partir del mRNA de icIL-1raII. Se conocen dos formas distintas de icIL-1raII (Vélez-Castrillón *et al.*, 2004).

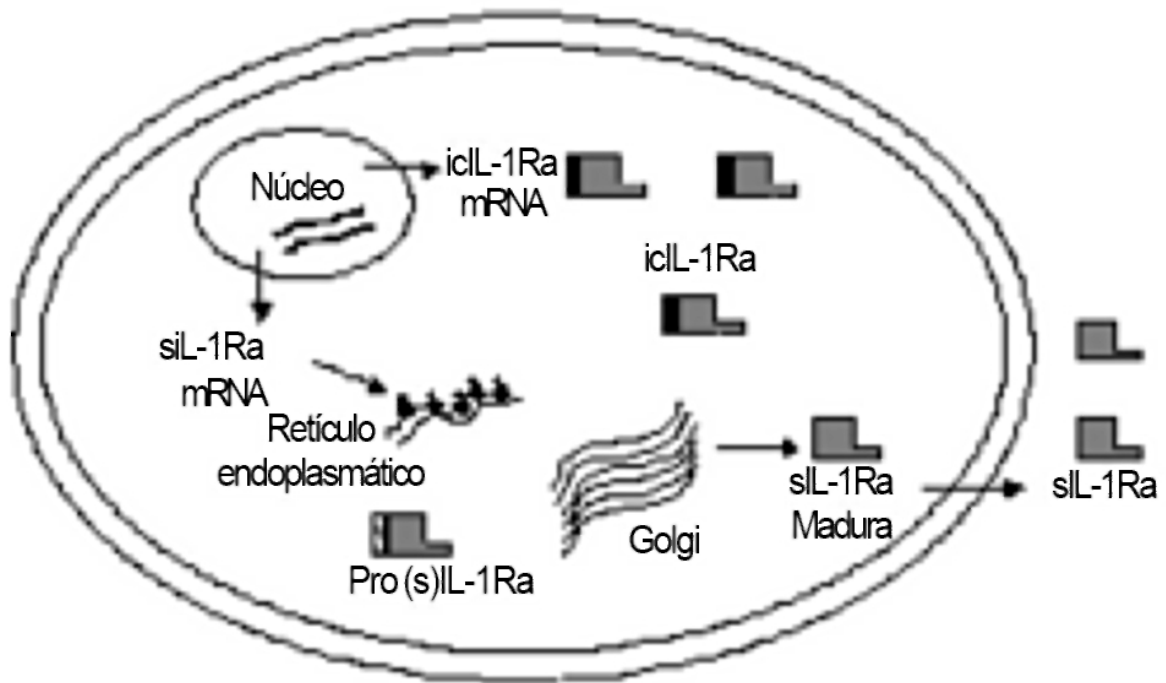


Figura 9. Síntesis de IL-1ra (Tomado de Vélez-Castrillón, 2004).

Se han reportado 249 polimorfismos en el gen *IL1RN* (ENTREZ SNP, disponible en el URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Dentro de éstos existe un sitio polimórfico penta-alélico en el intrón 2, el cual contiene un número variable de repeticiones en tándem de un fragmento de 86 pb; dicho sitio polimórfico recibe el nombre de IL1RVNTR. El alelo más común, el alelo 1 (frecuencia 0.74) contiene cuatro repeticiones de dicho fragmento, mientras que el alelo 2 (frecuencia 0.21) contiene dos repeticiones. Los tres alelos restantes se presentan con una frecuencia mínima en la población como se muestra en la Tabla 2 (Arend *et al.*, 1998; Santtila *et al.*, 1998; Hurme y Santtila, 1998).

Alelo	Número de repeticiones	Característica
1	4	Más común
2	2	Inflamación prolongada
3	3	Raro
4	5	Raro
5	6	Raro

Tabla 2. Alelos, repeticiones y características del polimorfismo IL1RNVNTR del gen *IL1RN* (Basado en Witkin *et al.*, 2002).

De igual forma, se estudiaron los polimorfismos IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G del gen *IL1RN*. El polimorfismo R/N.4T>C (rs419598) es un cambio de T por C, se considera a la T como el nucleótido silvestre; con ambos nucleótidos se obtiene el aminoácido alanina. En el caso del polimorfismo IL1RN.6/1C>T (rs315952) existe un cambio de base nitrogenada de C por T; se considera a la C como el alelo silvestre y en cualquiera de los dos casos el residuo para el cual codifica es la serina. Por otro lado, el polimorfismo IL1RN.6/2C>G (rs315951) se localiza en la región 3'UTR, en este caso el cambio de nucleótido es de C por guanina (G) y se considera a esta última como el alelo silvestre. Al momento, no existen datos de las consecuencias fisiológicas de estos polimorfismos.

Anteriormente se ha reportado que el alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR, también denominado IL1RN*2, se encuentra asociado con la incidencia de enfermedades autoinmunes o inflamatorias y los individuos homocigotos a dicho alelo muestran una respuesta inmune pro-inflamatoria más severa y prolongada comparada con la de otros genotipos de este polimorfismo. Se ha observado que el balance entre IL-1 β /IL-1ra es crítico para la regulación del proceso inflamatorio. La presencia del alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR (IL1RN*2) se ha asociado con la presencia del alelo 2 del gen

IL-1 β (posición -511). También se ha encontrado que la presencia de IL1RN*2 incrementa significativamente la producción de IL-1 β *in vitro*, sin importar los alelos del polimorfismo en la posición -511 del gen de *IL1B*. Estos resultados indican que los genes del *IL1B* e *IL1RN* se encuentran asociados y tienen un efecto cooperativo (Santtila *et al.*, 1998; Hurme y Santtila, 1998; Witkin *et al.*, 2002).

En diversos trabajos se ha reportado la asociación entre los polimorfismos de los genes *IL1B* e *IL1RN* con las enfermedades de tipo cardiovascular. En cuanto al polimorfismo del gen IL-1B (-511C/T) se encontró que la presencia del alelo 2, en forma homocigota (TT) confiere un efecto protector del 64% contra el desarrollo del infarto al miocardio en individuos jóvenes (Iacoviello *et al.*, 2005). Así mismo, en un trabajo reciente se reportó la asociación de polimorfismos del gen de *IL-1B* con el desarrollo de IAM en la población japonesa (Momiyama *et al.*, 2005).

El polimorfismo IL1RNVNTR del gen *IL1RN*, especialmente el alelo 2 (IL1RN*2), se ha relacionado con la enfermedad de las arterias coronarias. Se encontró una asociación significativa entre la presencia de este alelo y dicha enfermedad afectando una sola arteria (Francis *et al.*, 1999; Witkin *et al.*, 2002). En otro estudio, se asoció el alelo IL1RN*2 con la aterosclerosis, ya que su presencia en forma homocigota se relaciona con niveles reducidos de la proteína IL-1ra en cultivos de células endoteliales de venas umbilicales humanas. Este dato tiene una implicación importante en el control genético de la IL-1 en la pared arterial y, por lo tanto, en el desarrollo de enfermedades vasculares como la aterosclerosis (Dewberry *et al.*, 2000). De igual manera, se ha reportado al alelo IL1RN*2 como un factor de susceptibilidad en el desarrollo de la aterosclerosis de la arteria carótida en una población estadounidense (Worrall *et al.*, 2003).

3. Antecedentes

Estudios previos han sugerido que el componente inflamatorio juega un papel importante en el desarrollo del IAM, llevando a resaltar la participación que pueden desempeñar los polimorfismos de los genes que codifican para las proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria, como son las citocinas. En estudios realizados en la población japonesa se observó una asociación entre los polimorfismos del gen *IL1B* con el desarrollo de IAM (Momiya *et al.*, 2005). Así mismo, se ha observado que el polimorfismo del gen *IL1RN*, especialmente el alelo 2 del polimorfismo IL1RVNTR (*IL1RN*2*) está relacionado con la enfermedad de las arterias coronarias. En la población estadounidense se observó una asociación significativa entre la presencia de este alelo y dicha enfermedad afectando una sola arteria (Francis *et al.*, 1999; Witkin *et al.*, 2002).

En la Tabla 3 se resumen los trabajos que han reportado asociaciones entre enfermedades cardiovasculares y los polimorfismos de los genes *IL1B* e *IL1RN*.

Polimorfismo	Enfermedad	Población	Referencia
IL1RVNTR	Enfermedad de las arterias coronarias	Inglesa	Francis <i>et al.</i> , 1999
IL1RVNTR	Aterosclerosis	Inglesa	Dewberry <i>et al.</i> , 2000
IL1RVNTR	Inflamatorias crónicas, cáncer, osteoporosis, enfermedad de las arterias coronarias	Estadounidense	Witkin <i>et al.</i> , 2002
IL1RVNTR	Aterosclerosis de la carótida	Estadounidense	Worrall <i>et al.</i> , 2003
IL-1B-511	Infarto del miocardio y paro isquémico	Italiana	Iacoviello <i>et al.</i> , 2005
IL-1B-511	Infarto del miocardio	Japonesa	Momiya <i>et al.</i> , 2005

Tabla 3. Relación entre polimorfismos y enfermedades que han sido previamente reportados en diferentes poblaciones.

4. Justificación

En la población mexicana no existen estudios sobre la relación de los polimorfismos de los genes de *IL1* e *IL1RN* y las enfermedades cardiovasculares, además las observaciones realizadas en otras poblaciones no son aplicables a la nuestra debido a que la estructura genética del mestizo mexicano es particular. Hacia 1990 se sabía que el genoma del mexicano estaba formado por 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides (Lisker *et al.*, 1990). Los estudios más recientes con marcadores de ancestría indican que la estructura del genoma de los mexicanos se compone por 44% de genes amerindios, 52% de genes caucásicos y 4% de genes negroides (Price *et al.*, 2007). Debido a esta particularidad en la estructura del genoma del mexicano es necesario realizar estudios específicos en nuestra población.

Las enfermedades isquémicas del corazón son la segunda causa de mortalidad y ocupan el tercer lugar en la población mexicana en edad productiva. El 78% de las muertes por cardiopatía isquémica se debe al IAM. Se ha reportado, en otras poblaciones diferentes a la mexicana, que existe una asociación entre los polimorfismos de los genes *IL1* (*IL1B* e *IL1F10*) e *IL1RN* con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, como el IAM. Por tal motivo, es conveniente realizar un estudio similar en la población mexicana y encontrar una posible asociación entre dichos polimorfismos y la propensión hacia el desarrollo del IAM. Así mismo, se considera que de existir una relación entre la presencia de algún alelo específico y el desarrollo del IAM, tal asociación deberá reflejarse en el nivel de producción de la IL-1 β en el suero de quienes sean portadores de dicho genotipo. Por tal motivo es necesario cuantificar la cantidad de IL-1 β en el suero de los pacientes y de los individuos sanos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Determinar la frecuencia de los alelos de los genes *IL1* e *IL1RN* en una muestra de la población mexicana y asociar las variantes alélicas con la susceptibilidad o resistencia al desarrollo del IAM.

5.2. Objetivos Particulares

1. Generar un banco de muestras de ADN obtenido de al menos 100 pacientes con diagnóstico de IAM y de al menos 100 individuos sanos, es decir, sin antecedentes de enfermedades cardiovasculares o inflamatorias.
2. Determinar la frecuencia de los alelos y genotipos de los polimorfismos IL-1B-511, IL1F10.3, IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/2C>G, IL1RN.6/1C>T, IL1RNVNTR en el grupo de pacientes y de individuos sanos.
3. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los dos grupos de estudio con el fin de definir si alguna de las variantes de los genes *IL1* o *IL1RN* pudieran conferir susceptibilidad para el desarrollo del IAM.
4. Cuantificar la concentración de la proteína IL-1 β en el suero de ambos grupos y relacionarla con el genotipo de cada individuo, para verificar si existe alguna relación entre el genotipo y el nivel de producción de IL-1 β .

6. Hipótesis

Algunos de los alelos de los genes polimórficos de *IL1* y de *IL1RN*, que codifican para citocinas involucradas en el desarrollo de la placa aterosclerótica, y por consiguiente del IAM, pueden diferenciar a los pacientes de los individuos sanos y ser considerados como alelos de susceptibilidad o protección hacia dicha enfermedad.

7. Materiales y Métodos

7.1. Diseño del estudio

Tipo del estudio: Observacional, transversal y comparativo.

7.2. Estrategia General

En el presente estudio se incluyeron pacientes con diagnóstico de IAM e individuos sanos, a los cuales se les tomó una muestra de sangre a partir de la cual se obtuvo el suero y se extrajo el ADN. El suero se utilizó para el estudio bioquímico mientras que el ADN se utilizó para el estudio molecular. En la figura 10 se observa el diagrama de la estrategia general empleada en el estudio.

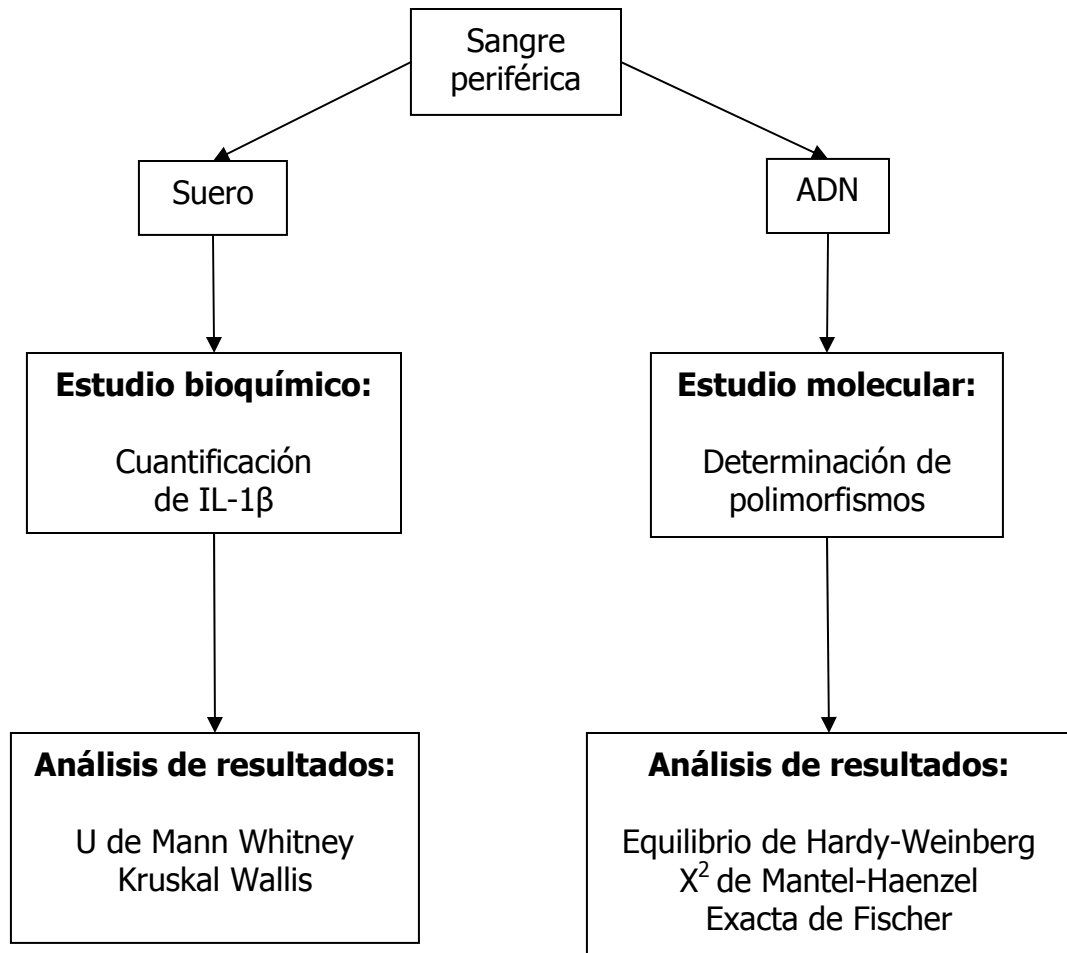


Figura 10. Estrategia general empleada en el presente estudio.

7.3. Sujetos de estudio

De acuerdo con el cálculo de tamaño de muestra (Díaz y Fernández, 2002), el grupo de pacientes incluyó al menos 100 individuos mestizos mexicanos, no relacionados entre sí, que ingresaron al Departamento de Urgencias y a la Unidad Coronaria del Instituto Nacional de Cardiología con diagnóstico de infarto agudo del miocardio.

En el grupo de individuos sanos se incluyeron al menos 100 voluntarios, no relacionados entre sí, sin diagnóstico de enfermedad cardiovascular alguna.

Como requisito adicional para ambos grupos, se consideró que cada individuo estudiado, y por dos generaciones previas a él, hubiesen nacido en México. Así mismo, se les invitó a participar en el presente estudio y se obtuvo consentimiento informado voluntario. El estudio es de riesgo mínimo, ya que sólo incluyó la venopunción antecubital para la obtención de 15 ml de sangre periférica. Cabe mencionar que el presente proyecto cumple con los requisitos del Comité Institucional de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, por quien fue aprobado.

7.3.1. Criterios de inclusión

1. Que tanto pacientes e individuos sanos, así como sus dos últimas generaciones, hayan nacido en México.
2. Edad: 25 a 70 años.
3. En el caso de los pacientes, que al momento del ingreso presenten:
 - a) Síntomas de infarto agudo del miocardio caracterizado por dolor de tipo anginoso (localizado en el pericardio, el cual se puede irradiar hacia la base del cuello, la mandíbula o hacia las extremidades superiores) de más de 30 minutos de duración. Este dolor pudo haber ocurrido en las últimas 6 horas y estar acompañado de síntomas neurodegenerativos como diaforesis (sudoración profusa), sensación de náuseas o vómito, sensación o acción de micción.
 - b) Cambios electrocardiográficos con la elevación del segmento ST de $\geq 0.1\text{mV}$ en dos o más de las desviaciones estándar electrocardiográficas.
4. Individuos sanos sin antecedentes ni síntomas de enfermedad cardíaca.
5. Consentimiento informado y firmado.

7.3.2. Criterios de exclusión

1. Embarazo o lactancia.
2. Síntomas sugestivos de disección aórtica.
3. Cualquier condición médica por la cual el individuo esté impedido para complementar el estudio.
4. Sujetos con sangrado severo.
5. Cualquier historia de accidentes cerebro-vasculares, isquemia cerebral transitoria o cualquier indicio de daño estructural del sistema nervioso central.
6. Retinopatía diabética hemorrágica u otra condición hemorrágica oftálmica.
7. En el caso de los individuos sanos
 - a) Presentar síntomas y/o antecedentes familiares o clínicos de enfermedad cardiovascular, principalmente IAM.
 - b) Electrocardiograma con cambios sugestivos de enfermedad.
8. No ser mexicano.

7.4. Estudio bioquímico

7.4.1. *Cuantificación de IL-1 β*

La cuantificación de los niveles de IL-1 β sérica se realizó mediante la técnica de ELISA (para más información ver Anexo II). Se reunieron los sueros de 86 pacientes y de 35 individuos sanos, los cuales fueron almacenados a -20° C para preservarlos hasta el momento de realizar la cuantificación de la proteína.

La estandarización de la técnica se realizó utilizando sueros de 10 voluntarios. La curva de estandarización que se observa en la figura 11, se realizó con concentraciones conocidas de los estándares de IL-1 β que se incluyen en el kit (Duo-Set Elisa Development System de la marca R&D Antibodies, Las Vegas, NV). Posteriormente, utilizando la ecuación de la recta obtenida de la curva de estandarización, se determinaron las concentraciones de IL-1 β presentes en los sueros.

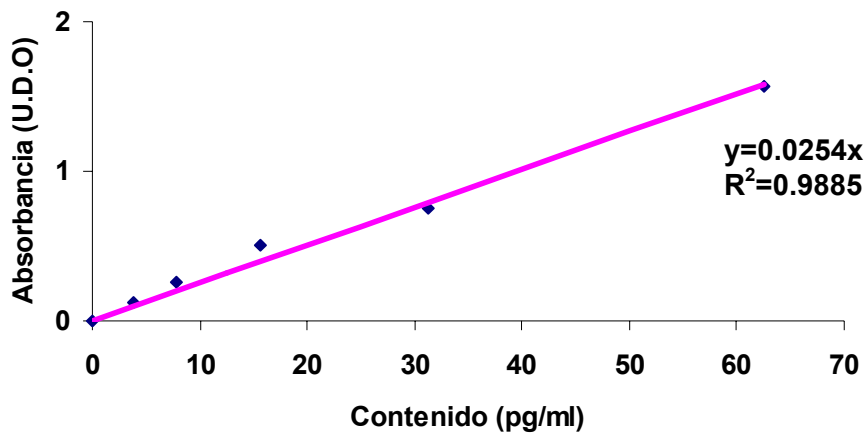


Figura 11. Curva de estandarización de la técnica de ELISA y ecuación de la recta obtenida por regresión lineal.

La cuantificación de la IL-1 β en el suero de pacientes e individuos sanos se realizó por triplicado. Para determinar las concentraciones de la proteína presente en los sueros se utilizó la ecuación de la recta obtenida del promedio de las curvas de estandarización realizadas para cada ensayo.

7.4.2. *Análisis de resultados*

Las concentraciones de la proteína IL-1 β en los sueros de pacientes e individuos sanos fueron analizadas con el programa NCSST versión 2001. Los datos obtenidos a partir de las muestras analizadas por ELISA fueron recopilados y se les aplicaron las pruebas de Ómnibus D'Agostino-Pearson y de F para evaluar los supuestos de normalidad y

homoscedasticidad, respectivamente. El resultado de ambas pruebas indico que los datos de los pacientes y de los individuos sanos no cumplían con los supuestos antes mencionados, por lo que se procedió a utilizar pruebas estadísticas no paramétricas; como las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para probar la hipótesis de que los niveles de IL-1 β eran mayores en el grupo de pacientes que en el de individuos sanos.

Primero se compararon los niveles de la proteína entre el grupo de pacientes y de individuos sanos mediante la prueba U de Mann Whitney, con nivel de significancia establecido como $p < 0.05$. Posteriormente, los resultados obtenidos de la cuantificación se agruparon de acuerdo al genotipo de cada sujeto obtenido mediante la genotipificación previa. Se formaron tres grupos para cada polimorfismo estudiado; el primer grupo estuvo conformado por los homocigotos dominantes, el segundo por los heterocigotos y el tercero por los homocigotos recesivos. En cada uno de estos grupos se analizaron los niveles cuantificados de IL-1 β y posteriormente se compararon entre ellos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, con nivel de significancia establecido como $p < 0.05$. De esta manera, se determinó si existía alguna diferencia significativa entre la producción de la proteína IL-1 β en alguno de los tres grupos de individuos con diferente genotipo.

7.5. Estudio molecular

7.5.1. Extracción de ADN

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos "vacutainer" con EDTA al 5% como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el ADN genómico mediante la técnica de extracción salina con Tritón X-100 (modificado de Lahiri y Nurnberger, 1991) que consiste en realizar la lisis de eritrocitos, seguida por la lisis de leucocitos para, posteriormente, precipitar las proteínas con NaCl; el ADN se lavó con etanol al 70%, se desecó al aire y se resuspendió con regulador de Tris-EDTA (TE) pH 8.0. Una vez purificado el ADN, éste se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm para calcular su pureza mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \times F \times d$$

donde DO_{260} es la densidad óptica a 260 nm, F es una constante igual a 0.05 (50µg de ADN=1DO a 260 nm) y d es el factor de dilución.

El criterio de pureza que se evaluó fue de $260 \text{ nm}/280 \text{ nm} \geq 1.6$, de igual forma se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%. Finalmente, el ADN se ajustó a una concentración de 200 ng/µL con TE (Tris-EDTA) y se realizaron alícuotas de éste, las cuales se guardaron a 4° C, -20° C y -70° C para su óptima preservación y uso posterior.

7.5.2. Análisis de sitios polimórficos

Los polimorfismos de los genes *IL-1* (*IL1B* e *IL1F10*) e *IL1RN* que se analizaron, son los que se han encontrado asociados con enfermedades cardiovasculares, principalmente aterosclerosis y enfermedad coronaria en diferentes poblaciones.

- a) Polimorfismo del gen *IL1B*: IL-1B-511
- b) Polimorfismo del gen *IL1F10*: IL-1F10.3
- c) Polimorfismos del gen *IL1RN*: IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T, IL1RN.6/2C>G e IL1RNVNTR

7.5.3. Determinación de los polimorfismos

Existen diversos métodos que se pueden utilizar para determinar polimorfismos genéticos, entre ellos se encuentran los fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y la secuenciación directa, la cual permite conocer la región de estudio base por base. En este estudio se utilizaron las técnicas de PCR, RFLP's y PCR en tiempo real (PCR-TR) . La descripción de dichas técnicas se puede consultar en el anexo I de este trabajo. Los iniciadores específicos que se utilizaron para la determinación de los polimorfismos se detallan en la Tabla 4. La estandarización de las diferentes técnicas se realizó utilizando el ADN extraído de muestras de sangre periférica de sujetos voluntarios no relacionados con el estudio.

Polimorfismo	Identificación del SNP de referencia	Técnica empleada	Iniciador específico <i>sentido</i>	Iniciador específico <i>antisentido</i>
IL-1B-511	rs16944	RFLP's	5'-ACTTAAGTTTAGGAATCTTCCCACT-3'	5'-GAGCTTATCTCCAGGGTTGC-3'
IL1F10.3	rs3811058	PCR-TR	5'- CTCAGCAACACTCCTAT -3'	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA -3'
IL1RN.6/1C>T	rs315952	PCR-TR	5'-CACCTGCCCATCTTTTGATT-3'	5'-CCTTCGTCAGGCATATTGGT-3
IL1R/N.4T>C	rs419598	PCR-TR	5'-CAAGGTGGTGATTTCAGAGCA-3'	5'-GGGAGGAAAGGGAAGAAGAG-3'
IL1RN.6/2C>G	rs315951	RFLP's	5'-TCTACTTCCAGGAGGACGAGTAGTA-3'	5'-GGAGGCAGAGTCCTGTGACCAGGAT3'
IL1RNVNTR	-----	PCR	5'- CTCAGCAACACTCCTAT -3'	5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA -3'

Tabla 4. Polimorfismos incluidos en el presente estudio, nombre oficial de éstos, técnica empleada para su determinación e iniciadores específicos utilizados.

7.5.3.1. Polimorfismo IL-1B-511

El polimorfismo IL-1B-511 se determinó mediante la técnica de RFLP's. Como primer paso se realizó una PCR con los iniciadores específicos que se detallan en la Tabla 4 y bajo las siguientes condiciones: 94°5', (94°30", 62°30", 72°1') 35 ciclos, 72°5', 4°∞. El tamaño del amplificado esperado es de 250 pb, después de la verificación de la amplificación se realizó la digestión con la enzima de restricción Ava I (New England BioLabs).

En la figura 12 se muestra una de las imágenes obtenidas de la verificación del producto de la PCR y en la figura 13 una imagen de la electroforesis realizada después de la digestión.

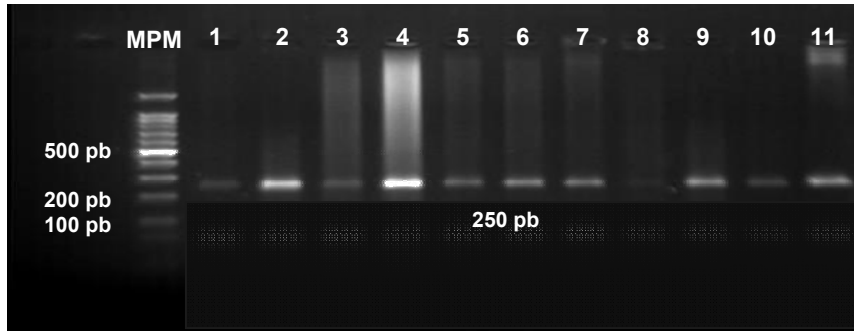


Figura 12. Producto de PCR del polimorfismo IL-1B-511, ubicado en la parte promotora del gen *IL1B*. MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-11 banda de 250 pb, correspondiente al fragmento amplificado para su análisis por RFLP's. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

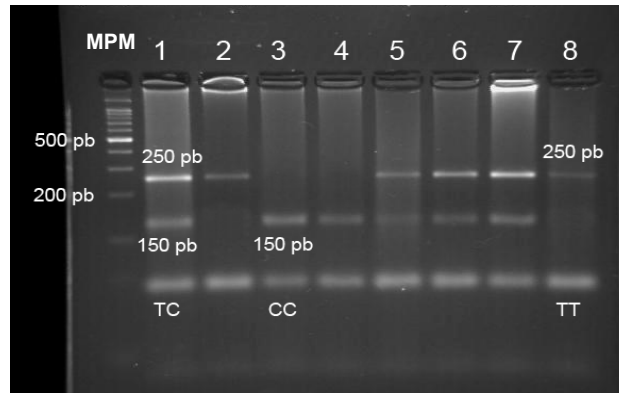


Figura 13. Patrón de restricción del polimorfismo IL-1B-511 utilizando la enzima *Ava I* (New England BioLabs). MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-8 patrones de restricción de muestras de pacientes. Carriles 1, 5, 6 y 7 genotipo TC; el alelo T de no corte corresponde a 250 pb y el alelo de corte C a 150 pb y 100 pb. Carriles 2 y 8 homocigoto para el alelo T (250 pb). Carriles 3 y 4 homocigoto para el alelo C (150 pb y 100 pb). Gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

7.5.3.2. Polimorfismos *IL1F10.3*, *IL1RN.6/1C>T* e *IL1R/N.4T>C*

Los polimorfismos *IL1F10.3*, *IL1RN.6/1C>T* e *IL1R/N.4T>C* se determinaron mediante la técnica de PCR-TR. Para llevar a cabo la técnica, se utilizaron las sondas de hibridación específicas Taqman. Para cada polimorfismo se empleó una pareja de dichas sondas (se utilizaron los oligonucleótidos específicos que se enlistan en la Tabla 4). En la reacción de la PCR-TR, se colocó el ADN a una concentración aproximada de 10 ng/ μ L, la mezcla para la reacción y las sondas Taqman. Dicha reacción se realiza en un equipo especial para PCR-TR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), posteriormente se obtuvieron los genotipos de cada muestra en el software del equipo mediante la interpretación de un mapa de discriminación alélica, como el que se observa en la figura 14 (Holland, 1991).

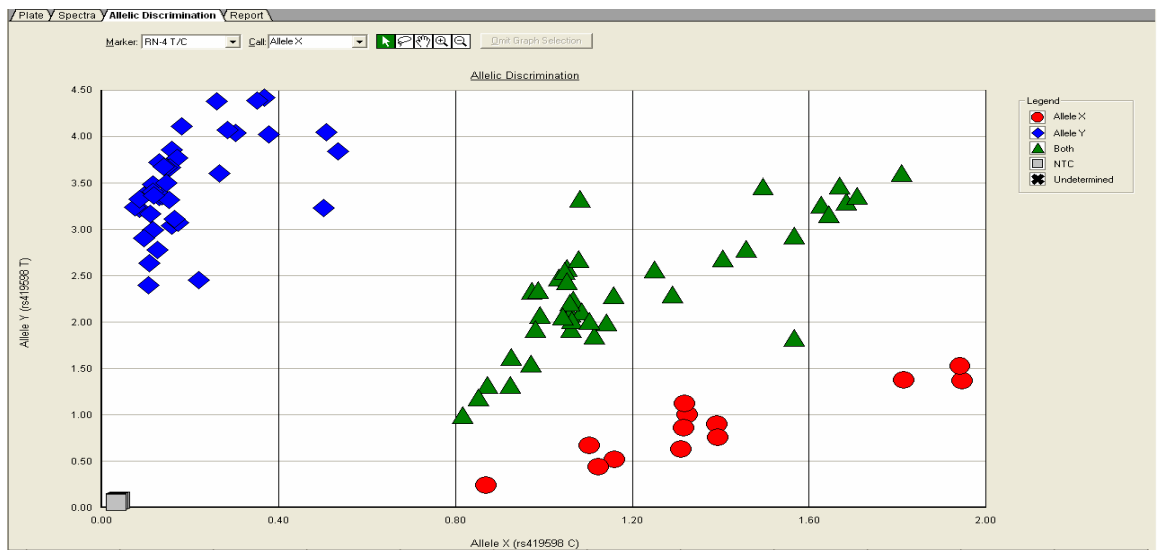


Figura 14. Mapa de discriminación alélica para el polimorfismo *IL1R/N.4T>C*. Los rombos representan el genotipo homocigoto para el alelo T, los triángulos el genotipo heterocigoto y los círculos a los individuos homocigotos para el alelo C. Los cuadros grises son los controles negativos (NTC).

7.5.3.3 Polimorfismo *IL1RN.6/2C>G*

El polimorfismo *IL1RN.6/2C>G* se determinó mediante la técnica de RFLP's. La reacción de PCR se realizó con los iniciadores específicos que se detallan en la Tabla 4 y bajo las siguientes condiciones: 94°3', (94°30", 67°30", 72°40") 30 ciclos, 72°5', 4°∞. El tamaño esperado del amplificado es de 186 pb, después de la verificación de la amplificación se realizó la digestión con la enzima de restricción Fok I (New England BioLabs).

En la figura 15 se observa una de las imágenes obtenidas de la verificación del producto de la PCR y en la figura 16 una imagen de la electroforesis realizada después de la digestión.

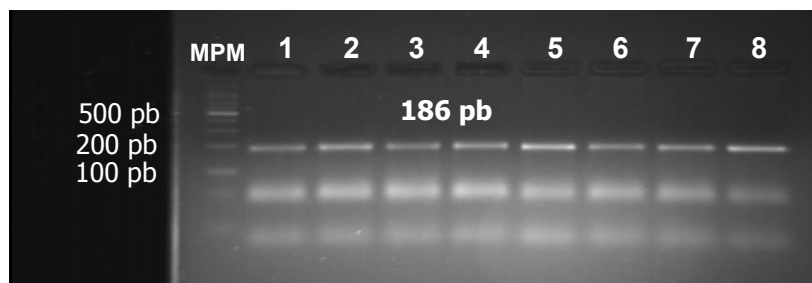


Figura 15. Producto de PCR del polimorfismo *IL1RN.6/2C>G*, del gen *IL1RN*. MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-8 banda de 186 pb, correspondiente al fragmento amplificado para su análisis por RFLP's. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

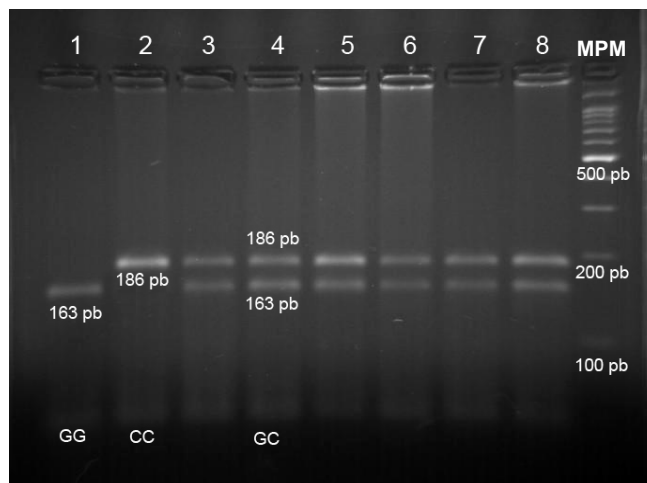


Figura 16. Patrón de restricción del polimorfismo IL1RN.6/2C>G utilizando la enzima Fok I (New England BioLabs). MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-8 digestión de muestras de pacientes. Carril 1 homocigoto para el alelo G (163 pb y 22 pb). Carril 2 homocigoto para el alelo C (186 pb). Carriles 3-8 genotipo GC; el alelo C de no corte corresponde a 186 pb y el alelo de corte G a 163 pb y 22 pb. Gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

7.5.3.4. Polimorfismo IL1RVNTR

El polimorfismo IL1RVNTR, que incluye repeticiones en tándem de número variable, se determinó mediante la técnica de PCR utilizando los iniciadores específicos mencionados en el Tabla 4. Las condiciones utilizadas para la amplificación de este polimorfismo fueron 94°3', (94°30'', 58°30'', 72°30'') 30 ciclos, 72°5', 4°∞. Las imágenes que se muestran en las figuras 17 y 18 corresponden a la electroforesis realizada al producto de la amplificación de este polimorfismo. Los alelos se designaron de acuerdo al peso molecular de las bandas amplificadas en cada muestra. La relación de pesos moleculares y alelos se señala en la Tabla 5.

Alelo	Tamaño (pb)
1	410
2	240
3	500
4	325
5	595

Tabla 5. Designación de alelos de acuerdo con los pesos moleculares correspondientes al polimorfismo IL1RNVNTR.

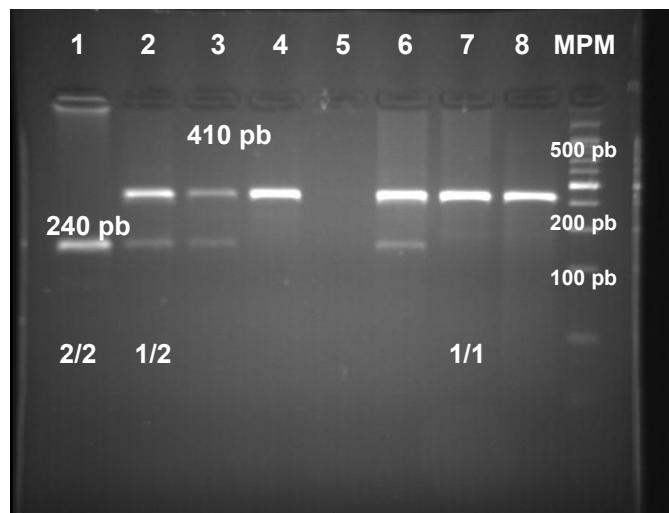


Figura 17. Alelos 1 y 2 del polimorfismo IL1RNVNTR, del gen *IL1RN*. MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-8 amplificados de muestras de pacientes. Carril 1, genotipo 2/2 correspondiente a 240 pb. Carriles 2, 3 y 6 genotipo 1/2 correspondientes a 410 pb y 240 pb. Carriles 4, 7 y 8 genotipo 1/1 correspondiente a 240 pb. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

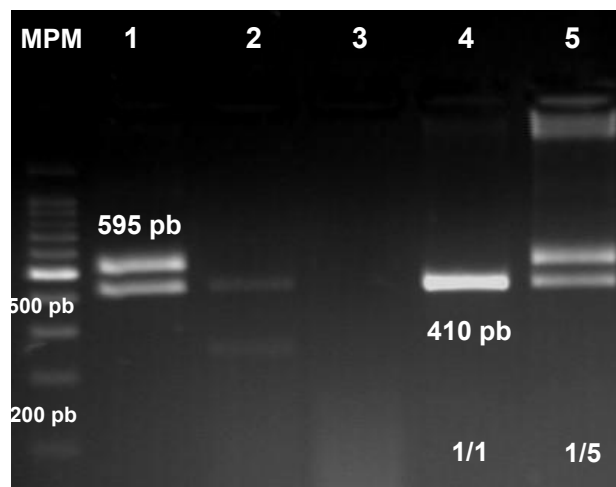


Figura 18. Alelos 1 y 5 del polimorfismo IL1RVNTR, del gen *IL1RN*. MPM: Escalera de 100 pb (Fermentas). Carriles 1-5 amplificados de muestras de pacientes. Carriles 1 y 5 genotipo 1/5 correspondiente a 410 pb y 595 pb. Carril 4 genotipo 1/1 correspondientes a 410 pb. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

7.5.4. Haplotipo de Riesgo

Posteriormente, con los resultados de las determinaciones de los 4 polimorfismos del gen de *IL1RN* (IL1R/N.4T>C, IL1RN.6/1C>T, IL1RN.6/2C>G e IL1RVNTR) se obtuvo el haplotipo de riesgo con el programa Haploview versión 4.0 (para mayor información ver Anexo I, I.4.). En dicho programa se ingresaron los diplotipos, obtenidos de cada polimorfismo, de los pacientes y de los individuos sanos. Haploview realiza varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL) que utiliza para crear una representación gráfica, también conocida como mapa de haplotipos. El DL hace referencia a una situación en que una combinación particular de alelos en dos loci próximos segregan

ligados más frecuentemente que lo que cabría esperar por azar dada su frecuencia en la población (Sudbery, 2004). Los cuadros de colores dentro del mapa de haplotipos representan las relaciones de DL; los cuadros color rojo brillante representan una clara evidencia de DL, los de color rojo claro o rosa indican una leve evidencia de DL y los cuadros color blanco significan que no existe DL. Al seleccionar grupos de marcadores (polimorfismos) el programa genera los posibles haplotipos y su frecuencia en la población (Barrett *et al.*, 2005).

7.5.5. Análisis de resultados

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes *IL1B*, *IL1F10* e *IL1RN* se determinaron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de X^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2 x 2 usando el programa estadístico EpiInfo (V. 5.0 USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Cuando el número comparado en alguna celda era menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fischer. El nivel de significancia establecido para p fue de $p < 0.05$. El riesgo relativo con intervalo de confianza (IC) al 95% fue evaluado como razón de momios (RM), de acuerdo al método de Woolf (Woolf, 1955).

8. Resultados

En el grupo de pacientes el promedio de la edad fue de 57.07 años, de un total de 115 individuos el 10% eran mujeres y el 90% eran hombres. En el grupo de individuos sanos el promedio de la edad fue de 56.70 y de un total de 103 individuos el 52% eran mujeres y el 48% eran hombres. La diferencia de género entre ambos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

8.1. Estudio bioquímico

8.1.1. Cuantificación de IL-1 β sérica

Los datos obtenidos de la cuantificación de la IL-1 β en el suero de pacientes e individuos sanos fueron analizados con el programa NCSS versión 2001; la estadística descriptiva de ambos grupos se muestra en la Tabla 6.

	n	Contenido (pg/ml) ± E.S.
Pacientes	86	6.6636 ± 2.1033
Individuos Sanos	35	7.1961 ± 1.8638

Tabla 6. Estadística descriptiva de la cuantificación sérica de IL-1 β en los grupos de pacientes e individuos sanos. Los valores mostrados representan el promedio y el error estándar.

En primer lugar se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para probar la hipótesis de que los niveles de IL-1 β eran mayores en el grupo de pacientes que en el de individuos sanos. En la introducción se menciona que la presencia de IL1RN*2 incrementa significativamente la producción de IL-1 β *in Vitro*; por lo que se formaron 3 subgrupos con los datos de los pacientes y 3 subgrupos con los datos de los individuos sanos, dependiendo del genotipo obtenido de la determinación del polimorfismo IL1RVNTR (1/1, 1/2, 2/2). Se comparó si existían diferencias estadísticamente significativas entre estos 3 subgrupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

El valor de p obtenido de la prueba de U de Mann-Whitney fue de 0.999994, lo que indica que la concentración de IL-1 β sérica no es mayor en el grupo de pacientes comparado con la concentración de la proteína en el grupo de individuos sanos. Posteriormente se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para verificar diferencias entre los pacientes con genotipos (1/1, 1/2 y 2/2); el valor de p obtenido fue de 0.920866 lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con los 3 diferentes genotipos. Así mismo la prueba fue aplicada para evaluar posibles diferencias en el grupo de individuos sanos dependiendo del genotipo y el valor de p

obtenido fue de 0.218532, lo que indica que la cantidad de IL-1 β no es diferente dependiendo del genotipo de los individuos. Posteriormente, se realizó la comparación entre el subgrupo de pacientes con genotipo 1/1 y el subgrupo de individuos sanos con el mismo genotipo para evaluar si en el primer subgrupo la cantidad de IL-1 β era mayor que en el segundo utilizando la prueba U de Mann-Whitney. El valor de p obtenido de dicha comparación fue de 0.999993. La misma prueba se realizó para comparar los subgrupos de pacientes contra individuos sanos con genotipo 1/2 y con genotipo 2/2, obteniendo los valores de p de 0.149795 y 0.408481 respectivamente. Dichos valores indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos de pacientes e individuos sanos con el mismo genotipo.

8.2. Estudio molecular

8.2.1. Polimorfismo IL-1B-511

Se determinaron los genotipos de 109 pacientes y 103 individuos sanos, para el polimorfismo IL-1B-511. Los resultados de la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes e individuos sanos se muestran en la Tabla 7. Como puede observarse, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Sin embargo, se observan valores cercanos a una $p=0.05$ al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del alelo C ($p=0.60$, RM=1.11 IC al 95%

0.74-1.67) y del genotipo C/C ($p=0.053$, (RM=2.58 con un IC al 95% de 0.89-7.82), respectivamente. De igual forma, en un modelo recesivo, se evaluaron los genotipos TT y TC contra el genotipo CC (TT + TC vs CC), obteniéndose un valor de p de 0.05321 (RM=0.388, IC al 95% 0.144-1.04). Lo anterior podría indicar que los genotipos TT y TC confieren un riesgo menor para el desarrollo del padecimiento, mientras que el genotipo CC podría conferir un mayor riesgo para el desarrollo de la patología.

	Pacientes n=109		Individuos Sanos n=103		Valor de p	RM (IC al 95%)
Alelos	n	fa	n	fa		
T	144	(0.6605)	141	(0.6845)		---
C	74	(0.3394)	65	(0.3155)	0.60	1.11 (0.74-1.67)
Genotipos	n	fg	n	fg		
TT	50	(0.4587)	44	(0.4272)		---
TC	44	(0.4037)	53	(0.5146)		---
CC	15	(0.1376)	6	(0.0582)	0.053	2.58 (0.89-7.82)
TT + TC vs CC					*0.053	0.388 (0.14-1.04)

Tabla 7. Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL-1B-511 en los grupos de pacientes con IAM y de individuos sanos. El valor de p se obtuvo de la comparación entre las frecuencias alélicas o genotípicas de ambos grupos. El valor de $*p$ se obtuvo al evaluar los genotipos TT y TC contra el genotipo CC, en un modelo recesivo.

8.2.2. Polimorfismos *IL1F10.3*, *IL1RN.6/1C>T* e *IL1R/N.4T>C*

En la Tabla 8 se observan los resultados del polimorfismo *IL-1F10.3*. El valor de p para los alelos T y C, obtenido al comparar las frecuencias de ambos alelos entre el grupo de pacientes e individuos sanos, es de 0.059. Dicho valor de p es cercano al nivel de significancia establecido de $p < 0.05$. Se observa un incremento en la frecuencia alélica (fa) del alelo C en el grupo de pacientes comparado con la fa del grupo de individuos sanos. La RM para el alelo C es igual a 1.541, con un IC al 95% de 0.981-2.422. Así mismo, al comparar el genotipo TT entre el grupo de pacientes e individuos sanos se observa un incremento de la frecuencia genotípica (fg) en los individuos sanos, con un valor de p de 0.058 (RM=0.59, IC al 95% 0.33-1.06). Se utilizó un modelo dominante para evaluar el genotipo TT contra los genotipos TC y CC (TT vs TC + CC) obteniéndose un valor de p de 0.05815 (RM=1.699, IC al 95% 0.980-2.943), lo cual podría indicar que existe una tendencia hacia que los genotipos TC y CC confieran un mayor riesgo hacia el padecimiento, mientras que el genotipo TT podría conferir un riesgo menor.

	Pacientes n=106		Individuos Sanos n=103		Valor de p	RM (IC al 95%)
Alelos	n	fa	n	fa		
T	152	(0.7170)	164	(0.7961)		---
C	60	(0.2830)	42	(0.2039)	0.059	1.541 (0.98-2.42)
Genotipos	n	fg	n	fg		
TT	51	(0.4811)	63	(0.6117)	0.058	0.59 (0.33-1.06)
TC	50	(0.4717)	38	(0.3689)		---
CC	5	(0.0472)	2	(0.0194)		---
TT vs TC+CC					*0.058	1.699 (0.98-2.94)

Tabla 8. Comparación de las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL1F10.3 en el grupo de pacientes con IAM y en el grupo de individuos sanos. El valor de p se obtuvo de la comparación entre las frecuencias alélicas o genotípicas de ambos grupos. El valor de $*p$ se obtuvo al evaluar los genotipos TT vs TC+CC, en un modelo dominante.

Como se observa en las Tablas 9 y 10; la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes y el grupo de individuos sanos de los polimorfismos IL1RN.6/1C>T e IL1R/N.4T>C no muestra diferencias estadísticamente significativas.

	Pacientes n=106		Individuos Sanos n=102		Valor de p
Alelos	n	fa	n	fa	
T	168	(0.7925)	149	(0.7304)	NS
C	44	(0.2075)	55	(0.2696)	
Genotipos	n	fg	n	fg	
TT	66	(0.6226)	53	(0.5196)	NS
TC	36	(0.3396)	43	(0.4216)	
CC	4	(0.0377)	6	(0.0588)	

Tabla 9. Comparación de las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL1RN.6/1C>T en el grupo de pacientes con IAM y en el grupo de individuos sanos. NS: No significativo, $p < 0.05$.

	Pacientes n=104		Individuos Sanos n=102		Valor de p
Alelos	n	fa	n	fa	
T	140	(0.6731)	141	(0.6912)	NS
C	68	(0.3269)	63	(0.3088)	
Genotipos	n	fg	n	fg	
TT	48	(0.4615)	48	(0.4706)	NS
TC	44	(0.4231)	45	(0.4412)	
CC	12	(0.1154)	9	(0.0882)	

Tabla 10. Comparación de las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL1R/N.4T>C en el grupo de pacientes con IAM y en el grupo de individuos sanos. El valor de p se obtuvo de la comparación entre las frecuencias alélicas o genotípicas de ambos grupos. NS: No significativo, $p < 0.05$.

8.2.3. Polimorfismo IL1RN.6/2C>G

Se determinaron los genotipos de 118 pacientes y 109 individuos sanos para el polimorfismo IL1RN.6/2C>G. Los resultados de la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes e individuos sanos se muestran en la Tabla 11. El análisis de frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos no muestra una diferencia estadísticamente significativa.

	Pacientes n=118		Individuos Sanos n=109		Valor de p
Alelos	n	fa	n	fa	
G	180	(0.7627)	173	(0.7934)	NS
C	56	(0.2373)	45	(0.2064)	
Genotipos	n	fg	n	fg	
CG	48	(0.4068)	43	(0.3945)	NS
GG	66	(0.5593)	65	(0.5963)	
CC	4	(0.0338)	1	(0.0092)	

Tabla 11. Comparación de las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL1RN.6/2C>G en el grupo de pacientes con IAM y en el grupo de individuos sanos. El valor de p se obtuvo de la comparación entre las frecuencias alélicas o genotípicas de ambos grupos. NS: No significativo, $p < 0.05$.

8.2.4. Polimorfismo IL1RVNTR

La Tabla 12 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de pacientes y el grupo de individuos sanos para los diferentes alelos del polimorfismo IL1RVNTR. Se observa una mayor fa del alelo 2 en el grupo de pacientes comparado con la fa de los individuos sanos ($p=0.0000201$; RM=3.560, IC al 95% de 1.96 – 6.47). Igualmente, hay un incremento en la fg 1/2 en el grupo de pacientes comparado con la fg el grupo de individuos sanos; dicha diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.0000631$; RM= 4.04, IC al 95% de 1.89 – 8.81).

De la misma forma el alelo 1 muestra un incremento de su fa en el grupo de individuos sanos comparado con el grupo de pacientes ($p=0.0000725$; RM=0.281, IC al 95% de 0.15-0.51). Así mismo, se observa un incremento en la fg 1/1 en el grupo de individuos sanos comparada con la fg del grupo de pacientes ($p=0.0000094$; RM=0.25, IC al 95% 0.12 – 0.49).

Utilizando un modelo dominante, se realizó la comparación del genotipo 1/1 contra los genotipos 1/1 y 1/2 (1/1 vs 1/2 + 2/2), obteniéndose un valor de $p=0.0000083$ (RM=4.415, IC al 95% de 2.24-8.72) lo que indica que los genotipos 1/2 y 2/2 son de mayor riesgo para el desarrollo del IAM en comparación con el genotipo 1/1.

Debido a la diferencia estadísticamente significativa que existe en el género entre los grupos de pacientes y de individuos sanos se realizó un análisis tomando en cuenta únicamente a los individuos del género masculino de ambos grupos para el polimorfismo IL1RVNTR. En este segundo análisis los resultados obtenidos son similares a los que

se observan en la Tabla 12. Los resultados del segundo análisis para la diferencia entre ambos grupos indican un incremento en la fa del alelo 2 en el grupo de pacientes (0.237) comparada con la misma frecuencia en el grupo de individuos sanos (0.125), ($p=0.0240681$ (RM=2.18, IC al 95% de 1.05-4.61). Así mismo, al comparar la fg 1/2 entre ambos grupos se observa un incremento de dicha frecuencia en el grupo de pacientes (0.374) con respecto al grupo de individuos sanos (0.166), ($p=0.0106335$ (RM=2.98, IC al 95% de 1.18-7.77).

En cuanto al análisis del alelo 1, tomando en cuenta únicamente a los individuos del género masculino, se observa a su vez un incremento en la fa en el grupo de individuos sanos (0.875) comparada con la fa del grupo de pacientes(0.763), ($p=0.0240681$ (RM=0.46, IC al 95% de 0.22-0.95) y al comparar la fg 1/1 entre ambos grupos se observa un incremento en la fg del grupo de individuos sanos (0.792) con respecto al grupo de pacientes (0.575), ($p=0.0102445$ (RM=0.36, IC al 95% de 0.15-0.85).

Los resultados obtenidos en el segundo análisis indican que a pesar del sesgo que pudiera generar la diferencia estadísticamente significativa debida al género entre ambos grupos de estudio, los resultados previamente obtenidos (Tabla 12) son completamente válidos.

	Pacientes n=115		Individuos Sanos n=103		Valor de p	RM (IC al 95%)
Alelos	n	fa	n	fa		
1	173	(0.752)	185	(0.898)	0.0000725	0.281 (0.15 - 0.51)
2	52	(0.226)	16	(0.078)	0.0000201	3.560 (1.96 - 6.47)
3	0	(0.000)	3	(0.015)	NS	---
4	3	(0.013)	2	(0.009)	NS	---
5	2	(0.009)	0	(0.000)	NS	---
Genotipos	n	fg	n	fg		
1/1	64	(0.557)	86	(0.835)	0.0000094	0.25 (0.12 - 0.49)
1/2	40	(0.348)	12	(0.117)	0.0000631	4.04 (1.89 - 8.81)
1/3	0	(0.000)	1	(0.009)	NS	---
1/4	3	(0.026)	0	(0.000)	NS	---
1/5	2	(0.017)	0	(0.000)	NS	---
2/2	6	(0.052)	2	(0.019)	NS	---
3/3	0	(0.000)	1	(0.009)	NS	---
4/4	0	(0.000)	1	(0.009)	NS	---
1/1 vs 1/2+2/2					*0.0000083	4.415 (2.24-8.72)

Tabla 12. Comparación de las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo IL1RNVNTR. El valor de p se obtuvo de la comparación entre la frecuencia alélica o genotípica de referencia contra el resto de las frecuencias. El valor de $*p$ se obtuvo al evaluar los genotipos 1/1 vs 1/2+2/2, en un modelo dominante. NS: No significativo, $p < 0.05$.

8.2.5. Haplotipo de riesgo

Con los resultados obtenidos de los polimorfismos del gen *IL1RN* (IL1R/N.4T>C, IL1RNVNTR, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G) se evaluó el posible haplotipo de riesgo con el programa haploview versión 4.0. Como se mencionó en la sección de análisis de resultados, el programa realiza varias mediciones de DL que utiliza para crear una representación gráfica, también conocida como mapa de haplotipos. El número de pacientes utilizado para formar el haplotipo fue de 99 y el número de individuos sanos de 97; los mapas obtenidos se muestran en la figura 19.

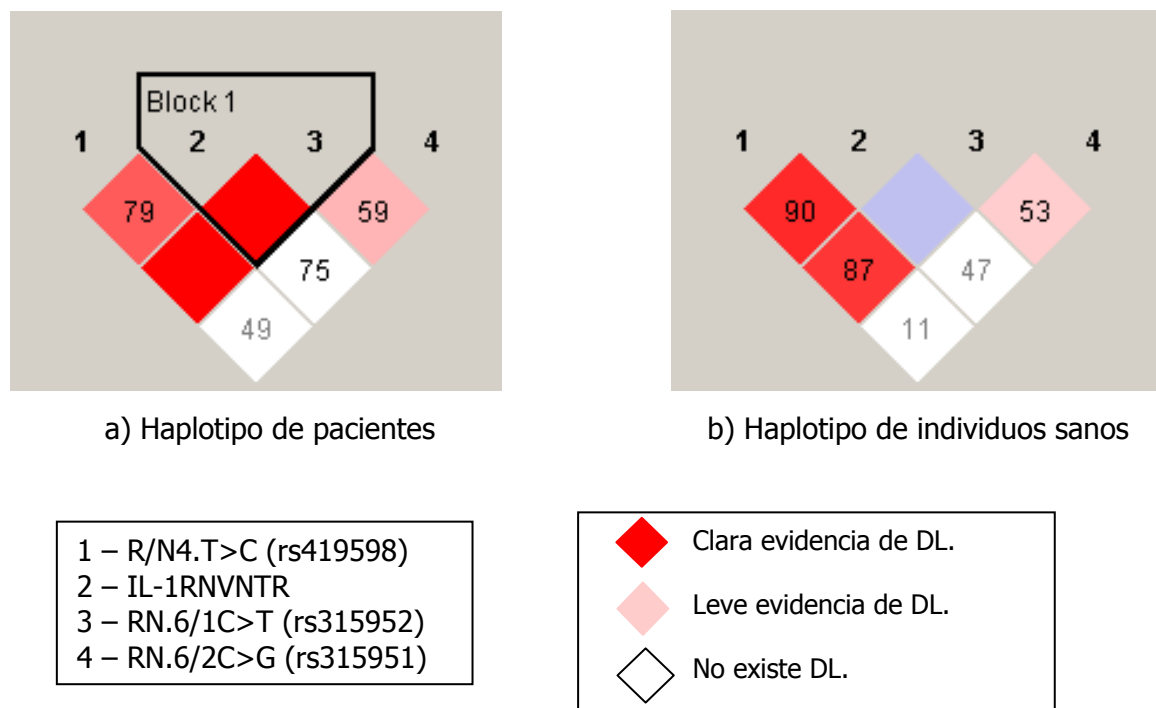


Figura 19. Mapa de haplotipos del grupo de pacientes con IAM (a) y del grupo de individuos sanos (b). El mapa de haplotipos es una representación gráfica de varias mediciones de disequilibrio de ligamiento (DL). En a) se observa un diplotipo formado por los polimorfismos IL1RNVNTR e IL1RN.6/1C>T (rs315952), lo que indica que existe una clara evidencia de DL entre estos polimorfismos.

Diplotipo Pacientes	Diplotipo Individuos Sanos	Valor de p	RM (IC al 95%)
2/T (0.253)	2/T (0.088)	0.002	3.76 (1.50-9.68)

Tabla 13. Frecuencia del diplotipo 2/T en el grupo de pacientes e individuos sanos. Dicho haplotipo se obtuvo con el programa Haploview versión 4.0 y está formado por los polimorfismos IL1RNVNTR e IL1RN.6/1C>T.

En la figura 19 se esquematiza el haplotipo formado con los polimorfismos R/N.4T>C, IL1RNVNTR, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G del gen *IL1RN*. Como puede observarse en el mapa de los pacientes se forma un diplotipo entre los polimorfismos IL1RNVNTR e IL1RN.6/1C>T, lo que indica que estos polimorfismos se encuentran en DL. Lo anterior no ocurre en el caso de los individuos sanos. La frecuencia del diplotipo IL1RNVNTR(2) / IL1RN.6/1C>T(T) en el grupo de pacientes y de individuos sanos se muestra en la Tabla 13, en este caso el valor de p es altamente significativo lo que indica que las personas con este diplotipo son 3.76 (RM=3.76, IC al 95% 1.50-9.68) veces más susceptibles de padecer IAM que quienes no lo poseen.

9. Discusión

Los resultados obtenidos del análisis del polimorfismo IL-1B-511 (rs16944) indican que el genotipo CC podría ser un factor de riesgo para el desarrollo del IAM, mientras que los genotipos TT y TC podrían conferir un riesgo menor para el desarrollo de dicho padecimiento. Anteriormente, se reportó la asociación del alelo T de este polimorfismo, en forma homocigota, con un 64% de protección contra el infarto del miocardio en población joven italiana. La homocigosidad para el alelo T se asoció con una disminución de aproximadamente 2 veces el riesgo de padecer dicha enfermedad (Iacoviello *et al.*, 2005). En dicho estudio también se observó que los monocitos de las personas portadoras del alelo T mostraban un decremento tanto en la síntesis de IL-1 β como en la expresión del factor tisular (FT), después de la estimulación con lipopolisacárido (LPS), en comparación con los monocitos de los individuos con genotipo CC.

La influencia de la respuesta inflamatoria en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis y por consecuencia del IAM es bastante conocida. Así mismo, existe la hipótesis de una relación entre el polimorfismo IL-1B-511 y la trombosis. La IL-1 β es un fuerte vínculo entre la inflamación y la coagulación; de hecho, esta proteína es capaz de estimular la síntesis del FT (también conocido como tromboplastina) en monocitos y células endoteliales. El FT activa la cascada de coagulación necesaria para la formación del trombo. En estudios *ex vivo*, se ha observado que los monocitos de las personas homocigotas para el alelo "protector" T, también se encuentran "protegidos" contra la activación de la cascada de coagulación en respuesta a un estímulo inflamatorio. En estas personas, la secreción de IL-1 β después de la estimulación con LPS fue significativamente menor comparada con la secreción de la misma proteína en monocitos de personas con genotipo CC. Dichas células también expresaron una

actividad procoagulante de FT significativamente menor después de la estimulación con LPS. Por lo tanto, el polimorfismo IL-1B-511 podría contribuir al riesgo de infarto del miocardio o de infarto isquémico modulando la respuesta celular a los estímulos inflamatorios y con la consecuente disminución de la activación de la cascada de coagulación (Iacoviello *et al.*, 2005).

En la población china existen dos estudios sobre el polimorfismo IL-1B-511 y su relación con enfermedades como el infarto isquémico y la hipertensión. En el estudio de Lai y colaboradores los resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de individuos sanos y el de afectados (Lai *et al.*, 2006). En contraste, en el estudio de Huang y colaboradores se encontró que los hombres portadores del alelo C tienen una presión sistólica menor comparada con los hombres con genotipo TT; en el grupo de mujeres no se encontró asociación significativa alguna. El resultado anterior sugiere un papel importante del polimorfismo IL-1B-511 en el control de la presión sanguínea en la población china con hipertensión (Huang *et al.*, 2004). Los estudios realizados en individuos chinos e italianos dan cuenta de que debido a la composición del genoma de cada población es necesario realizar estudios específicos para cada una de éstas, ya que no es posible extrapolar los resultados. Lo reportado en población china contrasta con los resultados obtenidos en este estudio y con los resultados obtenidos para la población caucásica italiana (Iacoviello *et al.*, 2005). Es importante considerar también las diferencias que existen en los factores de riesgo cardiovasculares en cada población. La prevalencia de dichos factores en México es de: hipertensión arterial 30%, hipercolesterolemia 27.1%, diabetes mellitus 10.7%, obesidad 24.4%, tabaquismo 36.6%, sedentarismo 55% y síndrome metabólico 13.6% (Pavia y Lara, 2005).

En cuanto al polimorfismo IL1F10.3 (rs3811058), el análisis de resultados indica que el alelo T podría conferir un menor riesgo para el desarrollo del IAM mientras que el alelo C conferiría un mayor riesgo. Así mismo, existe una tendencia estadística hacia que el genotipo TT confiera un riesgo menor hacia el padecimiento; mientras que los genotipos TC y CC conferirían un mayor riesgo. Este polimorfismo se ha estudiado poco; los reportes existentes se realizaron en enfermedades con un fuerte componente inflamatorio como la espondilitis anquilosante (Timms *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2006) y la artritis de tipo psoriática (Rahman *et al.*, 2006).

En el estudio realizado por Timms y colaboradores en 2004, los marcadores IL-1B-511 y el IL1F10.3 tuvieron una asociación estadísticamente significativa con la enfermedad. En ambos polimorfismos el alelo C confiere mayor riesgo para el desarrollo del padecimiento. Además del análisis individual de cada polimorfismo, se realizó un análisis de haplotipos encontrando una asociación más fuerte en este último. Los autores sugieren que lo anterior podría indicar que por sí solos los polimorfismos no se encuentran involucrados en la enfermedad, o bien que existe un efecto cooperativo entre los marcadores para el desarrollo de la espondilitis anquilosante (Timms *et al.*, 2004). De igual forma, existen datos de una asociación entre los marcadores IL1F10.3, IL1RN.4, e IL1RNVNTR y la espondilistis anquilosante en población Taiwanesa. En este estudio también se reporta una asociación de la enfermedad con el haplotipo formado por los marcadores antes mencionados y también con los polimorfismos IL1RN.6/1 e IL1RN.6/2 (Chou *et al.*, 2006). En el estudio realizado en población de Newfoundland Canadá, Rahman y colaboradores concluyen que el polimorfismo IL1F10.3 se encuentra en una región asociada con la susceptibilidad para la artritis de tipo psoriática (Rahman *et al.*, 2006).

Existe poca información sobre los polimorfismos, la expresión en tejidos y en enfermedades o la función que podría tener el gen *IL1F10*. Se cree que la proteína producto de este gen es un antagonista de la IL-1, ya que su secuencia tiene una homología del 37% con el gen *IL1RN* aunque su función exacta no se ha determinado. La proteína IL-1F10 se une al receptor soluble IL-1R1, sugiriendo que puede tener un papel importante en la regulación de la función de la proteína IL-1 β . En cuanto a la evidencia que existe de la expresión tejido-específica, se ha observado que se expresa en piel, células B activadas del bazo y lengua; lo que sugiere que podría ser un ligando de secreción en la defensa del huésped y otras respuestas inmunitarias así como en patofisiologías de tipo inflamatorio como serían el IAM, la espondilitis anquilosante y la artritis de tipo psoriática (Smith *et al.*, 2000; Dunn *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001).

En cuanto al polimorfismo IL1RNVNTR, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que tanto el alelo 2 como el genotipo 1/2 pueden considerarse marcadores de riesgo para el padecimiento del IAM. Mientras que alelo 1 y el genotipo 1/1 son marcadores de menor riesgo hacia el desarrollo de dicha enfermedad. En cuanto al análisis de genotipos se observó que los genotipos 1/2 y 2/2 son de mayor riesgo para el desarrollo del padecimiento en comparación con el genotipo 1/1.

El género puede ser un factor confusor del análisis por lo que se necesitan realizar estudios que lo tomen en cuenta como variable confusora. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la población del género masculino y la segunda causa en la población del género femenino (INEGI, 2003). A pesar de que en este estudio la diferencia de género entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa, el análisis realizado tomando en cuenta solamente a los individuos de

género masculino indica que los resultados obtenidos incluyendo ambos géneros son totalmente válidos.

Como se mencionó anteriormente, existen un gran número de reportes en los cuales se ha asociado el alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR (IL1RN*2) con diversas enfermedades de tipo inflamatorio como la colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso, osteoporosis, alopecia areata, psoriasis y esclerosis múltiple. De igual forma, esta variante alélica se ha encontrado relacionada con varias enfermedades cardiovasculares como la enfermedad de las arterias coronarias, la aterosclerosis y el infarto isquémico (Witkin *et al.*, 2002; Vélez-Castrillón *et al.*, 2004; Francis *et al.*, 1999; Dewberry *et al.*, 2000; Worrall *et al.*, 2003; Worrall *et al.*, 2007).

En uno de los primeros trabajos que abordó la posible asociación entre las variantes génicas de las citocinas con la susceptibilidad a enfermedades cardíacas, se encontró que el IL1RN*2 se encontraba significativamente asociado con la presencia de la enfermedad de las arterias coronarias, cuando se afectaba una sola arteria (ESA) pero no cuando la enfermedad se manifestaba en múltiples arterias (EMA). Lo anterior es indicativo de que existen diferencias genéticas, así como en las causas y mecanismos patogénicos en las dos clasificaciones de esta enfermedad. En dicho trabajo también se estudio el polimorfismo IL-1B-511 sin encontrar asociación alguna con el padecimiento (Francis *et al.*, 1999). Existe un segundo trabajo que igualmente estudia la asociación de los polimorfismos IL-1B-511 e IL1RNVNTR con la enfermedad de las arterias coronarias; dividiendo el grupo de estudio de la misma manera que en el trabajo anterior, en ESA y en EMA. En este caso, los autores no encontraron diferencias significativas entre los pacientes y los individuos sanos. Es importante resaltar que al realizar el análisis, en dicho estudio, ambos polimorfismos están en DL (Vohnout *et al.*,

2003). Posiblemente los resultados contradictorios de estos dos estudios se deban a la diferencia en los criterios empleados para la formación de los grupos de individuos sanos, pacientes con ESA y EMA. Otra variable importante podría ser el origen étnico de las poblaciones, ya que a pesar de ser ambas de origen caucásico el primer estudio se realizó en ingleses y el segundo en italianos.

De igual forma, existen investigaciones en las que se ha asociado la variante 2 del polimorfismo IL1RNVNTR (IL1RN*2) con la susceptibilidad hacia la aterosclerosis y hacia la aterosclerosis de arteria carótida. Dewberry y colaboradores estudiaron la expresión diferencial y las isoformas de la proteína IL-1ra en el endotelio de las arterias con enfermedad coronaria y en las células endoteliales estimuladas con LPS y TGF- β . Sus resultados indican que en las células endoteliales de las venas umbilicales humanas la expresión de IL-1ra se encuentra regulada por el polimorfismo IL1RN*2, ya que las células con el alelo 2 en forma homocigota (IL1RN*2*2) producen niveles 2 a 3 veces menores de la proteína en comparación con las células con genotipo 1/1 de este mismo polimorfismo; mientras que las células con el genotipo 1/2 sintetizan una cantidad de proteína intermedia (Dewberry *et al.*, 2000). Este dato tiene importantes implicaciones para el control genético de la IL-1ra en la pared arterial, apoya el papel del sistema de IL-1 en la patogenia de la aterosclerosis e implica un nivel de regulación complejo del IL1RN*2 en la producción basal de IL-1ra. Existen reportes previos de que el polimorfismo IL1RN*2 está asociado con un incremento en la producción de IL-1ra en monocitos, lo cual implicaría que dependiendo de la isoforma de la proteína que secreta la célula, el impacto del polimorfismo será diferente. Las células endoteliales secretan IL-1ra intracelular y sintetizan una menor cantidad de proteína cuando son portadoras del genotipo IL1RN*2*2; en contraste los monocitos con el mismo genotipo

sintetizan una mayor cantidad de la proteína en su isoforma soluble (Danis *et al.*, 1995; Wilkinson *et al.*, 1999; Dewberry *et al.*, 2000).

En un estudio complementario de Dewberry y colaboradores (2003), se demostró que la presencia del alelo 2 del polimorfismo está asociada con una reducción en el potencial del crecimiento y en la proliferación de las células endoteliales. La reducción en la proliferación es debida al incremento en la senescencia celular, el cual también se encontró relacionado con la presencia del genotipo IL1RN*2*2. Lo anterior sugiere que la presencia del genotipo IL1RN*2*2 provoca un desequilibrio en la actividad de los miembros de la familia de IL-1 favoreciendo la actividad agonista de la proteína IL-1. El recambio de las células endoteliales se incrementa en condiciones que favorecen la aterosclerosis como la hipertensión y los niveles altos de colesterol. El desarrollo acelerado de un epitelio disfuncional o senescente bajo estas condiciones, se asocia con la presentación clínica de la aterosclerosis (Dewberry *et al.*, 2003).

Worrall y colaboradores (2003) encontraron asociada la variante IL1RN*2 con la aterosclerosis de la arteria carótida. De igual forma que en el presente estudio, la ausencia del alelo 2 se asoció con un menor riesgo hacia el desarrollo de la aterosclerosis y la presencia del dicho alelo en forma homocigota se asoció con una mayor propensión hacia la enfermedad. Así mismo, se reportó un efecto de dosis génica para el polimorfismo IL1RN*2, con los portadores heterocigotos presentando un riesgo intermedio comparado con los individuos homocigotos para dicho alelo (Worrall *et al.*, 2003).

En cuanto a la asociación del IL1RN*2 con el infarto isquémico, en un estudio en 3 poblaciones se observó que existía asociación para los participantes de raza blanca

portadores del alelo 2 en forma homocigota. También observaron que el efecto de dicho alelo seguía un modelo genético recesivo. Este resultado indica que el locus *IL1RN* está asociado con el riesgo hacia infarto isquémico en la población caucásica y que los individuos homocigotos para el alelo 2 tienen un riesgo mayor para padecer la enfermedad (Worrall *et al.*, 2007). En otro estudio en el cual se incluyeron pacientes de origen coreano con infarto isquémico e individuos sanos, los resultados obtenidos fueron que la presencia del polimorfismo IL1RN*1 se asocia con un menor riesgo para padecer la enfermedad, mientras que la presencia de la variante IL1RN*2 se encuentra asociada a un mayor riesgo (Lee *et al.*, 2004). Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado en el presente estudio.

En cuanto al análisis del haplotipo de riesgo formado por los polimorfismos (IL1R/N.4T>C, IL1RNVNTR, IL1RN.6/1C>T e IL1RN.6/2C>G) del gen *IL1RN*, se obtuvo un diplotipo para el grupo de pacientes, formado por los polimorfismos IL1RNVNTR(2) e IL1RN.6/1C>T(T), lo que indica que éstos se encuentran en DL. En este caso los individuos portadores de este haplotipo tienen un riesgo de 3.76 ($p=0.002$, RM=3.76, IC al 95% 1.50-9.68) veces más de padecer IAM que quienes no lo poseen. Este resultado es similar al obtenido por el grupo de van Minkelen, en el cual encuentran un aumento de casi 4 veces de riesgo de padecer trombosis venosa para portadores del haplotipo H5H5 ($p=0.002$, RM=3.9, I.C. al 95% 1.6-9.7). Cabe mencionar que dicho haplotipo incluye la presencia del alelo T en los polimorfismos IL1R/N.4T>C e IL1RN.6/1C>T. En dicho trabajo se realizó el análisis de haplotipos y posteriormente se ubicó en que haplotipo podría encontrarse el polimorfismo IL1RNVNTR. El alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR se localizó en el haplotipo H3, en el cual también se localiza el polimorfismo IL1RN.6/1C>T(T). Dicho haplotipo podría ser equivalente al que se reporta en el presente estudio, aunque el grupo de van Minkelen no encontró una asociación entre este haplotipo y el riesgo de trombosis venosa. Es importante resaltar

que en un individuo con haplotipo H5H5 se encontró el alelo 2 del polimorfismo IL1RNVNTR en forma heterocigota (van Minkelen *et al.*, 2007). Lo anterior podría explicarse por las diferencias en el fondo genético de las poblaciones estudiadas.

Los resultados arriba mencionados en cuanto a la asociación del polimorfismo IL1RN*2 con un mayor riesgo para la enfermedad de las arterias coronarias (ESA), la aterosclerosis, la aterosclerosis de la arteria carótida, el infarto isquémico y el infarto agudo del miocardio dan cuenta de la fuerte relación que existe entre este polimorfismo y la inflamación, especialmente la regulación del proceso inflamatorio mediante el sistema IL-1ra. La regulación de este sistema resulta compleja, se sabe que las citocinas pro-inflamatorias juegan un papel integral en el incremento de la migración de células inflamatorias y que también están involucradas en la naturaleza pro-inflamatoria y pro-coagulante de las placas arterioscleróticas. En cambio, se cree que las citocinas anti-inflamatorias como la IL-1ra son efectivas en el control local de los procesos inflamatorios. Por lo tanto, es de esperarse que un cambio, como el polimorfismo IL1RN*2, que provoca una disminución en la secreción de proteína IL-1ra, aceleraría el desarrollo de la aterosclerosis y por lo tanto incrementaría el riesgo de padecer IAM o bien infarto isquémico. Lo anterior es apoyado por dos hechos importantes, el primero que los individuos homocigotos al IL1RN*2 presentan respuestas inflamatorias más prolongadas e intensas que los individuos con otros genotipos para dicho polimorfismo y el segundo, que la proteína IL-1ra retarda la arteriogénesis y que su ausencia total, en ratones knockout, provoca el desarrollo de inflamación crónica en la pared arterial (Witkin *et al.*, 2002; Nicklin *et al.*, 2000).

Es también importante mencionar que existe una regulación del proceso inflamatorio por diversas citocinas y otros mecanismos, por lo que es necesario tomar en cuenta la

influencia de otros polimorfismos, tanto en los genes del sistema de IL-1 como en otros genes involucrados en la respuesta inmune; los cuales también podrían afectar la respuesta inflamatoria de cada individuo. Así mismo, es necesario recordar que las citocinas son sintetizadas por una diversidad de células y que los polimorfismos podrían tener diferentes efectos dependiendo del tipo celular. Como se mencionó anteriormente, las células endoteliales secretan IL-1ra intracelular y sintetizan una menor cantidad de proteína cuando son portadoras del genotipo IL1RN*2*2; en contraste los monocitos con el mismo genotipo sintetizan una mayor cantidad de la proteína en su isoforma soluble. En cambio, los experimentos de estimulación de leucocitos han demostrado una hipersecreción de las proteínas IL-1ra e IL-1 β en células de individuos con genotipo IL1RN*2*2, en comparación con los individuos homocigotos IL1RN*1. En los monocitos con genotipo IL1RN*2 estimulados con M-CSF, se registra una disminución en la producción de IL-1 α y no se observa ninguna asociación con la producción de IL-1 β . Dicho polimorfismo podría estar en una región de regulación o en DL con otro polimorfismo que regula la transcripción de los genes *IL1A* e *IL1RN* (Santtila *et al.*, 1998; Danis *et al.*, 1995).

La síntesis de proteínas de diversos tipos celulares influye en la secreción sistémica de las citocinas, tanto de la IL-1 β como del IL-1ra. Como se mencionó anteriormente, se ha observado que las células endoteliales secretan IL-1ra intracelular y sintetizan una menor cantidad de dicha proteína cuando son portadoras del genotipo IL1RN*2*2, mientras que los monocitos con el mismo genotipo sintetizan una mayor cantidad de la proteína en su isoforma soluble (Danis *et al.*, 1995; Wilkinson *et al.*, 1999; Dewberry *et al.*, 2000). Por esta razón al realizar la cuantificación de las citocinas a nivel sistémico, como se realizó en este caso la cuantificación de IL-1 β , hay poca probabilidad de medir los efectos del genotipo sobre la síntesis de la proteína. Los resultados obtenidos en el

presente estudio de la cuantificación de la IL-1 β sérica en el grupo de pacientes e individuos sanos no arrojan diferencias estadísticamente significativas. De manera similar, al formar grupos dependiendo del genotipo del portador tampoco se obtienen diferencias significativas. En cambio, los estudios que han medido la síntesis de IL-1 β e IL-1ra a partir de las células y lo han relacionado con el genotipo tanto de los polimorfismos IL-1B-511 como del IL1RNVNTR han resultado exitosos (Danis *et al.*, 1995; Santtila *et al.*, 1998; Dewberry *et al.*, 2000, 2003; Iacoviello *et al.*, 2005). Por lo anterior, resulta altamente recomendable cuantificar la síntesis de las citocinas a nivel celular y no a nivel sistémico.

10. Conclusiones

Los resultados obtenidos del análisis de los polimorfismos permiten concluir que el alelo 2 y el genotipo 1/2 del polimorfismo IL1RNVNTR del gen *IL1RN*, están asociados con la propensión al desarrollo de IAM en pacientes mexicanos. De igual forma, existe una tendencia que indica que, el genotipo CC del polimorfismo IL-1B-511 podría ser un factor de riesgo para el desarrollo del IAM, mientras que el genotipo TT del polimorfismo IL1F10.3 conferiría un riesgo menor hacia dicho padecimiento. Así mismo, el polimorfismo IL1RN.6/1(T) se encuentra en DL con el polimorfismo IL1RNVNTR (2) en el grupo de pacientes y los individuos portadores de este diplotipo son aproximadamente 4 veces más susceptibles de padecer IAM que quienes no son portadores de dicho diplotipo.

En la parte bioquímica del trabajo, que consistió en la cuantificación de los niveles de IL-1 β sérica, se puede concluir que no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de dicha citocina entre el grupo de pacientes y el de individuos sanos, ni en relación con los diferentes genotipos analizados.

11. Perspectivas

Es necesario realizar experimentos sobre la funcionalidad de la variante IL1RNVNTR*2, la participación que tiene en el desarrollo de la placa arteriosclerótica, la interacción con las diversas células y su papel en la respuesta inflamatoria.

Así mismo, sería conveniente realizar un estudio prospectivo de este polimorfismo en familiares de pacientes con IAM, para evaluar el riesgo de padecer dicha enfermedad. Existe una cantidad de reportes que asocian a la variante IL1RNVNTR*2 con la susceptibilidad hacia enfermedades como la aterosclerosis, la aterosclerosis de la arteria carótida, el infarto isquémico y el IAM. Dicha variante también se ha relacionado con la arteriogénesis, la reducción en el potencial del crecimiento y la proliferación de las células endoteliales, características que aceleran el proceso de aterosclerosis.

Es también importante resaltar el papel que podrían tener la citocina IL-1ra recombinante humana (rhIL-1ra) como agente farmacológico y el polimorfismo IL1RNVNTR en la farmacogenómica. Un estudio clínico de fase 2 con la citocina rhIL-1ra demostró que dicha proteína recombinante es segura, bien tolerada por pacientes con infarto isquémico y además el tratamiento activo se asoció con un perfil sérico menos inflamatorio (Emsley *et al.*, 2005). Así mismo, existen estudios en los cuales la respuesta a los fármacos y la supervivencia de los pacientes varían dependiendo del genotipo de cada paciente. El grupo de Gromadzka (2007), reportó que los efectos del tratamiento con rhIL-1ra en infarto agudo son distintos en los pacientes con diferente genotipo del IL1RNVNTR y concluyen que la genotipificación de este polimorfismo sería útil en la planeación del tratamiento con rhIL-1ra en pacientes con infarto. Esta

recomendación es importante ya que el IL1RN*2 se ha asociado con un incremento en el riesgo de hemorragia y además en pacientes con el alelo 2 en forma homocigota se observó una mortalidad mayor a los 30 días después de haber padecido un episodio de infarto comparado con los portadores del alelo en forma heterocigota y los homocigotos para el alelo 1 (Gromadzka *et al.*, 2007; Worrall *et al.*, 2007). Por lo anterior, resulta importante utilizar el marcador IL1RN*2 para el pronóstico en los pacientes que han sufrido un episodio de infarto; así como para la decisión del tratamiento a seguir de manera individual.

12. Bibliografía

- ✓ Abbas AK, Lichtman AH. Inmunología celular y molecular. Quinta edición. Elsevier. España. 2004. 243-274 pp.
- ✓ Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. 1998. Annu. Rev. Immunol. 16:27-55.
- ✓ Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G, Eber B. Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. Am J Pharmacogenomics. 2003. 3:317-328.
- ✓ Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics. 2005. 21:263-265.
- ✓ Becker A, de Boer O, van der Wal A. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. Annu Rev Med. 2001. 52:289-297.
- ✓ Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. Circulation. 2000. 102:1114-1119.
- ✓ Carrillo Calvillo J, Bear Sandoval IR. Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo, lípidos y aterotrombosis. Aterosclerosis: Un proceso inflamatorio. Arch. Cardiol. Méx. 2004. 74: S379-S384.
- ✓ Cayman chemical. Interleukin 1- β (human) EIA Kit. Cat. No. 583311. Cayman chemical company. EUA. 2004
- ✓ Chou CT, Timms AE, Wei JCC, Tsai WC, Wordsworth BP, Brown MA. Replication of association of IL1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Taiwanese Chinese. Annals of the Rheumatic Diseases. 2006. 65:1106-1109.
- ✓ Clarke CA. Genética Humana. Principios básicos. Serie Biotecnologías. Colección de Textos Politécnicos. Editorial Noriega-UTEHA. México.1999. 37-40 pp.
- ✓ Corti R, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenic concepts of acute coronary syndrome. J Am Coll Cariol. 2003. 41:7S-14S.

- ✓ Danis VA, Millington M, Hland VJ, Grenan D. Cytokine production by monocytes: intersubject variation and relationship to an IL-1ra gene polymorphism. *Clin Exp Immunol.* 1995. 99:303-310.
- ✓ Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 Receptor Antagonist Expression in Human Endothelial Cells and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. 20:2394-2400.
- ✓ Dewberry RM, Crossman DC, Francis SE. Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1RN) Genotype Modulates the Replicative Capacity of Human Endothelial Cells. *Circulation Research.* 2003. 92:1285-1287.
- ✓ Díaz S y Fernández S. Cálculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. *Cad Aten Primaria* 2002; 9: 148-150.
- ✓ Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist. *Blood.* 1991. 77:1627-1652.
- ✓ Dunn E, Sims JE, Nicklin M, O'Neill L. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends in Immunology.* 2001. 22:533-536.
- ✓ Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005. 76:1366-1372.
- ✓ ENTREZ SNP, disponible en el URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> Fecha de consulta: 21 de enero de 2008. Fecha de última actualización: 10 de enero de 2007.
- ✓ Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, Jeffery S, Kaski JC, Cumberland DC, Duff GW, Crossman DC. Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease. *Circulation.* 1999. 99:861-866.
- ✓ Fuster V, Badimon L, Badimo JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 1992. 326:310-318.
- ✓ Fuster V, Fayad ZA, Badomin JJ. Acute coronary syndromes: biology *Lancet.* 1999. 353 Suppl 2:S115-119.

- ✓ García-Moll X y Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol*. 1999. 52:990-1003.
- ✓ Gromadzka G, Sarzynska-Dlugosz I, Czlonkowska A. *IL1RN* intron 2 polymorphism caused by variable number tandem repeats is associated with 1-year outcome in patients with ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007. 78:183-186.
- ✓ Guadalajara Boo, JF. *Cardiología*. Quinta edición. Méndez editores, S.A. de C.V. México. 1997. 671-762 pp.
- ✓ Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993. 11:1026-1030.
- ✓ Hansson G, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006. 1:297-329.
- ✓ Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991. 88:7276-7278.
- ✓ Huang G, Niu T, Peng S, Ling D, Liu J, Zhang X, Xu X. Association between the interleukin-1beta C(-511)T polymorphism and blood pressure in a Chinese hypertensive population. *Immunol Lett*. 2004. 91:159-62
- ✓ Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1 β genes. *Eur. J. Immunol*. 1998. 28:2598-2602.
- ✓ Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, Pezzini A, Assanelli D, Lorenzet R, Del Zotto E, Colombo M, Napoleone E, Amore C, D'Orazio A, Padovani A, de Gaetano G, Giannuzzi P, Donati MB. Polymorphisms of the Interleukin-1 β Gene Affect the Risk of Myocardial Infarction and Ischemic Stroke at Young Age and the Response of Mononuclear Cells to Stimulation in Vitro. *Artheroscler Thromb Vas Biol*. 2005. 25:222-227.
- ✓ Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. 1999. 100:793-798.

- ✓ Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Base de datos de estadística a propósito del día internacional de las personas de edad. Dirección General de Información en Salud. CONAPO. 1 de Octubre de 2004.
- ✓ Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Base de datos de defunciones INEGI/Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. CONAPO. Proyecciones de la Población de México, 2000 - 2050. México, 2003.
- ✓ Kellogg DE, Rybalkin I, Chen S, Mukhamedova N, Vlastic T, et al. TaqStart antibody: "hot start" PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques* 1994. 16:1134-1137.
- ✓ Lahiri DK y Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19:5444.
- ✓ Lai J, Zhou D, Xia S, Shang Y, Zhu J, Pan J, Hua B, Zhu Y, Cui L. Association of interleukin-1 gene cluster polymorphism with ischemic stroke in Chinese population. *Neurology India.* 2006. 54:366-369.
- ✓ Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Innumogenet.* 2004. 31:207-213.
- ✓ Lee BC, Anh SY, Doo HK, Yim SV, Lee HJ, Jin SY, Hong SJ, Lee SH, Kim SD, Seo JC, Leem KH, Chung JH. Susceptibility for ischemic stroke in Korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor- α genes, but not the interleukin-1 β gene. *Neuroscience Letters.* 2004. 357:33-36.
- ✓ Lewin B. *Genes VII.* Oxford University Press. Estados Unidos. 2000. 966 pp.
- ✓ Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001. 104:365-372.
- ✓ Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002. 420:868-874.

- ✓ Lin H, Ho A, Haley-Vicente D, Zhang J, Bernal-Fussell J, Pace A, Hansen D, Schweighofer K, Mize N, Ford J. Cloning and Characterization of IL-1HY2, a Novel Interleukin-1 Family Member. *J. Biol. Chem.* 2001. 276:20597-20602.
- ✓ Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briceño R, Granado J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centres. *Hum. Biol.* 1990. 62:791-801.
- ✓ Lopes N, Vasudevan S, Alvarez R, Binkley P, Goldschmidt P. Pathophysiology of plaque instability insights at genomic level. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2002. 44:323-338.
- ✓ Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends in Immunology.* 2001. 22:328-336.
- ✓ Momiyama Y, Ohmori R, Ohsuzu F. Association between IL-1 beta gene polymorphism and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 2005. 25:e36.
- ✓ Moretti T, Koons B, Budowle B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques.* 1998. 25:716-722.
- ✓ NCBI Map Viewer, disponible en el URL:
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=2&query=uid\(730173,12720912\)&QSTR=3552%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=2&query=uid(730173,12720912)&QSTR=3552%5Bgene%5Fid%5D&maps=gene_set&cmd=focus)
 Fecha de consulta: 21 de enero de 2008. Fecha de última actualización: 10 de enero de 2007.
- ✓ NCBI Map Viewer, disponible en el URL :
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=2&MAPS=ideogr,cn tgr,ugHs,genes\[113522345.17%3A113765296.41\]&QUERY=IL1A&ZOOM=1.0000](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?TAXID=9606&CHR=2&MAPS=ideogr,cn tgr,ugHs,genes[113522345.17%3A113765296.41]&QUERY=IL1A&ZOOM=1.0000)
 Fecha de consulta: 21 de enero de 2008. Fecha de última actualización: 10 de enero de 2007.
- ✓ Nicklin MJH, Hughes DE, Barton JL, Ure JM, Duff GW. Arterial inflammation in mice lacking the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Exp Med.* 2000. 191:303-312.
- ✓ Passarge E. *Genética. Texto y Atlas.* 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2004. 240-241 pp.

- ✓ Pavia López AA y Lara Esqueda A. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares. En: *Cardiología*. Ruesga Zamora EA, Jáuregui Aguilar R, Saturno Chiu G. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México. 2005. 1-7 pp.
- ✓ Price AL, Patterson N, Yu F, Cox DR, Waliszewska A, McDonald GJ, Tandon A, Schirmer C, Neubauer J, Bedoya G, Duque C, Villegas A, Bortolini MC, Salzano FM, Gallo C, Mazzotti G, Tello-Ruiz M, Riba L, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Menjivar M, Klitz W, Henderson B, Haiman CA, Winkler C, Tusie-Luna T, Ruiz-Linares A, Reich D. A genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet*. 2007. 80:1024-1036.
- ✓ Rahman P, Sun S, Peddle L, Snelgrove T, Melay W, Greenwood C, Gladman D. Association between the interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2006. 54:2321.
- ✓ Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem*. 1999. 274:11924-11929.
- ✓ Ridker PM, Givnn RI, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation*. 1998a. 97:2007-2011.
- ✓ Ridker PM, Hennekens CH, Rotiman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998b. 354:88-92.
- ✓ Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med*. 2000. 45:391-418.
- ✓ Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Engl J Med*. 1986. 314:488-500.
- ✓ Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999. 340:115-126.

- ✓ Santtila S, Savinainen K, Humer M. Presence of the IL-1RA Allele 2 (IL1RN*2) is Associated with Enhanced IL-1 β Production *in Vitro*. Scand. J. Immunol. 1998. 47:195-198.
- ✓ Sims J, Nicklin M, Bazan JF, Barton J, Busfield S, Ford J, Kastelein R, Kumar S, Lin H, Mulero J, Pan J, Pan Y, Smith D, Young P. A new nomenclature for IL-1 family genes. 2001. Trends in Immunology. 22:536-537.
- ✓ Smith DE, Renshaw BR, Ketchen RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. 2000. J Biol Chem. 275:1169-1175.
- ✓ Sudbery P. Genética Molecular Humana. 2ª Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. 2004. 67, 279-293 pp.
- ✓ Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell H, Bradbury L, Abbott A, Coyne M, Beynon O, Herzberg I, Duff G, Calin A, Cardon L, Wordsworth P, Brown M. The Interleukin 1 Gene Cluster Contains a Major Susceptibility Locus for Ankylosing Spondylitis. Am. J. Hum. Genet. 2004. 75:587-595.
- ✓ Tyagi S y Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol 1996. 14:303-308.
- ✓ van Minkelen R, de Visser MCH, Houwing-Duistermaat JJ, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. Haplotypes of *IL1B*, *IL1RN*, *IL1R1* and *IL1R2* and the Risk of Venous Thrombosis. Arterioscler Thromb Vas Biol. 2007. 27:1486-1491.
- ✓ Vélez-Castrillón S, Camargo JF, Correa PA, Anaya JM. Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. Revista Colombiana de Reumatología. 2004. 11:11-39.
- ✓ Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, Montali A, Donati MB, Arca M, Iacoviello L. Interleukin-1 genes cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. Haematologica. 2003. 88:54-60.
- ✓ Wilkinson RJ, Patel P, Llewelyn M, Hirsch CS, Pasvol G, Snounou G, Davidson RN, Toossi Z. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 β on tuberculosis. J Exp Med. 1999. 189:1863-1873.

- ✓ Willerson JT y Ridker PM. Inflammation as a Cardiovascular Risk Factor. *Circulation*. 2004. 109:2-10.
- ✓ Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism on Disease. *Clin Infect Dis*. 2002. 34:204-9.
- ✓ Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1955. 19:251-253.
- ✓ Worrall BB, Azhar S, Nyquist PA, Ackerman RH, Hamm TL, DeGraba TJ. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in carotid atherosclerosis. *Stroke*. 2003. 34:790-793.
- ✓ Worrall BB, Brott TG, Brown RD, Brown MW, Rich SS, Arepalli S, Wavrant-De Vrièze F, Duckworth J, Singleton AB, Hardy J, Meschia JF. *IL1RN VNTR* Polymorphism in Ischemic Stroke. Analysis in 3 Populations. *Stroke*. 2007. 38:1189-1196.

Glosario

ADN (ácido desoxirribonucleico): Molécula que contiene la información genética primaria en forma de una secuencia lineal de nucleótidos.

Alelo: Cada una de las formas alternativas de un gen en un locus génico determinado.

Alélica, frecuencia: Frecuencia de cierto alelo en un locus determinado en una población.

Antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra): Citocina anti-inflamatoria, es un inhibidor natural de la IL-1. Es sintetizada por fagocitos mononucleares y se une a los mismos receptores que la IL-1 pero carece de acción biológica, de forma que actúa como un inhibidor competitivo de ésta.

Arteria: Cualquiera de los vasos sanguíneos, de ramificaciones divergentes, que distribuyen por el organismo la sangre expelida de las cavidades ventriculares del corazón.

Arteriosclerosis: Término genérico que significa engrosamiento y endurecimiento de las arterias con pérdida de su elasticidad.

Aterosclerosis: De las raíces griegas *athere* (placa) y *sklerosis* (endurecimiento), de donde la "aterosclerosis" es un tipo de arteriosclerosis causada por el desarrollo de una placa fibrolipídica en la superficie interior de la arteria.

Citocinas: Proteínas sintetizadas por muchos tipos de células distintas que intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Las citocinas son los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmune.

Desequilibrio de ligamiento: Tendencia de los alelos de un locus a presentarse conjuntamente con los alelos de otro locus próximo más a menudo de lo que podría esperarse por azar.

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay): Método para cuantificar un antígeno inmovilizado sobre una superficie sólida, usando un anticuerpo específico unido de forma covalente a una enzima. La cantidad de anticuerpo que se une al antígeno es proporcional a la cantidad existente de éste y se determina midiendo con espectrofotometría la conversión de una sustancia clara en un producto coloreado por la acción de la enzima unida al anticuerpo.

Endotelio vascular: Epitelio fino escamoso separado de la elástica interna por un tejido conectivo laxo que contiene escasos fibroblastos, raras células musculares lisas y fibras finas de colágena. El endotelio proporciona al vaso una capa de revestimiento lisa y una barrera parcialmente selectiva de difusión entre la sangre y las capas más externas de la pared vascular.

Gen: Factor hereditario que constituye una unidad simple de material hereditario. Corresponde a un segmento de ADN que codifica la síntesis de una cadena polipeptídica.

Génica, frecuencia: Frecuencia de cierto genotipo en una población.

Haplotipo: Conjunto de alelos próximos que tienden a heredarse conjuntamente sin separarse por recombinación en la meiosis.

Infarto agudo del miocardio: Síndrome isquémico coronario agudo, caracterizado por una abrupta y súbita interrupción del flujo arterial coronario, generalmente relacionada con fenómenos trombóticos agudos asociados con lesiones coronarias causadas por placas arterioscleróticas.

Interleucina-1 (IL-1): Citocina pro-inflamatoria, producida principalmente por los fagocitos mononucleares activados cuya función principal consiste en intervenir en las respuestas inflamatorias del huésped en la inmunidad innata. Existen dos receptores de membrana diferentes para IL-1.

Marcador genético: Alelo utilizado para reconocer un genotipo determinado.

Polimorfismo: Existencia de dos o más formas alternativas de un gen particular que se encuentra en la población en una frecuencia significativa mayor del 1%.

Promotor: Región del ADN, definida en el extremo 5' de un gen, que se une a los factores de transcripción y a la ARN polimerasa durante la iniciación de la transcripción.

Trombo: Cualquier masa sólida que surge en el torrente sanguíneo proveniente de los componentes de la sangre.

RFLP's (restriction fragment length polymorphism): Producción de fragmentos de ADN de diferentes longitudes, tras el corte con una enzima de restricción determinada, debido a diferencias heredadas en un sitio de restricción.

VNTR (variable number tandem repeats): Polimorfismo debido en el número de copias de cualquier repetición en tándem.

Anexo I

Descripción de las técnicas del estudio bioquímico.

I.1. Técnica de ELISA

Cuantificación de la proteína IL-1 β mediante la técnica de ELISA

La extraordinaria especificidad de los anticuerpos por su antígeno correspondiente los convierte en reactivos útiles para detectar, purificar y cuantificar antígenos. Dado que es posible producir anticuerpos frente a casi cualquier tipo de macromoléculas y pequeñas sustancias químicas, las técnicas en que se utilizan anticuerpos permiten estudiar las moléculas presentes en soluciones o sobre células.

Los métodos inmunológicos usados para cuantificar la concentración de un antígeno poseen una sensibilidad y una especificidad extraordinarias y se han convertido en técnicas habituales tanto en aplicaciones clínicas como en investigación. La base de los métodos inmunoquímicos de cuantificación modernos consiste en disponer de un antígeno o un anticuerpo puro cuya cantidad pueda medirse mediante una molécula indicadora. Cuando la molécula indicadora se une de forma covalente a una enzima, es posible cuantificarla determinando la tasa con que la enzima convierte un sustrato

incolore en un producto coloreado con un espectrofotómetro; estos análisis se denominan análisis de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA). Existen distintas variaciones de ELISA pero la versión más utilizada es el análisis en sándwich (figura 25) En esta técnica se utilizan dos anticuerpos distintos que reaccionan con epítomos diferentes del antígeno (en este caso la IL-1 β) cuya concentración se quiere medir. Una cantidad fija de un anticuerpo (denominado anticuerpo de captura) se une a una serie de soportes sólidos iguales, en los pozos de una placa de microtitulación. Se añade a los pocillos una solución problema que contiene IL-1 β en una concentración desconocida y una serie de soluciones estándar de concentraciones conocida y se deja que se unan al anticuerpo de captura. El antígeno no unido se elimina mediante lavado y se añade el segundo anticuerpo, que está fijado a una enzima; normalmente peroxidasa de rábano o bien acetilcolina que es hidrolizada por la acetilcolinesterasa (Cayman chemical, 2004). El antígeno (IL-1 β) sirve de puente y así, cuanto mayor sea la cantidad de antígeno en la solución problema o las soluciones estándar, mayor será la cantidad del segundo anticuerpo marcado con la enzima que se une. El resultado de las soluciones estándar se utiliza para calcular una curva de unión para el segundo anticuerpo en función de la concentración del antígeno (IL-1 β), a partir de la cual puede deducirse la cantidad de antígeno presente en la solución problema (Abbas y Lichtman, 2004; Cayman chemical, 2004).

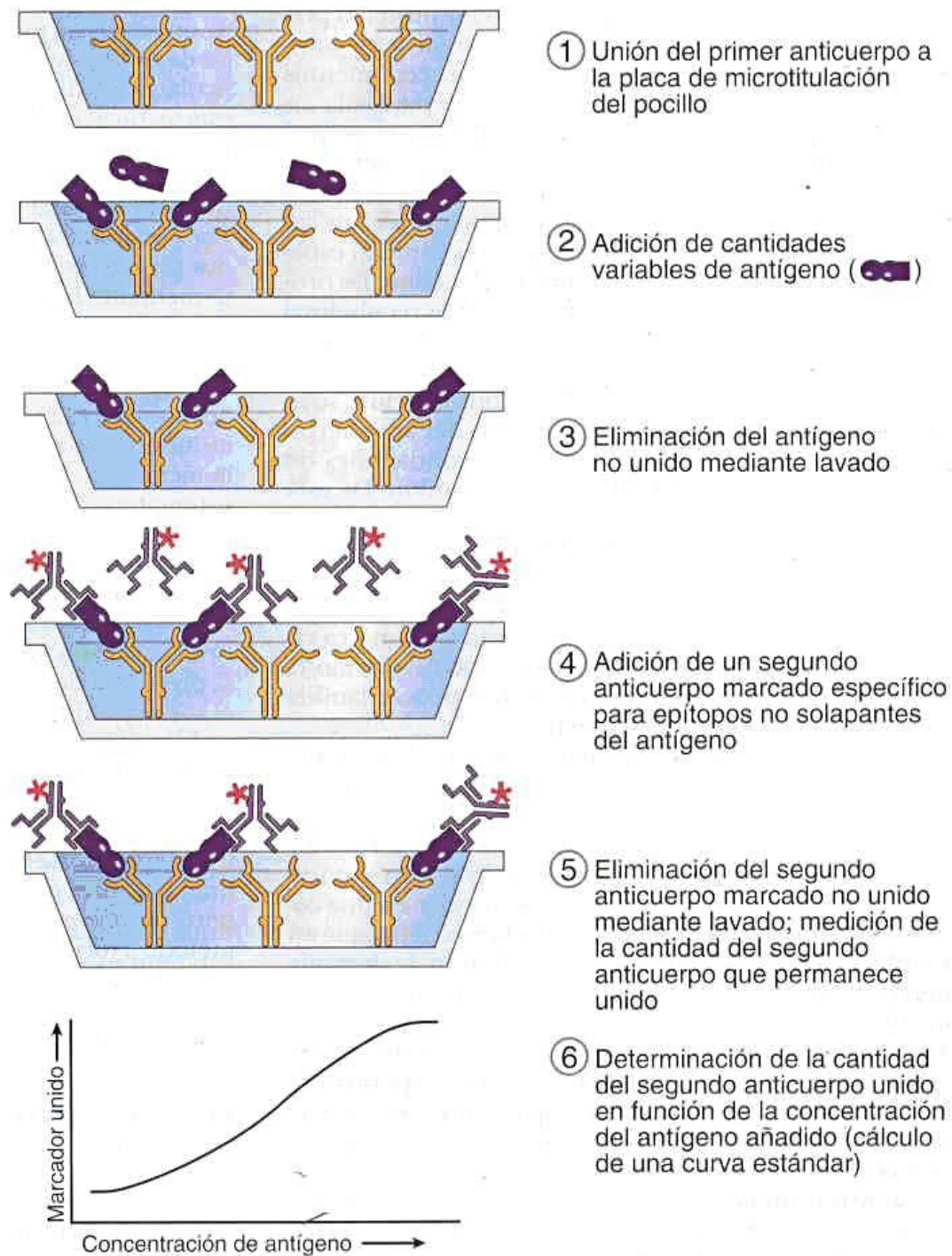


Figura 20. Esquematización de la técnica de ELISA (Tomado de Abbas y Lichtman, 2004).

Anexo II

Descripción de las técnicas del estudio molecular

II.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método que permite clonar fragmentos de ADN sin utilizar células, es rápido y sensible. Se han desarrollado reacciones estándares y una amplia variedad de métodos basados en la PCR para investigar polimorfismos y mutaciones. La PCR estándar es un procedimiento *in Vitro* para amplificar secuencias definidas de ADN blanco, aun partiendo de muy pocas cantidades de material o de material antiguo. La amplificación selectiva requiere alguna información previa acerca de las secuencias que flanquean el ADN blanco. Sobre la base de esta información se diseñan los oligonucleótidos cebadores o iniciadores, de alrededor de 15 a 25 pb de longitud. Los iniciadores son complementarios de las secuencias por fuera de los extremos 3' del sitio blanco y se unen a ellas en forma específica (Passarge, 2004).

La PCR es una reacción en cadena porque las cadenas de ADN nuevas sintetizadas actúan como molde para la posterior síntesis de ADN en los 35 a 35 ciclos subsecuentes. En teoría, cada ciclo dobla la cantidad de ADN amplificado. Al final, hay al menos 10^5 copias de la secuencia blanco específica. Ésta se puede visualizar como una banda distintiva de un tamaño específico luego de una electroforesis en gel. Cada ciclo, que involucra tres reacciones rigurosamente controladas en tiempo y temperatura

en los termocicladores automáticos. Los tres pasos en cada ciclo son 1) desnaturalización de ADN de cadena doble, a alrededor de 93°C-95°C para el ADN humano, 2) hibridación del iniciador a unos 50°C-70°C, dependiendo de la temperatura de fusión esperada del dúplex de ADN y 3) síntesis del ADN utilizando una polimerasa de ADN termorresistente (*Thermophilus aquaticus*, Taq polimerasa), típicamente a unos 70°C-75°C. En cada ciclo subsecuente el molde inicial y el ADN nuevo, sintetizado durante el ciclo anterior, actúan como molde para otra vuelta de síntesis (Passarge, 2004).

Los polimorfismos que constan de repeticiones en tándem de número variable (VNTR), pueden determinarse utilizando la técnica de PCR con los iniciadores específicos para el polimorfismo. Los fragmentos obtenidos de la PCR son visualizados mediante una electroforesis en geles de agarosa al 2% y el tamaño de los fragmentos se determina utilizando un MPM conocido.

II.2. Fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's)

Los RFLP's se basan en la presencia o ausencia de una secuencia que es reconocido por una enzima de restricción, generalmente debida a un polimorfismo en un solo nucleótido. El sitio polimórfico en dos cromosomas difiere entre sí por un único par de bases, lo que provoca la falta de un sitio de corte blanco de una enzima de restricción específica en uno de los cromosomas. Tras la digestión con dicha enzima, el cromosoma sin el sitio de corte produce un fragmento de mayor tamaño que el otro cromosoma. La diferencia se reconoce mediante una electroforesis posterior (Sudbery, 2004).

El primer paso para realizar la técnica de RFLP's es una PCR con los iniciadores específicos para cada polimorfismo, posteriormente el producto se verifica en un gel de agarosa al 1.5%. El siguiente paso es realizar la digestión del producto amplificado con una enzima específica para el sitio de corte blanco. Finalmente el producto de la digestión enzimática se visualiza mediante una electroforesis en geles de agarosa al 3% o de acrilamida al 9.2%. El genotipo de cada muestra se determina identificando las bandas con los pesos de corte específicos, con la ayuda de un marcador de peso molecular (MPM).

II.3. PCR en tiempo real

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN copiado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Higuchi *et al.*, 1993).

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de emisión de fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas, de manera específica.

Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados

inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad. Además la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de su secuencia de bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia blanco. (Moretti *et al.*, 1998; Kellogg *et al.*, 1994).

Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas *molecular beacons* y las sondas FRET.

1. *Sondas de hidrólisis.*

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. En la Tabla 14 se relacionan los fluorocromos más empleados y sus espectros de excitación y emisión. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector como se muestra en la figura 20 (Holland *et al.*, 1991).

Fluorocromo	Máx λ_{abs} (nm)	Máx λ_{em} (nm)
Cascade blue (varios)	374-403	422-430
YOYO-1	491	509
Bodipy	503	512
Fluoresceína (FITC)	494	520
SYBR Green I	497	520
TOTO-1	513	532
FAM	495	535
Luciferina	430	540
TET	522	550
JOE	525	555
HEX	530	560
Cy3	552	565
POPO-3	534	570
Rodamina	540	570
NED	553	575
TAMRA	560	580
Naranja de acridina	460,502	526,650
Cy5	643	667
Quantum Red/Red 670	480,565	670
Bromuro de etidio	526	605
ROX	580	605
Red 613	480,565	613
Rojo de Tejas	596	615
Homodímero de etidio	534	616
Yoduro de propidio	536	617
IRD 700	685	705
Cy7	743	767
IRD 800	795	849
VIC	528	546

Tabla 14. Principales moléculas fluorescentes empleadas como marcadores en la PCR-TR (Tomado de Hollando *et al.*, 1991).

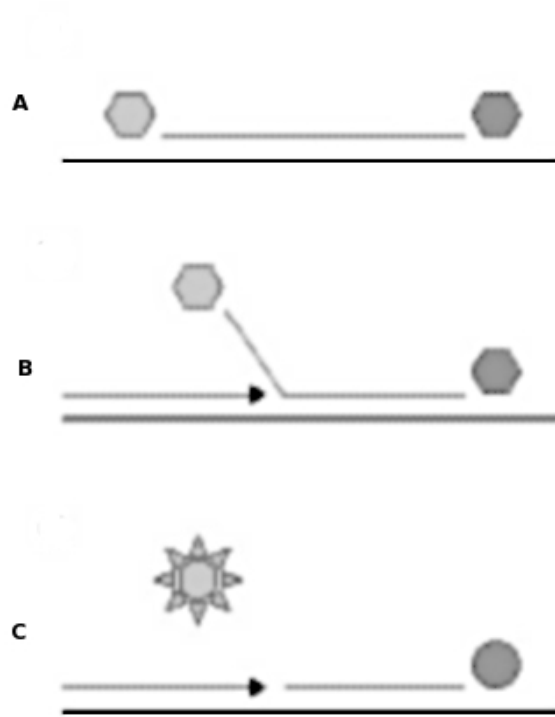


Figura 21. Mecanismo de las sondas de hidrólisis o sondas Taqman.

2. *Molecular beacons*

Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN blanco. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN blanco la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero como puede observarse en la figura 21 (Tyagi y Kramer, 1996).

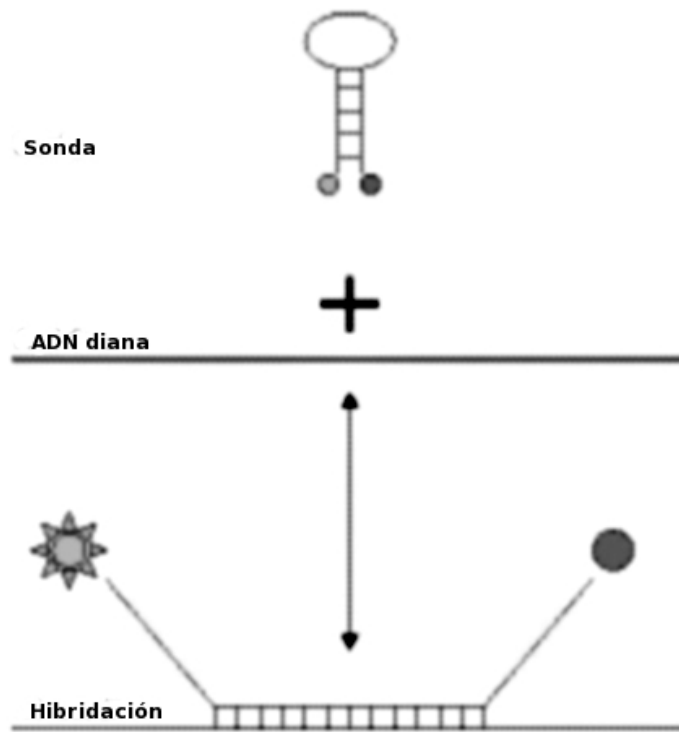


Figura 22. Mecanismo de los *molecular beacons*.

3. Sondas FRET

El sistema se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN blanco. Una de las sondas lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (figura 22).

En todos estos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma

proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

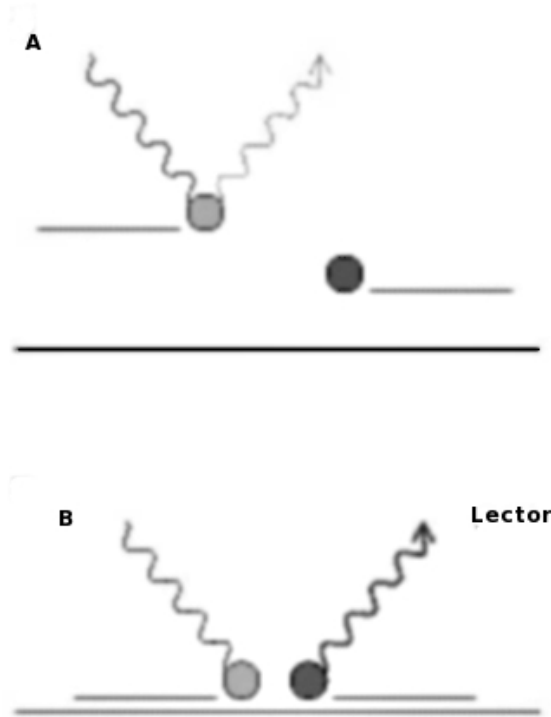


Figura 23. Sondas FRET.

II.4. Mapas genómicos

Un mapa genómico es una representación lineal de los sitios genómicos importantes (genes y marcadores). Se refiere tanto a un cromosoma (mapa citogenético) como a un tramo de ADN. Un mapa provee información acerca de la posición de un marcador genómico en particular y su relación con los otros.

Un mapa genético expresa las posiciones relativas de los genes entre sí sin un anclaje físico al cromosoma. La distancia entre los marcadores se determina por la frecuencia de recombinación durante la meiosis, que a su vez está determinada por la distancia relativa entre los loci. Un mapa físico provee información de la posición exacta de un gen o marcador, da la posición de un locus génico y su distancia hacia otros genes en el mismo cromosoma en valores absolutos; expresada en pares de bases y en relación con determinadas posiciones a lo largo del cromosoma. El mapa genético da la frecuencia de recombinación, expresada en unidades de recombinación o centimorgans (cM). Un centimorgan corresponde a una frecuencia de recombinación del 1%, es decir, la aparición de un gameto recombinante entre 100, mientras que los 99 restantes tendrán la configuración parental. Físicamente, 1 cM corresponde a una secuencia de ADN de entre 0.7 y 1 Mb, pero no hay una relación fija entre las distancias genéticas y físicas (Passarge, 2004; Sudbery, 2004).

Para que una meiosis sea informativa es preciso que se pueda medir la frecuencia de recombinación entre los marcadores, es decir, que sea posible distinguir entre los cromosomas parentales y los recombinantes. Esto precisa que ambos marcadores sean heterocigotos. La figura 23 ilustra esta situación. La fase determina la manera en que alelos particulares próximos en la localización de sus loci están en el mismo (*cis*), o en distinto cromosoma (*trans*). Un ejemplo de esto en la meiosis informativa representada en la figura 23, en la que los alelos A y 1 están en *cis*, mientras que los alelos A y 2 están en *trans*. Se aprecia claramente la necesidad de conocer la fase para distinguir tras la meiosis si los cromosomas son recombinantes o son parentales (Sudbery, 2004).

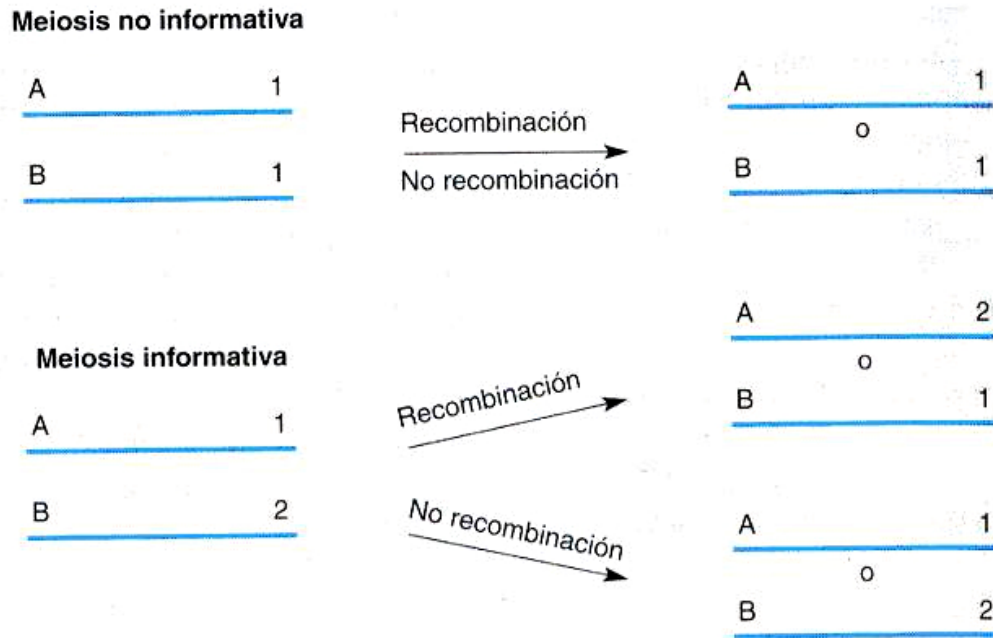


Figura 24. Meiosis informativa y no informativa. Izquierda: dos cromosomas homólogos en una célula diploide a punto de desarrollar una meiosis. Dos loci contiguos, cada uno con los alelos, se localizan en estos cromosomas. Derecha: se muestra la estructura de los gametos resultantes de la meiosis. Arriba: la meiosis no es informativa puesto que uno de los loci es homocigoto; después de la meiosis los gametos dispondrán de cromosomas idénticos a los que tenían antes de la meiosis. Abajo: la recombinación origina cromosomas que pueden distinguirse de los cromosomas no recombinantes; la meiosis es informativa (Tomado de Sudbery, 2004).

Un haplotipo consiste en un conjunto de alelos ligados y próximos que tienden a heredarse conjuntamente en la meiosis sin separarse por recombinación (haplotipo es la contracción de genotipo haploide). En el ejemplo anterior se muestran dos haplotipos parentales, A1 y B2. Los haplotipos pueden contener más de dos alelos. De modo general, los alelos que forman un haplotipo se heredarán conjuntamente como un

bloque puesto que dada su cercanía hace difícil que se separen por recombinación. (Sudbery, 2004).

Los primeros mapas del genoma humano se llevaron a cabo en los años 70 y se basaban en el ligamiento entre marcadores, los grupos sanguíneos y otros rasgos fenotípicos de carácter monogénico. El ligamiento entre estos marcadores era bastante escaso, de manera que la resolución de los mapas era bastante baja y amplias zonas del genoma quedan sin representación. La falta de marcadores útiles en relación al tamaño del genoma retrasó el progreso en la construcción de los mapas genéticos humanos. La salida de atolladero técnico en que se encontraba la construcción de mapas se produjo en 1980 gracias al descubrimiento de que muchas secuencias del genoma eran polimórficas a pesar de no tener efectos fenotípicos. A estos marcadores se les llamó polimorfismos moleculares neutros. El primero de estos marcadores utilizados se denominó mediante fragmentos de restricción polimorfica (RFLP's). Los RFLP's se basan en la presencia o ausencia de una secuencia para una enzima de restricción, generalmente debida a un polimorfismo en una sola base (figura 24).

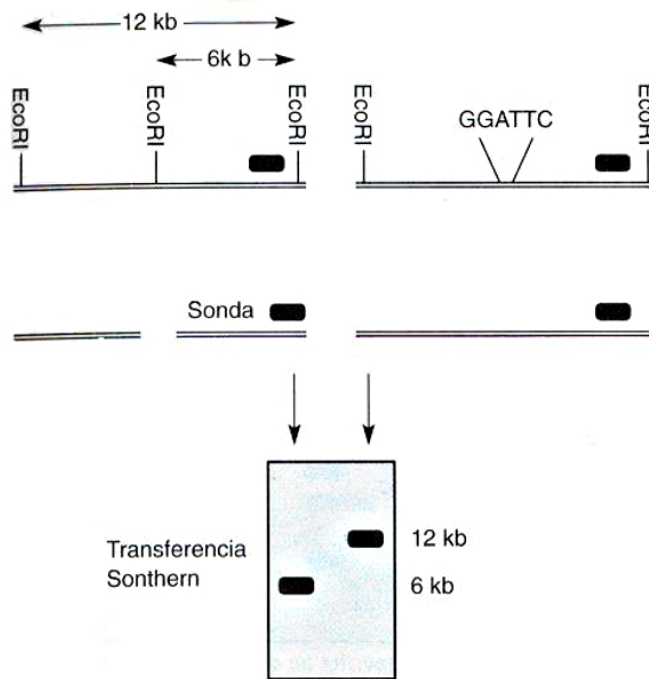


Figura 25. Marcador RFLP's. Partes de los ADN de dos cromosomas difieren entre sí por un único par de bases, lo que provoca la falta de un sitio de corte blanco de *EcoRI* en uno de los cromosomas. Tras la digestión con *EcoRI*, el cromosoma sin el sitio de corte produce un fragmento de mayor tamaño que el otro cromosoma. La diferencia se reconoce mediante la hibridación Southern utilizando una sonda (línea gruesa) que hibrida dentro de la región flanqueada por los dos sitios de corte *EcoRI* presentes en ambas moléculas (Tomado de Sudbery, 2004).

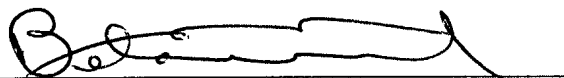
El problema de los RFLP's es que por definición sólo pueden existir dos alelos en cada locus, es decir, el sitio de restricción está presente o ausente. La máxima proporción de individuos heterocigotos en una población es sólo del 50%. Puesto que los marcadores genéticos sólo son informativos cuando son heterocigotos, a menudo un marcador RFLP's no proporciona información útil. En la práctica la situación es peor, puesto que normalmente uno de los alelos es raro y la frecuencia de los heterocigotos es menor del 50%. La proporción de meiosis que son informativas con respecto a un marcador se

denomina polimorfismo de contenido informativo (PIC). El máximo valor PIC para un marcador bialélico es 0.375 (menos que 0.5 puesto que algunas meiosis no son informativas a pesar de que los padres sean heterocigotos). Los minisatélites y los microsatélites descritos a continuación tienen valores mayores de PIC (Sudbery, 2004).

Un marcador más útil es el que es de naturaleza multialélica, de manera que tenga mayor probabilidad de que un individuo sea heterocigoto. Los loci de minisatélites, también conocidos como VNTR (número variable de repeticiones en tándem) cumplen estos criterios. Los minisatélites consisten en secuencias de entre 10 y 100 pb de longitud repetidas en tándem en un número variable, alcanzando una longitud de entre 0.5 y 50 kb. Aunque pueden estar presentes en cualquier parte de los cromosomas tienden a localizarse preferentemente en los telómeros. El número de repeticiones en el locus se determina mediante la técnica de la transferencia de Southern o mediante una reacción de PCR con oligonucleótidos específicos. En cambio, los microsatélites consisten en repeticiones en tándem de unidades de dos, tres o cuatro nucleótidos de longitud. Se les conoce también como repeticiones cortas en tándem (STR). Se encuentran en todas las partes del genoma, incluso dentro de las regiones codificantes de proteína. Como ocurre con los minisatélites, varía el número de repeticiones de cada microsatélite, cambiando su tamaño final. Por esta razón, los microsatélites son muy polimórficos y muy buenos marcadores genéticos. Los microsatélites se han usado más que los minisatélites debido a que su distribución es más uniforme a través del genoma. La longitud de los microsatélites se determina mediante PCR utilizando cebadores escogidos en las secuencias únicas vecinas. Esto los convierte en una forma especial de STS (sitio que se identifica por su secuencia mediante el uso de PCR) que permite alinear los mapas genéticos basados en microsatélites con distintos tipos de mapas físicos (Sudbery, 2004).

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "**Estudio de los polimorfismos de los genes de interleucina-1 (*IL1*) y del antagonista del receptor de interleucina-1 (*IL1RN*) en pacientes mexicanos con infarto agudo del miocardio**" con fecha 28 de mayo de 2008.

Jurado de Examen



Presidente

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



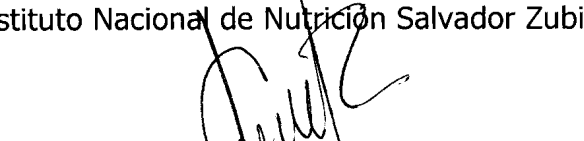
Secretario

Dr. Héctor Fernando Serrano
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal

Dr. Samuel Canizales Quinteros
Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica
Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán



Vocal

Dr. David Cruz Robles
Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez