

Curso 2009/10  
**CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/46**  
I.S.B.N.: 978-84-15287-00-1

**SIMA SAMIMI-FARD**

**Polimorfismo genético de los receptores  
de la melatonina y los mediadores inflamatorios  
de la aterotrombosis en pacientes  
con infarto agudo de miocardio en la isla de Tenerife**

**Directores**

**ARMANDO MORERA FUMERO  
ALBERTO DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ  
PEDRO ABREU GONZÁLEZ**



**SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS**  
**Serie Tesis Doctorales**

## **AGRADECIMIENTOS**

Una vez finalizada mi Tesis, ha llegado el momento de expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que, directa- e indirectamente, han hecho posible la realización de este trabajo “en equipo”. Sinceramente, aún no me he hecho la idea de que, después de tanto esfuerzo y sacrificio, ya haya llegado el momento de redactar la última parte de “mi libro” antes de llevarlo a encuadernar.

Soy consciente de la gran suerte que he tenido al contar con unos directores sencillamente excepcionales: en primer lugar, agradecer al **Dr Armando Morera Fumero** el haber aceptado la dirección de esta Tesis, junto con los **Dres Alberto Domínguez Rodríguez y Pedro Abreu González**. Cada uno de ellos ha aportado más que “su granito de arena” a la hora de supervisarme y ayudarme en la elaboración de este trabajo. De forma especial, y por la amistad que nos une, quiero expresar mi más sincero agradecimiento al **Dr Alberto Domínguez Rodríguez**, que no sólo se ha preocupado por transmitirme tantos y tantos conocimientos desde mi época de residente de Cardiología, sino que además siempre me ha impulsado a superarme a mí misma. Nunca olvidaré de la frase que me dijo antes de empezar a escribir la Tesis: “Con esto vas a sudar sangre y lágrimas”. Tenía toda la razón, no ha sido un camino de rosas ni mucho menos, pero me ha hecho crecer tanto personal- como profesionalmente. Gracias Alberto por estar siempre ahí y por creer en mí.

Gracias también al **Dr Pedro Abreu González**, a quien empecé a conocer realmente durante estos últimos meses, y de quien admiro no sólo su gran conocimiento, sino más aún sus múltiples virtudes, entre las que destacaría su lealtad, humildad y dedicación desinteresada. Gracias Pedro por ser tan comprensivo y, más que un director, un verdadero amigo.

Este trabajo tampoco hubiera sido posible sin la ayuda de otras dos personas: los **Dres Juan José Sánchez Sánchez y Alejandro Jiménez Sosa**. A Juan le agradezco que, a pesar de su escasísimo tiempo libre, se haya comprometido a realizar el análisis genético de las muestras, trabajo que para mi sola hubiese sido del todo imposible. Asimismo, agradecerle al psicólogo Alejandro Jiménez el habernos asesorado en el análisis estadístico de los datos.

También quisiera expresar un especial agradecimiento a todo el **personal médico y de enfermería del Servicio de Cardiología**, que sobresale por su gran profesionalidad y humanidad, y con quienes es una auténtica suerte poder trabajar día tras día. Gracias por su desinteresada ayuda a la hora de recoger las muestras de los sujetos del estudio.

Por último, y a nivel personal, quisiera hacer una mención especial al **Dr Angel Concepción Clemente**, quien, más que un excelente profesional, representa para mí una grandísima persona. Me conoce desde que tenía unos 10 años, y gracias al entusiasmo que transmite a todo a quien le rodea, despertó en mí la curiosidad por el mundo de la Cardiología. De hecho fue él quien me convenció a preparar el MIR en unos pocos meses, con el objetivo de elegir la especialidad de Cardiología como primera y única opción, ya fuera aquí o en otro lugar de la Península. Por ello, cuando finalicé mi etapa de residencia en el año 2008, me parecía haber logrado un sueño. Un sueño que en gran parte se lo debo a Angel, que siempre me ha aconsejado en momentos decisivos de mi vida, y que para mí representa a ese padre que nunca tuve. Gracias Angel por “apadrinarme” y quererme tanto, sabes que yo te admiro muchísimo.

A **Manuel**, darle las gracias por ser de las pocas personas que siempre logra hacerme reír, incluso en los peores momentos que he pasado escribiendo esta Tesis. Desde un principio me ha apoyado y animado a alcanzar este objetivo, sin dudar ni un momento

de mi capacidad para conseguirlo. Aparte de ser un gran amigo y compañero, es la persona con la que comparto gran parte de mi vida desde hace 4 años y que admiro y quiero de corazón. Gracias por creer en mí y motivarme tanto.

Aunque lo haya dejado para el final, no significa que tenga menos importancia para mí. Al contrario, mi último y más profundo agradecimiento va dirigido a mi familia, en especial a **mi madre Annemarie**, que durante tantísimos años ha luchado sola por poder brindarnos a mi hermana y a mí una buena educación y, más aún, por enseñarnos cuáles son los verdaderos valores de la vida. Gracias a su constante apoyo, comprensión y sacrificio, he sido capaz de sobreponerme a los contratiempos del día a día y escribir esta Tesis, que le dedico con muchísimo cariño, esperando poder compensarla de alguna forma por todo lo que ha hecho por mí.

También a **mi hermana Shirin**, que a pesar de la distancia que nos separa, siempre se ha preocupado por estar a mi lado. Desde pequeña ha sido para mí un ejemplo a seguir, admirando en ella no sólo su carácter abierto y gentil, sino también su enorme capacidad de trabajo y perfeccionismo. Shirin, al igual que a mami, te dedico esta Tesis con muchísimo cariño, esperando que sirva para que siempre tengas presente cuánto te quiero y admiro.

Diciembre de 2009

## **ABREVIATURAS**

**AA-NAT:** arilalquilamina-N-acetiltransferasa

**Apo-B:** apolipoproteína B

**ARA II:** antagonista de los receptores de la angiotensina II

**CD40L:** CD40 ligando

**CI:** cardiopatía isquémica

**DM2:** diabetes mellitus tipo 2

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EAC:** enfermedad arterial coronaria

**GPx:** glutatión peroxidasa

**GSC:** ganglio cervical superior

**HbA1C:** hemoglobina A1c

**HDL:** lipoproteína de alta densidad

**HIOMT:** hidroxindol-O-metiltransferasa

**HTA:** hipertensión arterial

**IAM:** infarto agudo de miocardio

**ICAM-1:** molécula de adhesión intercelular 1

**IECA:** inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina

**IL-1:** interleucina 1

**IL-1 $\beta$ :** interleucina 1 $\beta$

**IL-6:** interleucina 6

**IL-8:** interleucina 8

**IMC:** índice de masa corporal

**INF- $\gamma$ :** interferón gamma

**LDL:** lipoproteína de baja densidad

**MCP-1:** proteína quimiotáctica 1 del monocito

**M-CSF:** factor estimulante de las colonias de monocitos

**Mel 1a (MT1):** receptor de la melatonina 1a

**Mel 1b (MT2):** receptor de la melatonina 1b

**Mel 1c (MT3):** receptor de la melatonina 1c

**MMP:** matriz metaloproteínasa

**MPO:** mieloperoxidasa

**MTHFD1L:** metilentetrahidrofolato-deshidrogenasa 1-like

**NSQ:** núcleo supraquiasmático

**PCR:** proteína C reactiva

***PCR ó polymerase chain reaction:*** reacción en cadena de la polimerasa

**PON-1:** paraoxonasa 1

**SCA:** síndrome coronario agudo

**sCD40L:** soluble CD40 ligando

**SICACEST:** síndrome isquémico coronario agudo con elevación del segmento ST

**SICASEST:** síndrome isquémico coronario agudo sin elevación del segmento ST

***SNP ó single nucleotide polymorphism:*** polimorfismo de un único nucleótido

**SOD:** superóxido dismutasa

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TIMPs:** inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TPH:** triptófano-hidroxilasa

**TRH:** tracto retinohipotalámico

**VNTR:** número variable de *tandem repeats*

## **INDICE**

## **ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1) <u>La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)</u>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Prevalencia de la EAC en la Isla de Tenerife.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Fenómenos inflamatorios y su relación con la aterotrombosis coronaria.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Aspectos genéticos de la EAC.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Polimorfismos genéticos relacionados con la aterotrombosis coronaria y los fenómenos inflamatorios.....</b>	<b>8</b>
<b>2) <u>La hormona circadiana melatonina</u>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Aspectos generales de su fisiología.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. La melatonina y su relación con la EAC.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3. Melatonina y polimorfismos genéticos relacionados con la EAC.....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
<b>1) <u>Descripción de la muestra del estudio</u>.....</b>	<b>32</b>
<b>1.1. Tipo de diseño.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2. Población de estudio.....</b>	<b>32</b>



1.3.		
	Casos.....	32
1.4.		
	Controles.....	32
1.5.	Criterios de inclusión de los sujetos del estudio.....	33
1.6.	Criterios para los casos.....	33
1.7.	Criterios para los controles.....	34
1.8.	Criterios de exclusión de los sujetos del estudio.....	34
2)	<u>Protocolo experimental de obtención de muestras</u> .....	35
2.1.	Metodología de trabajo.....	35
3)	<u>Métodos de laboratorio</u> .....	36
3.1.	Determinación de bioquímica sanguínea.....	36
3.2.	Extracción de DNA.....	36
3.2.1.	Protocolo para la purificación/concentración de DNA en suero sanguíneo.....	36
3.2.2.	Protocolo para la cuantificación de DNA en suero.....	38
4)	<u>Análisis estadístico</u> .....	39
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>41</b>
1)	<u>Descripción y comparaciones clínicas basales de la muestra</u> .....	41
1.1.	Características clínicas cardiológicas de los casos.....	43
1.2.	Anatomía coronaria de los casos.....	45
1.3.	Complicaciones cardiovasculares durante el ingreso en los casos.....	46
1.4.	Tratamiento farmacológico en los casos.....	47

1.5. Resultados de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los SNPs.....	48
1.6. Distribuciones de frecuencias de los genotipos en los grupos de estudio.....	49
2) <u>Análisis multivariado</u> .....	51
2.1. Comparación de proporciones de los SNPs entre los casos para cada factor de riesgo cardiovascular.....	51
2.2. Distribuciones de frecuencias para casos y controles de la combinación sinérgica de los genotipos desfavorables de los SNPs del receptor de la melatonina con los mediadores inflamatorios.....	57
DISCUSIÓN.....	62
LIMITACIONES.....	77
CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	116

## **INTRODUCCIÓN**

## **1) La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)**

### **1.1. Prevalencia de la EAC en la isla de Tenerife**

La enfermedad arterial coronaria (EAC) y su principal complicación, el infarto agudo de miocardio (IAM), constituyen la primera causa de morbimortalidad cardiovascular a nivel mundial (Lopez et al, 2006) y consumen una gran cantidad de recursos económicos. Este hecho estimuló la puesta en marcha de los primeros grandes estudios epidemiológicos que demostraron una variabilidad geográfica significativa en la incidencia y mortalidad por CI, con unas tasas hasta cinco veces mayores en el norte de Europa que en España (Martínez de Aragón y Llacer, 2000; Marrugat et al, 2002). De hecho, nuestro país cuenta con una de las tasas más bajas entre los países desarrollados (Tunstall-Pedoe et al, 1994), sólo superior a la de Francia. No obstante, la CI genera una demanda asistencial creciente en España, tal y como refleja una revisión sistemática de cuatro estudios poblacionales de incidencia de CI (Cerrato et al, 2006). Según estos trabajos, las tasas de incidencia de IAM en España oscilan entre 135 y 210 nuevos casos anuales por cada 100.000 hombres y entre 29 y 61 casos por cada 100.000 mujeres para la población de 25 a 74 años (Pérez et al, 1998; Marrugat et al, 2002; Marrugat et al, 2004; Sans et al, 2005). Marrugat *et al*, en base a estas cifras, estimó la incidencia de IAM para el total nacional en 68.500 nuevos casos en el año 2002 (Marrugat et al, 2002). A su vez, en España existe una gran variabilidad geográfica en la incidencia de CI, siendo las zonas con mayor mortalidad la costa mediterránea, el sur de la península y las islas Canarias. El centro de la península, a excepción de Madrid, es la zona menos afectada (Benach et al, 2001). Los factores que determinan esta variabilidad dentro de un mismo estado son difíciles de determinar, si bien podría explicarse por factores

socioeconómicos, la prevalencia de diabetes mellitus y los diferentes estilos de vida (dieta, actividad física y consumo de tabaco) (Marrugat et al, 2002).

Las Islas Canarias se han situado en las últimas décadas en uno de los primeros lugares entre las comunidades españolas en cuanto a mortalidad por CI. Por provincias, las Palmas tiene la mayor tasa de mortalidad coronaria del país, y Santa Cruz de Tenerife ocupa el quinto puesto en esa misma clasificación (Instituto Nacional de Estadística). En un estudio reciente que ha elaborado tablas de riesgo coronario específicas para la población del archipiélago y posteriormente ha comparado la población canaria con la de Gerona, se ha objetivado una mayor prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares tales como obesidad, tabaquismo, hipertensión arterial y diabetes en la población canaria que en la gerundense, lo cual genera un elevado riesgo coronario y explica su posición en las estadísticas de mortalidad por CI (Cabrera de León et al, 2006).

## **1.2. Fenómenos inflamatorios y su relación con la aterotrombosis coronaria**

En las últimas dos décadas, uno de los aspectos que ha suscitado mayor interés en el campo de la investigación cardiovascular es la relación existente entre aterosclerosis e inflamación. Hoy en día se sabe que la inflamación desempeña un papel clave en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, hasta el punto de que, actualmente, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria en la que interviene tanto su componente celular como humoral (Ross, 1993; Ross, 1999; Libby, 2002; Libby et al, 2002).

La inflamación en la aterosclerosis se produce en respuesta a una gran variedad de estímulos aterogénicos que provocan daño vascular y migración de células inflamatorias desde la luz vascular hacia la pared arterial, todo ello bajo la influencia de citoquinas quimiotácticas producidas localmente (Smith et al, 1995; Qiao et al,

1997; Boring et al, 1998; Gu et al, 1998; Pérez-Fernández , Kaski, 2002;). Mientras que el endotelio normal presenta propiedades antiadhesivas y anticoagulantes (De Caterina et al, 1995; Topper, Gimbrone, 1999), el endotelio activado por las citoquinas proinflamatorias expresa una serie de moléculas de adhesión leucocitarias (como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la E-selectina) y secreta sustancias quimiotácticas solubles (como la proteína quimiotáctica 1 del monocito (MCP-1), el factor estimulante de las colonias de monocitos (M-CSF) y la interleukina 8 (IL-8)), que favorecen la adhesión y posterior migración de monocitos y linfocitos T hacia la pared arterial (Li et al, 1993; Nagel et al, 1994; Cybulsky et al, 2001).

Una vez allí, los monocitos se transforman en macrófagos tisulares y células espumosas secretoras de una gran cantidad de moléculas (especies reactivas del oxígeno, citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas (MMP), etc.) que amplifican el proceso inflamatorio local (Bevilacqua, Gimbrone, 1987; Wilcoxon et al, 1989; Leatham et al, 1995; Martínez-González et al, 2001). Las MMP en concreto favorecen la degradación de la matriz extracelular y con ello la aparición de fisuras en la placa, promoviendo así su rotura (Galis et al, 1994; Rajavashisth et al, 1999; Sukhova et al, 1999; Herman et al, 2001) y la aparición de complicaciones trombóticas (Wilcoxon et al, 1989; Leatham et al, 1995; Libby, Simon, 2001; Martínez-González et al, 2001;).

Por otro lado, los linfocitos T que se encuentran dentro del ateroma suelen convertirse en células secretoras de citoquinas proinflamatorias (interleucina 1 [IL-1], factor de necrosis tumoral [TNF], interferón gamma [IFN- $\gamma$ ]), conocidas como células TH1. El IFN- $\gamma$  producido por ellas es una citoquina pleiotrópica implicada en la activación monocito/macrófago.

Por lo tanto, la aterosclerosis es el resultado de una respuesta exagerada de tipo inflamatorio-fibroproliferativa (Ross, 1993; Ross, 1999), que no sólo desencadena el proceso aterosclerótico, sino que además contribuye al crecimiento de la placa de ateroma y al desarrollo de complicaciones, como son los fenómenos trombóticos agudos (Ross, 1993; Ross, 1999; Libby, Simon, 2001; Libby, 2002; Libby et al, 2002).

A pesar de tratarse de un proceso crónico, presenta un componente inflamatorio activo importante, cuya evolución es variable de un individuo a otro, probablemente debido a diferencias idiosincrásicas en la respuesta a los estímulos aterogénicos. En este sentido, se sabe que individuos con una respuesta inflamatoria mayor a los estímulos aterogénicos, tienen un riesgo más elevado de desarrollar manifestaciones clínicas de aterosclerosis (Fichtlscherer et al, 2004). De hecho, diversos estudios clínicos han confirmado la asociación de los síndromes coronarios agudos a una reactivación inflamatoria detectable a través de la determinación de diversos marcadores inflamatorios sistémicos, como la proteína C reactiva (PCR) (Liuzzo et al, 1994; Cianflone et al, 1995; Biasucci et al, 1999; Liuzzo et al, 1999). Así por ejemplo, Berk *et al.* demostraron que los pacientes con angina inestable presentaban unas concentraciones de PCR más elevadas que aquellos con angina estable (Berk et al, 1990). Además, Liuzzo *et al.* encontraron un aumento precoz (en las primeras 6 horas desde el inicio de los síntomas) de las concentraciones séricas de PCR en pacientes ingresados con IAM (Liuzzo et al, 1994), a pesar de que normalmente éstas empiezan a aumentar unas 6 horas después de la estimulación hepática por la IL-6 (Pepys, Baltz, 1983).

Este hallazgo indica que la activación súbita de las células inflamatorias podría ser, más que un epifenómeno, un componente patogénico clave de los síndromes

coronarios agudos. Esta hipótesis se basa en diversos estudios que no han encontrado correlación entre los niveles de marcadores inflamatorios/reactantes de fase aguda y la severidad de la aterosclerosis, ni tampoco con la activación episódica del sistema hemostático, el daño por isquemia-reperfusión o la rotura de la placa (Monaco et al, 1994; Biasucci et al, 1996; Liuzzo et al, 1996; Liuzzo et al, 1998). Por lo tanto, el aumento de los niveles circulantes de marcadores inflamatorios observado en los pacientes coronarios de alto riesgo sería más bien secundario al proceso aterosclerótico, y no su desencadenante.

Otro aspecto relacionado es el hecho de que concentraciones elevadas de marcadores inflamatorios circulantes se asocian a un peor pronóstico en pacientes con síndrome coronario agudo (Liuzzo et al, 1994; Toss et al, 1997; Ridker et al, 1998; Biasucci et al, 1999; Ferreiros et al, 1999).

Por último, hay que señalar que la inflamación en los síndromes coronarios agudos es un fenómeno generalizado que tiene la capacidad de desestabilizar placas de ateroma a lo largo de todo el árbol coronario. De hecho, estudios realizados *post mortem* han demostrado que en los síndromes coronarios agudos se producen trombosis coronarias múltiples, incluso en regiones remotas (Davies, Thomas, 1984). Recientemente, Spagnoli et al. objetivaron, en pacientes con IAM, una activación difusa de células inflamatorias que no se limita solo a las arterias relacionadas con el infarto (Spagnoli et al, 2002). Asimismo, Buffon et al. han descrito, en pacientes con angina inestable, una activación generalizada de neutrófilos en todo el árbol vascular, independientemente de la localización de la estenosis responsable (Buffon et al, 2002). Estas observaciones cuestionan claramente el concepto de placa inestable/vulnerable única, siendo más probable la existencia de múltiples placas inestables como expresión de un estado inflamatorio generalizado. No obstante, hasta



la fecha se desconocen los desencadenantes de la generalización de la respuesta inflamatoria en los síndromes coronarios agudos, si bien parece estar relacionada con la respuesta inmunológica ante un determinado estímulo antigénico (Shah 2000; Chyu, Shah, 2001; Shah 2003; Abbate et al, 2004; Zal et al, 2004; Calabrò et al, 2009).

### **1.3. Aspectos genéticos de la EAC**

La EAC constituye un claro ejemplo de enfermedad multifactorial en cuyo desarrollo intervienen múltiples factores genéticos y medioambientales (Sabatine et al, 2006). De hecho, los factores de riesgo clásicos sólo justifican el 30-50% de los casos (Lusis et al, 1998), mientras que el componente hereditario, demostrado en numerosos estudios (Slack, Evans, 1966; Marenberg et al, 1994; Rojas et al, 2001), juega un papel aún desconocido. Por este motivo, en los últimos años se han tratado de identificar los genes responsables del aumento del riesgo cardiovascular, proceso que se ha acelerado en la última década gracias a los avances de la biotecnología, que permite la detección de cambios en la secuencia de ADN potencialmente patógenos (Rojas et al, 2001).

Desde un punto de vista molecular, estos cambios pueden producirse por la sustitución de un simple nucleótido (dando lugar a los SNP o *single nucleotide polymorphisms*), por la inserción/delección de un segmento, ó por la repetición de unas secuencias en tándem (VNTR, número variable de *tandem repeats*). A su vez, pueden afectar al exón, intrón o al promotor del gen, y dependiendo de la repercusión funcional que tengan, se distinguen mutaciones de polimorfismos (Navarro-López, 2002).

Las mutaciones se deben a cambios que alteran gravemente la función de la proteína resultante, siendo suficiente la afectación de un solo gen para provocar la

enfermedad. Se trata de enfermedades poco frecuentes (prevalencia < 1% de la población) que se heredan siguiendo las leyes mendelianas (dominante o recesiva) y en las que los factores medioambientales tienen escasa influencia. Algunos ejemplos de enfermedades monogénicas o mendelianas cardiovasculares son la hipercolesterolemia familiar, la miocardiopatía hipertrófica, el síndrome de Marfan y el síndrome del QT largo congénito (Navarro-López, 2002; Sabatine et al, 2006).

Los polimorfismos por el contrario son frecuentes (ocurren en > 1% de la población) y afectan a varios genes, pero su repercusión funcional es mínima y por lo tanto insuficiente para provocar la enfermedad. No obstante, pueden suponer un factor de riesgo genético bajo la influencia de determinados factores de riesgo ambientales, como colesterol, estrés o tabaco (Navarro-López, 2002). De hecho, a pesar de que la mayoría de los polimorfismos no tiene repercusión funcional alguna, se cree que la suma de varios polimorfismos desfavorables y un entorno ambiental propicio podría facilitar la aparición de enfermedades poligénicas y multifactoriales, siendo su ejemplo más clásico la aterosclerosis, y en concreto, la EAC (Navarro-López, 2002).

En los últimos años se han descrito numerosos polimorfismos que podrían estar implicados en la patogenia de la EAC (Cambien, Tiret, 1997; Lusis et al, 1998; Lusis, 2000). Sin embargo, mientras que algunos estudios revelan una asociación significativa de determinados polimorfismos con la EAC, otros no encuentran tal asociación, de tal forma que en la mayoría de los casos esta relación es discutible (Risch, Merikangas, 1996). Esta discrepancia en la reproducción de los resultados puede tener varias explicaciones: 1) tamaño muestral reducido; 2) heterogeneidad genética, el mismo fenotipo causado por polimorfismos en diferentes genes; 3) heterogeneidad fenotípica, variabilidad en las manifestaciones clínicas de

enfermedades genéticas; 4) heterogeneidad étnica de la población de estudio, cualquier polimorfismo que sea más frecuente en un determinado grupo étnico, se asociará a la enfermedad, aunque no esté causalmente relacionado con ella; 5) selección inadecuada de casos y controles; 6) análisis insuficiente de la influencia de factores medioambientales; y por último 7) diferencias en el diseño del estudio (Sabatine et al, 2006).

No obstante, puesto que la relación de determinados polimorfismos genéticos con la EAC parece suficientemente contrastada, cabe pensar que si se realizan estudios mejor estandarizados y diseñados, los resultados obtenidos serán más concluyentes (Risch, Merikangas, 1996). En este sentido, las características de un buen estudio de asociación genética se podrían resumir en: genotipado exhaustivo y exacto, evaluación de un gran número de pacientes cuidadosamente seleccionados y reproducibilidad de las asociaciones significativas (Sabatine et al, 2006).

#### **1.4. Polimorfismos genéticos relacionados con la aterotrombosis coronaria y los fenómenos inflamatorios**

Como ya se ha comentado con anterioridad, toda la patología aterosclerosa presenta un componente hereditario importante. De ahí que numerosos estudios de asociación genómica hayan analizado la relación de determinados polimorfismos “de riesgo” con la EAC y sus complicaciones. Además, gracias al avance técnico acontecido en los últimos años en el ámbito de la biología molecular, actualmente se pueden analizar hasta un millón de polimorfismos en un solo experimento (Rojas et al, 2001; Kaski 2009).

Desde un punto de vista metodológico, los estudios de asociación identifican polimorfismos de riesgo en un grupo de casos y controles, con el fin de demostrar su asociación estadística con la enfermedad. De esta forma, si un determinado

polimorfismo realmente se relaciona con la enfermedad, será más frecuente en los casos que en los controles (Sabatine et al, 2006). No obstante, la mejor forma de confirmar las asociaciones encontradas y de descartar falsos positivos, es mediante los estudios de replicación: en ellos, se trata de validar o reproducir los hallazgos en una cohorte independiente del estudio inicial (Ioannidis et al, 2001). Sin embargo, a pesar de la exploración exhaustiva de numerosos loci genéticos, no se ha confirmado aún la asociación definitiva de ninguno de ellos con la EAC o el IAM, por lo que se cree que el riesgo coronario de un individuo depende del número de polimorfismos desfavorables que acumula (Navarro-López, 2002).

Entre todos los loci analizados, destaca el 9p21.3, por ser el locus cromosómico más frecuentemente relacionado con la EAC en diversos estudios de asociación genómica (Helgadottir et al, 2007; McPherson et al, 2007; Samani et al, 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Además, un reciente metaanálisis realizado en siete poblaciones europeas que incluyó un total de 12004 casos y 28949 controles, confirma la asociación entre un polimorfismo del locus 9p21.3 con la EAC y el IAM (Schunkert et al, 2008). Por lo tanto, se puede concluir que los polimorfismos del cromosoma 9p21.3 presentan una asociación significativa y reproducible con la EAC, tal y como ha quedado demostrado en los diferentes estudios de replicación (Samani et al, 2007; van der Net et al, 2008).

En dicho locus se encuentran, próximos a los polimorfismos relacionados con la EAC, los genes de dos inhibidores de quinasa ciclina-dependientes, CDKN2A y 2B, implicados en la regulación del ciclo celular y probablemente, a través de la inhibición del crecimiento inducido por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), en la patogenia de la aterosclerosis (Hannon, Beach, 1994; Lowe, Sherr, 2003; Kalinina et al, 2004). Recientemente, el mismo locus también se ha

relacionado con una mayor susceptibilidad de desarrollar diabetes tipo 2 (Saxena et al, 2007; Scott et al, 2007; Zeggini et al, 2007), lo cual hace sospechar de la existencia de un mecanismo causal compartido de la EAC y de la diabetes mellitus.

Otros loci que también han mostrado una asociación significativa con la EAC son el 6q25.1, 1p13.3, 1q41 y 10q11.21 (Samani et al, 2007). El locus 6q25.1 contiene el gen MTHFD1L (metilentetrahidrofolato-deshidrogenasa 1-like), que a su vez codifica la isoenzima mitocondrial C1-tetrahidrofolato sintasa (Prasannan et al, 2003; Walkup, Appling, 2005). Esta familia enzimática interviene fundamentalmente en la síntesis de purina y metionina (Prasannan et al, 2003), por lo que podría establecerse un vínculo entre variantes del gen MTHFD1L y los niveles plasmáticos de homocisteína (Randak et al, 2000; Prasannan et al, 2003). Los otros loci mencionados (1p13.3, 1q41 y 10q11.21) incluyen todos ellos genes implicados en el crecimiento ó la inhibición celular, lo cual apunta a la importancia de la regulación del ciclo celular en la patogenia de la aterosclerosis (Samani et al, 2007).

Del mismo modo, existen genes inflamatorios que podrían modular el riesgo aterosclerótico en humanos. Entre ellos tenemos el gen de la interleucina 6 y el de proteína C reactiva:

- Gen de la interleucina 6 (IL-6)

Las interleuquinas son un amplio grupo de citoquinas con múltiples funciones inmunes e inflamatorias.

La IL-6 es una citoquina con efectos tanto pro- como antiinflamatorios a nivel local y sistémico, que provocan el crecimiento y/o la inestabilización de la placa aterosclerótica (Woods et al, 2000; Lindmark et al, 2001).

En cuanto a los polimorfismos genéticos estudiados, destaca el -174 G/C, que se localiza en el promotor del gen y determina los niveles circulantes de IL-6, modulando

de esta forma la respuesta inflamatoria (Fishman et al, 1998; Bonafe et al, 2001; Olivieri et al, 2002).

Dado que los niveles plasmáticos de IL-6 se han implicado en la patogenia de la EAC, dicho polimorfismo ha sido analizado en varios grupos de pacientes con IAM, obteniéndose resultados discordantes (Bonafe et al, 2001; Cesari et al, 2003). Antonicelli *et al.* demostraron que el genotipo GG era un potente predictor de muerte cardiovascular en pacientes varones en el primer año tras sufrir un síndrome coronario agudo (Antonicelli et al, 2005 a,b). Este hallazgo parece estar relacionado con un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) en los portadores del genotipo GG comparado con los del genotipo CC ó CG, que daría lugar a un mayor riesgo de desarrollar complicaciones ateroscleróticas derivadas de la ruptura de la placa, como sería el IAM (Giacconi et al, 2004).

No obstante, aún no existe unanimidad a la hora de considerar los portadores del alelo G como pacientes de riesgo para sufrir un IAM. De hecho, algunos estudios han comunicado una asociación entre el alelo C y un aumento ligero a moderado del riesgo de IAM (Georges et al, 2001; Jenny et al, 2002), variable según las regiones geográficas estudiadas (Kelberman et al, 2004).

Por lo tanto, en el momento actual no disponemos de evidencias claras acerca de la asociación entre el polimorfismo -174 G/C de la IL-6 y la incidencia de IAM. Una posible razón podrían ser las diferencias étnicas o de estilo de vida entre las poblaciones analizadas.

- Gen de la proteína C reactiva (PCR)

La PCR es un marcador sérico inflamatorio cuya elevación es considerada como la característica principal de la respuesta de fase aguda. No sólo se asocia con el riesgo de

enfermedad cardiovascular (Danesh et al, 2004), sino que además parece estar implicada en su patogenia (de Maat, Trion, 2004).

Las variaciones interindividuales en los niveles basales de PCR dependen de factores medioambientales, características y hábitos del paciente, así como de factores genéticos (Kluft, de Maat, 2003; Kathiresan et al, 2006; Kushner et al, 2006), cuya influencia se ha estimado entre un 35-40% (Pankow et al, 2001).

El hecho de que se trate de un reactante de fase aguda con valor pronóstico en las enfermedades ateroscleróticas y del descubrimiento de que algunos polimorfismos genéticos determinan de forma directa y previsible los niveles plasmáticos de PCR, ha hecho pensar que una predisposición genética a presentar niveles basales elevados podría justificar un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (Hingorani et al, 2006).

El gen de la PCR se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, en la región 1q23.2 (Floyd-Smith et al, 1986; Walsh et al, 1996), y está formado por dos exones separados por un intrón que incluye una repetición de longitud variable del dinucleótido GT (Lei et al, 1985; Woo et al, 1985; Goldman et al, 1987). Su expresión está regulada fundamentalmente por la IL-6, que actúa de forma sinérgica con la IL-1 estimulando su transcripción (Kushner et al, 1995). En consecuencia, determinados polimorfismos del gen de la IL-1 (Berger et al, 2002; Latkovskis et al, 2004) y de la IL-6 (Vickers et al, 2002) se asocian con diferencias en los niveles plasmáticos de PCR y han sido relacionados con IAM, ictus y mortalidad tras SCA en diferentes estudios (Antonicelli et al, 2005; Chiappelli et al, 2005; Iacoviello et al, 2005).

Como se ha comentado previamente, los niveles plasmáticos basales de PCR están determinados genéticamente en un 35-40% (Pankow et al, 2001). Por este motivo, una vez que se logró la secuenciación del gen de la PCR, se trataron de identificar polimorfismos genéticos que afectaran directamente los niveles plasmáticos de la

proteína. Szalai et al. fueron los primeros en comunicar la asociación entre un polimorfismo del gen de la PCR y los niveles plasmáticos basales de la proteína (Szalai et al, 2002). Concretamente, se trata de un polimorfismo que afecta al número de repeticiones del dinucleótido GT, observándose que los alelos GT16 y GT25 (16 y 25 repeticiones, respectivamente) se asociaban con los niveles de PCR más bajos.

Desde entonces, se han identificado numerosos polimorfismos asociados a diferencias en los niveles plasmáticos de PCR, como por ejemplo: -717G/A en el promotor del gen, -1444C/T y +219G/A en el extremo 3' y +29A/T en el intrón. Los genotipos asociados a niveles de PCR más elevados en los diferentes estudios fueron el +1444TT, -717AA, +219GG y +29AA (Brull et al, 2003; Obisesan et al, 2004; D'Aiuto et al, 2005; Suk et al, 2005; Marsik et al, 2006).

A pesar de que todos los polimorfismos mencionados se han asociado a diferencias en los niveles plasmáticos de PCR, ninguno de ellos ha demostrado ser funcional, esto es, correlacionarse de forma directa con los niveles plasmáticos basales de PCR. Diversos grupos han investigado este aspecto, y de todos los polimorfismos analizados, sólo uno parece confirmarse como verdaderamente funcional: se trata del polimorfismo trialélico -390C/T/A localizado en la región promotora. De hecho, los portadores del genotipo TT parecen tener una tendencia a presentar niveles elevados de PCR (Kovacs et al, 2005; Szalai et al, 2005; Danik et al, 2006; Kathiresan et al, 2006).

La otra cuestión que se plantea es si los polimorfismos estudiados, además de influir en los niveles plasmáticos de PCR, también influyen en el desarrollo de enfermedades vasculares. En este sentido, el polimorfismo +1059G/C localizado en el exón II, ha demostrado su correlación con los niveles plasmáticos de PCR, pero no con la trombosis arterial, presión arterial o presión del pulso (Zee, Ridker, 2002; Davey Smith et al, 2005). Por otro lado, el polimorfismo GT20 que afecta a la repetición del



dinucleótido GT del intrón, es más frecuente en individuos con niveles plasmáticos elevados de PCR, asociándose además a la incidencia de eventos vasculares (Szalai et al, 2005). Otro polimorfismo no relacionado con los niveles plasmáticos de PCR, pero significativamente más frecuente en pacientes con EAC que en controles, es el -717G/A, y más concretamente el alelo A, que además ha demostrado su asociación con la incidencia de IAM ó ictus cardioembólico en otro estudio independiente (Chen et al, 2005; Miller et al, 2005). Por último, el único polimorfismo funcional descrito hasta la fecha, el -390C/T/A localizado en la región promotora, ha demostrado relacionarse tanto con los niveles plasmáticos de PCR como con una mayor prevalencia de EAC (Crawford et al, 2006).

En cuanto a estudios realizados con haplotipos del gen de la PCR, los resultados han sido muy variables, dependiendo en parte de la distribución racial de los polimorfismos analizados (Lange et al, 2006). Kardys *et al.* analizaron la relación entre cuatro haplotipos del gen de la PCR, los niveles plasmáticos de PCR y la EAC, concluyendo que, a pesar de que los niveles plasmáticos varían en función de los diferentes haplotipos, estos no influyen en la incidencia de EAC (Kardys et al, 2006).

El hecho de que algunos polimorfismos o haplotipos del gen de la PCR se relacionen con los niveles plasmáticos de la proteína, pero no con el riesgo de enfermedad, puede tener varias explicaciones. Por un lado, los niveles basales de PCR no sólo dependen de factores genéticos, sino también de la interacción con diversos factores de transcripción estimulados por citoquinas reguladoras como la IL-6 y la IL-1 $\beta$  (Black et al, 2004), que probablemente ejerzan un mayor efecto sobre ellos. De hecho, los polimorfismos genéticos sólo justifican un 10% en la variación de los niveles plasmáticos de PCR, que a su vez están determinados genéticamente en hasta un 40% (Pankow et al, 2001; Retterstol et al, 2003; MacGregor et al, 2004; Worns et al, 2006). En vista de la mínima

variación que suponen, no resulta sorprendente que la mayoría de los estudios realizados no hayan podido encontrar/demostrar una relación entre polimorfismos del gen de la PCR y eventos cardiovasculares.

Por lo tanto, a pesar de que unos niveles séricos de PCR basalmente elevados son un predictor independiente de enfermedad cardiovascular, aún no se ha podido establecer una relación causal entre los polimorfismos del gen de la PCR y la incidencia de EAC (Kardys et al, 2006; Zacho et al, 2008).

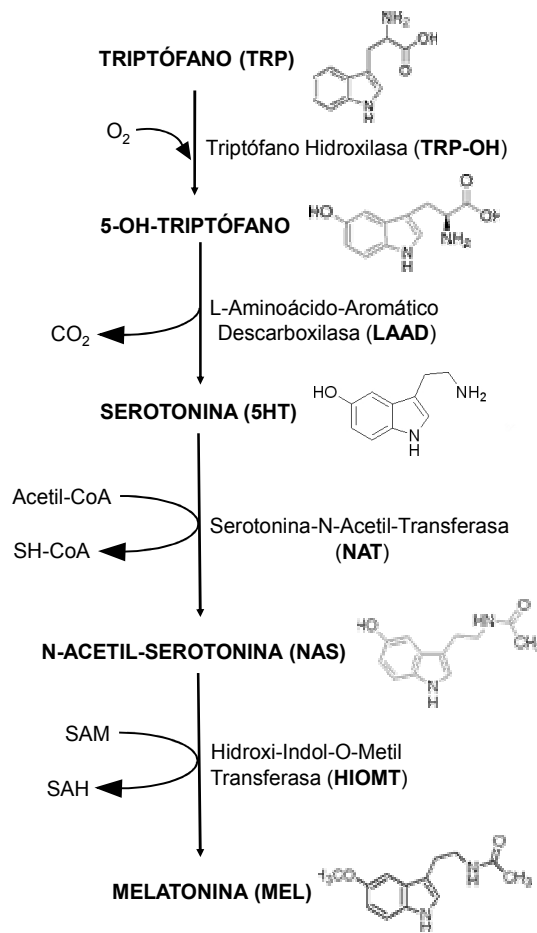
## **2) La hormona circadiana melatonina**

### **2.1. Aspectos generales de su fisiología**

La glándula pineal es un órgano neuroendocrino situado en la pared dorsal del diencefalo, detrás del tercer ventrículo, que desde el punto de vista fisiológico está estrechamente vinculado al hipotálamo y a las glándulas endocrinas periféricas.

Está compuesta por dos tipos celulares: 1) pinealocitos, predominantemente, que producen indolaminas (serotonina y melatonina), otros péptidos y aminas biogénicas; y 2) células de la neuroglía (Brzezinski, 1997).

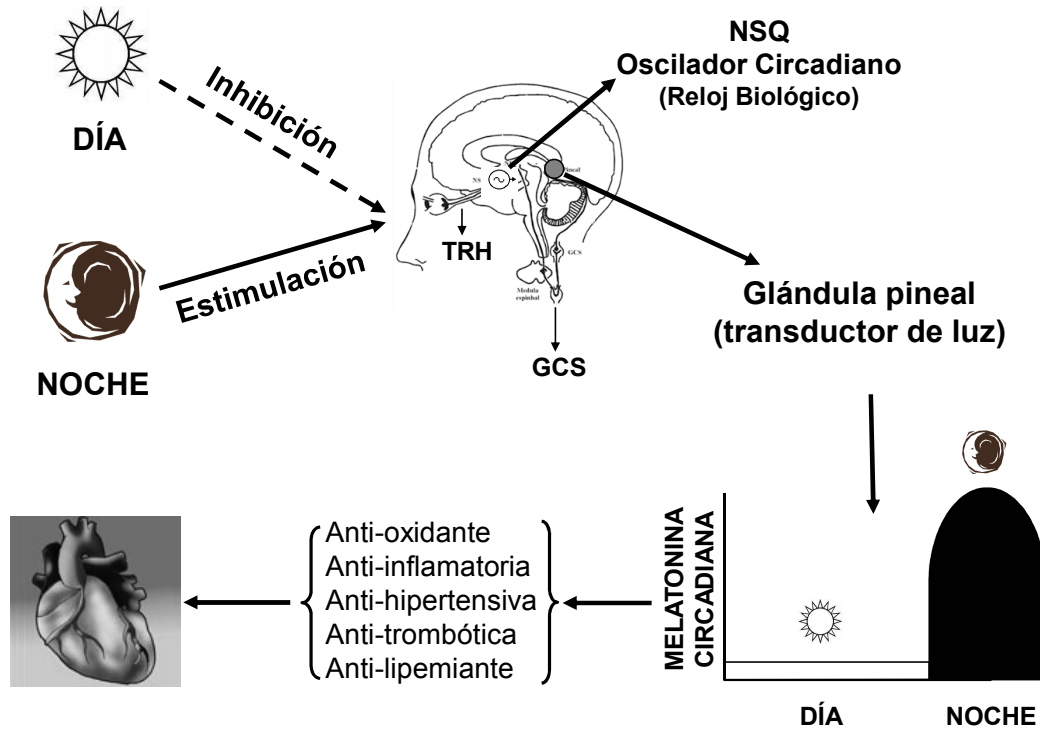
A parte de su efecto sobre numerosos órganos, sistemas fisiológicos y parámetros metabólicos, la glándula pineal juega un papel fundamental en la regulación de los ritmos biológicos. A través de la retina recibe información acerca del nivel de iluminación ambiental y responde modulando los niveles de síntesis de la hormona melatonina (Arendt, 1998). La melatonina, un derivado del triptófano, se aisló e identificó estructuralmente por primera vez en 1958 a partir de extractos de glándula pineal bovina (Lerner et al, 1958). Su biosíntesis se realiza fundamentalmente en la glándula pineal a partir del aminoácido triptófano, que por acción de una triptófano-hidroxilasa (TPH) pasa a 5-hidroxitriptófano, y éste, por decarboxilación, a serotonina. La serotonina a su vez, por acción de dos enzimas (arilalquilamina N-acetiltransferasa [AA-NAT] e hidroxindol-O-metiltransferasa [HIOMT]), se transforma finalmente en melatonina (Reiter, 1991; Claustrat et al, 2005).



**Figura 1.-** Esquema de la síntesis bioquímica de la melatonina. SAM: S-Adenosil-Metionina; SAH: S-Adenosil-Homocisteína.

A parte de la glándula pineal, numerosos tejidos y órganos extrapineales tienen la capacidad de sintetizar melatonina en concentraciones muy diversas. De hecho, los genes codificantes de las tres enzimas implicadas en su síntesis (TPH, AA-NAT y HIOMT) no sólo se expresan en los pinealocitos, sino también en otras estructuras cerebrales (córtex, estriado, núcleos del rafe, médula espinal y retina) y tejidos periféricos (tracto gastrointestinal, órganos reproductivos, piel, plaquetas y células del sistema inmune) (Kvetnoy 1999; Stefulj et al, 2001); por lo tanto, la melatonina no sólo cumple funciones endocrinas, sino también de mediador intracelular en diversos tejidos.

Tanto la síntesis como la secreción pineal de melatonina siguen un ritmo circadiano, estimulándose por la oscuridad e inhibiéndose por la luz (Reiter, 1993; Brzezinski, 1997).



**Figura 2.-** Regulación foto-periódica de la síntesis de melatonina pineal.

El estímulo lumínico se transmite desde la retina, a través del tracto retino-hipotalámico (TRH), al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (“reloj biológico”), y de ahí al sistema nervioso simpático a través de fibras del ganglio cervical superior (GCS). La noradrenalina activa fundamentalmente los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los pinealocitos, lo cual ocasiona un aumento intracelular del AMP cíclico que estimula la producción de melatonina. Los estímulos  $\alpha$ 1-adrenérgicos ejercen un efecto sinérgico contribuyendo también a su secreción (Pangerl et al, 1990; Rubio et al, 1993). Durante las horas de luz, las células

fotorreceptoras de la retina están hiperpolarizadas, lo cual inhibe la liberación de noradrenalina y mantiene el sistema retino-hipotalámico en un estado quiescente. En la oscuridad, por el contrario, liberan noradrenalina que activa el sistema y estimula la producción glandular (Figura 2).

En cuanto a la síntesis extrapineal de melatonina, ésta no sigue un ritmo luz/oscuridad, especulándose que una parte sea consumida localmente por los tejidos, cumpliendo una función protectora ante el estrés oxidativo (Tan et al, 2003). El resto probablemente se une a proteínas para su almacenamiento (Lahiri et al, 1999). La melatonina se libera al torrente sanguíneo por difusión pasiva a medida que aumenta su síntesis durante las horas de oscuridad. El pico de concentración sérica (60-150 pg/ml) se alcanza entre las 2 y 4 a.m., para posteriormente disminuir de forma gradual y mantener unas concentraciones séricas diurnas entre 10 y 20 pg/ml (Brzezinski, 1997). La amplitud de las concentraciones séricas día/noche varía considerablemente a lo largo de las diferentes etapas de la vida. Así, desde las primeras fases del desarrollo embrionario, se establece el ritmo pineal de la expresión génica de la AA-NAT, cuya amplitud, así como la de la síntesis de melatonina, aumentan de forma progresiva. Este hallazgo apoya la hipótesis de que el gen de la AA-NAT juega un papel fundamental en el establecimiento del ritmo de síntesis de la melatonina a lo largo del desarrollo embrionario (Herichova et al, 2001). En plasma, la mayor parte de la melatonina se encuentra unida a proteínas, y sólo una cuarta parte circula de forma libre (Cardinali et al, 1972).

La melatonina se metaboliza principalmente en el hígado a través del citocromo P450, obteniéndose 6-hidroximelatonina, que a su vez es conjugada a derivados sulfatados (70-80%) y glucuronizados (5%) (Cardinali, 1981). Estos conjugados, una vez convertidos en moléculas polares, se eliminan en forma de 6-sulfatoximelatonina

por la orina (Markey et al, 1985). Recientemente se ha demostrado que una parte de la 6-sulfatoximelatonina se produce en órganos extrahepáticos con altos niveles de CYP1B1 (Ma et al, 2005), como son el intestino, líquido cefalorraquídeo y piel. Por tanto, el hígado no es el único órgano implicado en el metabolismo de la melatonina.

Existe además un metabolismo no enzimático a través de la interacción de la melatonina con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (radical hidroxilo y peroxinitrito), que da lugar a la formación de 3-hidroximelatonina cíclica (Tan et al, 1998).

La melatonina, a través de la unión a proteínas intracelulares y receptores específicos, regula diversas funciones fisiológicas y neuroendocrinas, entre las que destaca su papel como “transductor” principal del ritmo circadiano y modulador de la transcripción genética (Mor et al, 1999; Reiter, 2003). Además, numerosos trabajos de investigación han descrito sus múltiples funciones inmunomoduladoras, tanto en la vertiente celular como humoral, así como sus propiedades antioxidantes, oncostáticas y de antienvjecimiento (Guerrero, Reiter, 2002; Carrillo-Vico et al, 2003; Reiter, Tan, 2003; Macchi, Bruce, 2004).

Una de las funciones que ha suscitado especial interés es su actividad antioxidante, que puede ejercer tanto de forma directa como indirecta. Así, de forma directa (receptor-independiente), la melatonina tiene la capacidad de captar especies reactivas de oxígeno, actuando como un verdadero “recolector” de radicales libres. Por otro lado, de forma indirecta (mediada por los receptores de membrana ó nucleares), es capaz de estimular la actividad de diversas enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx) (Reiter, Tan, 2003). Esta actividad antioxidante indirecta, así como la cascada de reacciones que da lugar a sus metabolitos, amplía enormemente la acción

cardioprotectora de la melatonina y explica su gran eficacia ante situaciones de alto estrés oxidativo (Cuzzocrea, Reiter, 2001; Reiter, Tan, 2003).

En cuanto a sus funciones inmunomoduladoras, éstas son múltiples y variadas, e implican tanto a la vertiente celular como humoral. En este sentido, se ha comprobado que la melatonina es capaz de: aumentar el peso de timo y bazo, incrementar la capacidad proliferativa de los linfocitos, aumentar el número de células *natural killer* y de monocitos en la médula ósea, así como el número y la respuesta de las células productoras de anticuerpos (Guerrero, Reiter, 2002; Maestroni, 2005). Además, también regula la expresión génica y la producción de múltiples mediadores de la inmunidad, aumenta la capacidad de los macrófagos de presentación de antígenos a las células T, incrementa la expresión de las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad de clase II y aumenta la producción de IL-1 y del TNF- $\alpha$ . Por último, es capaz de regular al alza la expresión génica del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del TNF- $\alpha$ , del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), así como de la IL-1 $\beta$  y del INF- $\gamma$ , entre otros (Carrillo-Vico et al, 2005).

Todas estas funciones están mediadas mayoritariamente por dos tipos de receptores: de la membrana celular y nucleares.

- Receptores de la membrana celular

Incluyen el Mel 1a (MT1), Mel 1b (MT2) y Mel 1c (MT3). Todos ellos pertenecen a la misma familia de receptores acoplados a proteína G con siete dominios transmembránicos (Reppert et al, 1994; Reppert et al, 1995; Carlberg, 2000). Hasta la fecha, en mamíferos sólo se han clonado el Mel 1a y Mel 1b, que presentan un 60% de homología en su contenido de aminoácidos (Dubocovich et al, 2003). Ambos



se expresan de forma variable en múltiples órganos y tejidos, sin que se conozcan en muchos casos las causas subyacentes a los diferentes perfiles de expresión.

El Mel 1a se expresa sobre todo en estructuras cerebrales, donde representa más del 99% del total de los sitios de unión de la melatonina y actúa como mediador del efecto inhibitorio agudo de la hormona (Liu et al, 1997).

El Mel 1b predomina en las células retinianas, aunque también se expresa en menor grado en el sistema nervioso central, donde está implicado en la regulación del ritmo circadiano por la melatonina.

Asimismo, se ha detectado la expresión de ambos subtipos de receptores en el sistema cardiovascular, con cuatro localizaciones principales: pared ventricular, arterias coronarias, aorta y arterias periféricas. Sin embargo, sus efectos a este nivel aún permanecen desconocidos, basándose en meras hipótesis derivadas de modelos animales.

#### 1) Pared ventricular

Ekmeckioglu *et al.* fueron los primeros en demostrar la expresión de ambos subtipos de receptores en el ventrículo izquierdo humano (Ekmeckioglu et al, 2001;18; Ekmeckioglu et al, 2003). Sin embargo, el efecto de la melatonina sobre la función ventricular en humanos aún es desconocido. En ratas, a nivel del músculo papilar, posee efectos antiadrenérgicos que inducen una reducción de la fuerza contráctil (Abete et al, 1997). Además, puede inhibir la producción del AMPc tras su estimulación con el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol en cultivos primarios de células cardíacas de rata (Pang et al, 2002), y estimular las corrientes de calcio activadas por alto voltaje en células cardíacas embrionarias (Mei et al, 2001).

#### 2) Arterias coronarias

Diversos estudios han demostrado la presencia de ambos subtipos de receptores en las arterias coronarias, tanto de muestras patológicas como de voluntarios sanos (Ekmekcioglu et al, 2001;18; Ekmekcioglu et al, 2001;21; Ekmekcioglu et al, 2003). Incluso existe cierta evidencia acerca de una variación circadiana en la expresión del MT1 en dichas arterias (Ekmekcioglu et al, 2001;18). Sin embargo, también en esta localización se desconoce el papel que juega la melatonina.

En modelos animales porcinos, la melatonina produce vasoconstricción a través de la inhibición de los efectos del óxido nítrico y de la potenciación de efectos serotoninérgicos (Yang et al, 2001).

Estudios en animales sugieren un doble efecto de la melatonina sobre el lecho vascular dependiendo del receptor activado: la activación del MT1 produciría vasoconstricción y la del MT2, vasodilatación (Masana et al, 2002). El mecanismo de acción implicado probablemente sea una modulación de los efectos noradrenérgicos y/o del óxido nítrico.

### 3) Aorta

También expresa ambos subtipos de receptores (Ekmekcioglu et al, 2001;21; Ekmekcioglu et al, 2003). Estudios llevados a cabo en anillos aórticos de conejo, han demostrado un efecto vasodilatador de la melatonina (Monroe, Watts, 1998), probablemente mediado por la elevación del óxido nítrico, la potenciación de los efectos de la acetilcolina y/o la inhibición de los efectos de la noradrenalina (Weekley, 1995).

### 4) Arterias periféricas

Se desconoce qué subtipos de receptores expresan y cuál es el efecto de la melatonina a este nivel.

En ratas, la melatonina parece estar implicada en mecanismos termorreguladores (Viswanathan et al, 1990). Estudios en humanos han demostrado que la melatonina interviene en la variación circadiana de la temperatura corporal (a través de vasodilatación periférica selectiva), así como en la inducción del sueño (Cagnacci et al, 1992; Hughes, Badia, 1997; Krauchi et al, 1997; van den Heuvel et al, 1999; Van der Helm-van Mil et al, 2003).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la melatonina reduce la presión arterial en: varones sanos (Arangino et al, 1999), mujeres postmenopáusicas que reciben terapia hormonal sustitutiva (Cagnacci et al, 2001), diabéticos tipo 1 adolescentes (Cavallo et al, 2004) y pacientes con HTA esencial (Scheer et al, 2004).

Recientemente, una proteína con un perfil de unión similar al Mel1b ha sido denominada Mel1c (MT3). La proteína ha sido obtenida por purificación a partir de riñón de hámster. Esta muestra un 95% de homología a una quinona-reductasa humana (tipo 2), envuelta en procesos detoxificantes (Nosjean et al, 2000). Esta proteína está ampliamente distribuida en tejido de hámster, ratón, perro y mono (Nosjean et al, 2001). En células de melanoma de hámster (RPMI), la activación de este receptor incrementa el recambio intracelular de los segundos mensajeros relacionados con los inositoles fosfato (Eison et al, 1993).

- Receptores nucleares

Se distinguen tres subtipos con perfiles de expresión claramente distintos:

- NR1F1 (ó RZR/ROR $\alpha$ ), con expresión en varios órganos y tejidos, como sangre, células cutáneas (Becker-Andre et al, 1993; Steinmayr et al, 1998), timo y bazo (Carrillo-Vico et al, 2003).

- NR1F2 (ó RZR/ROR $\beta$ ), exclusivo de estructuras cerebrales/espinales y retinianas, alcanzando máximos niveles de expresión en la glándula pineal, sistema nervioso central, *pars tuberalis* de la hipófisis, hipotálamo y tálamo (Becker-Andre et al, 1994; Park et al, 1996; Park et al, 1997).
- NR1F3 (ó RZR/ROR $\gamma$ ), con expresión en varios tejidos, predominando en el músculo esquelético (Hirose et al, 1994).

Pertenece a la superfamilia de los receptores nucleares hormonales esteroideos/tiroideos (Carlberg, 2000) y parecen estar implicados, al menos parcialmente, en los efectos inmunomoduladores y circadianos de la melatonina (Steinhilber et al, 1995; Garcia-Maurino et al, 1998; Carrillo-Vico et al, 2005).

## **2.2. La melatonina y su relación con la EAC**

Diversos estudios clínicos realizados en humanos han demostrado la existencia de una relación entre los niveles séricos de melatonina y la presencia de EAC, constatándose la existencia de niveles de melatonina reducidos en comparación con sujetos controles (Brugger et al, 1995; Sakotnik et al, 1999; Altun et al, 2002; Girotti et al, 2003).

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha detectado la existencia de una relación entre los niveles séricos de melatonina y el IAM (Dominguez-Rodriguez et al, 2002). Concretamente, observamos que los pacientes con IAM presentan unas concentraciones nocturnas de melatonina inferiores a las de los sujetos controles.

Se sugirió que esta disminución de los niveles nocturnos de melatonina en pacientes con infarto sea debida, al menos en parte, a sus efectos antioxidantes, concretamente a su capacidad para actuar como “recolector” de radicales libres generados en las primeras 24 horas del infarto. De hecho, como ya se ha señalado

previamente, el efecto cardioprotector de la melatonina en los pacientes con infarto es doble: de forma *directa*, actuando como recolector de radicales libres, protegiendo así frente al daño oxidativo (Cuzzocrea, Reiter, 2001; Reiter, Tan, 2003), y de forma *indirecta*, estimulando las enzimas antioxidantes y estabilizando la fluidez de las membranas (Reiter et al, 2001).

Esta capacidad antioxidante de la melatonina también juega un papel fundamental en la progresión de la placa aterosclerótica, formada por LDL oxidadas y otros productos lipídicos oxidados. En un estudio realizado por Domínguez Rodríguez y col. (Domínguez Rodríguez et al, 2005), se demostró la existencia de una asociación independiente entre los niveles nocturnos de LDL oxidadas y melatonina en los pacientes con IAM. Los autores sugieren que los niveles nocturnos de melatonina en sangre pueden ser requeridos, junto con otros antioxidantes fisiológicos, para intentar mantener el estrés oxidativo lo más bajo posible.

En relación a las propiedades inmunomoduladoras de la melatonina, diversos estudios han demostrado un ritmo luz-oscuridad de ciertos mediadores inflamatorios como la IL-6 ó la PCR en pacientes con IAM. Se ha sugerido que algunas de estas citocinas proinflamatorias puedan estar bajo un control neuroendocrino de la melatonina, atribuyéndole además propiedades antiinflamatorias (Domínguez Rodríguez et al, 2003; Domínguez Rodríguez et al, 2004; Dominguez Rodriguez et al, 2006).

### **2.3. Melatonina y polimorfismos genéticos relacionados con la EAC**

A pesar de la evidencia acumulada acerca de la implicación de los receptores de la melatonina en sus efectos cardioprotectores, aún se desconoce la existencia de polimorfismos genéticos de los mismos que puedan influir de alguna forma en la

predisposición a la aterosclerosis y sus complicaciones en humanos. No obstante, estudios recientes (Bouatia-Naji et al, 2009; Lyssenko et al, 2009; Prokopenko et al, 2009) han identificado polimorfismos del gen del receptor de la melatonina 1b (Mel 1b) que modulan los niveles de glucemia en ayunas, cuya elevación constituye un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y EAC. En sujetos sanos, no diabéticos, existe una gran variabilidad individual en los niveles de glucemia en ayunas, que en aproximadamente un 30% obedece a razones genéticas (Snieder et al, 1999; Watanabe et al, 1999). Sin embargo, hasta la fecha sólo se ha podido explicar una pequeña parte de esta variabilidad genética.

Diferentes estudios han demostrado que el receptor de la Mel 1b se expresa en los islotes pancreáticos humanos y las células  $\beta$  (Ramracheya et al, 2008; Bouatia-Naji et al, 2009; Lyssenko et al, 2009). En sujetos sanos, la secreción de insulina sigue un ritmo circadiano opuesto al de la secreción de melatonina, con picos en sus niveles durante el día (Boden et al, 1996), probablemente debido a una regulación melatoninérgica central mediada por los receptores MT2 de las células  $\beta$  pancreáticas (Van Cauter et al, 1998). Esta hipótesis ha sido corroborada por diferentes estudios que han demostrado una alteración del ritmo circadiano de la melatonina en la DM2 (Peschke et al, 2006; Peschke et al, 2007).

Entre los diferentes loci genéticos implicados en su regulación, destaca el gen que codifica el receptor de la Mel 1b, y más concretamente los polimorfismos rs10830963 y rs1387153. Ambos se han relacionado con un aumento de la glucemia en ayunas y con una alteración de la secreción de insulina, lo cual conlleva finalmente a un mayor riesgo de desarrollar DM2 (Bouatia-Naji et al, 2009; Lyssenko et al, 2009; Prokopenko et al, 2009).

En un metaanálisis de 10 estudios de asociación genómica, y 13 estudios de casos y controles de DM2 (Prokopenko et al, 2009), se ha demostrado la asociación del alelo G del polimorfismo rs10830963 con un aumento de la glucemia en ayunas y un mayor riesgo de DM2. Del mismo modo, Lyssenko et al. confirmaron estos hallazgos en dos estudios prospectivos, proponiendo como mecanismo causal un deterioro progresivo de la secreción de insulina, tanto basal como en respuesta a la administración de glucosa, en los portadores del alelo G. Asimismo demostraron la expresión del receptor Mel 1b en los islotes pancreáticos humanos, predominantemente en las células  $\beta$ , y observaron que ésta aumentaba en los portadores del alelo G y en los diabéticos (Lyssenko et al, 2009).

Por otra parte, en otro metaanálisis de asociación genómica, que incluyó 2151 sujetos sanos, se identificó el polimorfismo rs1387153 (Bouatia-Naji et al, 2009). Dicho polimorfismo, y más concretamente su alelo T, se asoció con un aumento de la glucemia en ayunas y con un mayor riesgo de DM2 en la población europea. Asimismo demostraron un efecto aditivo de éste y otros tres polimorfismos identificados en estudios previos (rs1799884 del gen GCK, rs560887 del gen G6PC2 y rs1260326 del gen GCKR) sobre los niveles de glucemia en ayunas, de tal forma que a mayor número de alelos de riesgo, las glucemias son más elevadas (Weedon et al, 2005; Bouatia-Naji et al, 2008; Chen et al, 2008; Vaxillaire et al, 2008). Este efecto combinado de los polimorfismos de riesgo sobre la glucemia fue confirmado en un estudio de replicación holandés, en el que además se demostró una asociación entre el número de alelos de riesgo y la susceptibilidad al desarrollo de DM2 (Reiling et al, 2009). Por lo tanto, el aumento de la expresión de los receptores en sujetos diabéticos (Peschke et al, 2007) y en portadores de alelos de riesgo (Lyssenko et al, 2009), sugiere claramente su

implicación en la patogenia de la DM2 a través de un efecto inhibitorio sobre las células  $\beta$  pancreáticas.

En resumen, a pesar que aún no se han identificado polimorfismos de los receptores melatoninérgicos relacionados con la EAC, sí se conocen polimorfismos de los mismos que modulan el riesgo de desarrollar DM2, que, al fin y al cabo, es un conocido factor de riesgo cardiovascular.



## **OBJETIVOS**

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica en cuya fisiopatología intervienen múltiples tipos celulares, así como una gran variedad de factores humorales, citoquinas y otros mediadores de la inflamación. La melatonina, a través de sus diversas funciones inmunomoduladoras y propiedades antioxidantes, podría desempeñar un papel en la regulación de determinados mediadores inflamatorios y de esta forma controlar la progresión del proceso aterosclerótico.

En un intento de explicar las altas tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica en nuestra área geográfica, establecemos la hipótesis de la existencia de una serie de polimorfismos genéticos “desfavorables”, tanto de la melatonina como de los diferentes mediadores inflamatorios relacionados con la aterotrombosis coronaria, que, desde un punto de vista fisiopatológico, ocasionen una disminución de las concentraciones séricas de melatonina, una menor protección frente al daño oxidativo inducido por los radicales libres, y, en el contexto de un perfil de “factores medioambientales” desfavorable, una mayor incidencia de infarto agudo de miocardio. Es decir, en nuestra región existiría un mayor grado de “no protección” frente a la cardiopatía isquémica, debido a la interacción entre factores genéticos, inflamatorios y ambientales desfavorables.

La profundización en el conocimiento de estos “factores no protectores” puede ser de gran utilidad en áreas geográficas con una alta prevalencia de la enfermedad, ya que permitiría desarrollar técnicas de cribaje genético que ayudasen a predecir el riesgo de cardiopatía isquémica, mejorando así las estrategias de prevención primaria y secundaria.

Los principales objetivos de esta tesis son los siguientes:

1. Estudiar los polimorfismos genéticos de la melatonina y de los mediadores inflamatorios de la aterotrombosis coronaria (interleukina 6, matriz

metaloproteinasa 9, LDL oxidado, soluble CD40 ligando, endotelina 1, óxido nítrico y proteína C reactiva) en pacientes con IAM en la isla de Tenerife, y compararlos con controles representativos de la población de referencia sin cardiopatía isquémica, apareados por edad y sexo.

2. Estudiar la interrelación de los diferentes polimorfismos genéticos con los factores de riesgo cardiovasculares y los datos antropométricos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

# 1) DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DEL ESTUDIO

## 1.1. Tipo de diseño

Diseño de casos y controles, con casos incidentes.

## 1.2. Población de estudio

- **CASOS:** Pacientes (atendidos en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario de Canarias y) diagnosticados de síndrome coronario agudo con (SICACEST) y sin elevación del segmento ST (SICASEST).
- **CONTROLES:** Sujetos sanos, sin antecedentes de enfermedad arterial coronaria (EAC).

## 1.3. Casos

En el estudio se incluyeron 300 pacientes seleccionados de forma prospectiva desde marzo de 2005 a marzo de 2006.

## 1.4. Controles

Se seleccionaron 250 sujetos sanos, sin antecedentes de EAC, de los diferentes municipios de la isla de Tenerife.

### **1.5. Criterios de inclusión de los sujetos del estudio**

- Edad mayor de 18 años.
- Origen canario (nacidos en Canarias con un mínimo de tres generaciones previas de canarios).
- Ausencia de: antecedentes cardiovasculares, enfermedades infecto-contagiosas, patología hepática y/o gastrointestinal, adicción a drogas por vía parenteral, ó cualquier otra condición médico-quirúrgica que pueda poner en riesgo al sujeto ó limitar su capacidad de cooperación en el estudio.

### **1.6. Criterios para los CASOS:**

Los pacientes con SICACEST se diagnosticaron siguiendo los criterios establecidos para la definición universal del IAM (Thygesen et al, 2007):

Detección de aumento y/o disminución de biomarcadores miocárdicos (preferiblemente troponina), con al menos una determinación por encima del percentil 99 del límite superior de referencia, junto con evidencia de isquemia miocárdica determinada por al menos uno de los siguientes:

- 1) Síntomas de isquemia.
- 2) Cambios electrocardiográficos sugestivos de isquemia (cambios del segmento ST-T ó bloqueo de rama izquierda de nueva aparición).
- 3) Aparición de ondas Q patológicas en el electrocardiograma.
- 4) Evidencia por prueba de imagen de pérdida de miocardio viable ó de trastorno segmentario de la contractilidad de nueva aparición.

Por otro lado, el diagnóstico de SICASEST se estableció en base a los criterios clínicos y electrocardiográficos expuestos en las guías de la *Sociedad Europea de Cardiología* (Bassand et al, 2007), y que se pueden resumir como sigue:

- 1) Dolor torácico sugestivo de isquemia.
- 2) Cambios electrocardiográficos, que incluyen: depresión persistente o transitoria del segmento ST, cambios de onda T (inversión, aplanamiento o pseudonormalización) ó ausencia de cambios electrocardiográficos.

### **1.7. Criterios para los CONTROLES:**

Exclusión de antecedentes cardiovasculares mediante anamnesis, exploración física y electrocardiograma basal.

### **1.8. Criterios de exclusión de los sujetos del estudio**

- Insuficiencia renal aguda o crónica.
- Enfermedades hepáticas.
- Patología tiroidea.
- Embarazo.
- Enfermedades psiquiátricas.
- Infecciones específicas y no específicas.
- Enfermedades autoinmunes y del tejido colágeno.
- Enfermedades malignas.
- Adicción a drogas.
- Tratamiento inmunosupresor, con quimioterapia o radioterapia.
- Enfermedades relacionadas con alteraciones en los patrones circadianos (síndrome de *jet lag*).

Todos los sujetos del estudio, antes de ser incluidos, fueron evaluados mediante anamnesis, exploración física, radiografía de tórax, electrocardiograma y analítica de sangre.

El estudio se realizó de acuerdo a los principios de la *Declaración de Helsinki y de la Asamblea Médica Mundial*, previo consentimiento informado de todos los participantes.

## **2) PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Una vez ingresados en la Unidad de Coronarias, a todos los sujetos del estudio se les implantó un catéter en la vena antecubital del antebrazo para la extracción de muestras sanguíneas. Dicha extracción se realizó tras un periodo de ayuno de al menos 10 horas, salvo en los casos, en los que se realizó lo antes posible tras el ingreso.

### **2.1. Metodología de trabajo**

Tanto en los casos como en los controles, las muestras de sangre se recogieron en tubos tipo Vacutainer con gel separador. Después de aproximadamente unos 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para la obtención de suero. Posteriormente, cada uno de los sueros fue alicuotado y almacenado, por congelación, a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

El mismo procesamiento fue llevado a cabo tanto para los casos como para los controles.



### **3) MÉTODOS DE LABORATORIO**

#### **3.1. Determinación de bioquímica sanguínea**

La determinación de las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol total y sus diferentes fracciones, triglicéridos, ácido úrico, creatinina, apo-B, HbA1c, albúmina y fibrinógeno, se realizó en el Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias mediante los test enzimático colorimétrico e inmunoturbidimétrico.

#### **3.2. Extracción del DNA**

La extracción del DNA en suero se realizó siguiendo el protocolo estandarizado para la purificación y cuantificación del mismo, que se resume a continuación:

3.2.1.) Protocolo para la purificación/concentración de DNA en suero sanguíneo (según protocolo de QIAGEN, QIAmp DNA mini kit, Qiagen Ltd, Qiagen House, Fleming Way, Crawley, Sussex, UK)

- Pipetear 200 µl de suero en el fondo de un tubo de eppendorf de 1,5 ml.
- Añadir 20 µl de la mezcla de QIAGEN proteasa a cada una de las muestras.
- Añadir 200ml de Buffer AL (Buffer para proteasa) a las muestras y mezclar con vórtex durante 15 segundos.
  - Para asegurar una lisis eficiente, es imprescindible que la muestra y el Buffer AL sean mezclados completamente para obtener una solución homogénea (evitar añadir QIAGEN proteasa directamente al Buffer AL ya que éste la inactiva).

- Incubar a 56° C durante 10 minutos.
  - El rendimiento de DNA alcanza un máximo tras una lisis durante 10 minutos a esa temperatura (56 °C).
  - Tiempos de incubación más largos no influyen en el rendimiento ó en la calidad del DNA purificado.
- Centrifugar brevemente el tubo de eppendorf para quitar las gotas del interior de la tapa.
- Añadir 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar nuevamente con vórtex durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar brevemente el tubo de eppendorf para quitar las gotas del interior de la tapa.
- Aplicar cuidadosamente la muestra obtenida a la columna de centrifugado QIAamp, alojada en un tubo de recolección de 2 ml, sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocar la columna de centrifugado en un tubo de recolección limpio y desechar el eluido anterior.
  - Cerrar cada columna de centrifugado para evitar la formación de aerosoles durante el centrifugado.
  - La centrifugación se lleva a cabo a 8000 rpm. La centrifugación a velocidad máxima no afecta el rendimiento ó la pureza del DNA. En caso de que la disolución de lisis no haya atravesado completamente la columna tras el centrifugado, se deberá centrifugar otra vez a mayor velocidad hasta que la columna esté limpia.

- Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 µl de Buffer AW1 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocar la columna de centrifugado en un tubo de recolección limpio y desechar el eluido anterior .
- Abrir cuidadosamente la columna y añadir 500 µl de Buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (12000 rpm) durante 3 minutos. Colocar la columna de centrifugado en un tubo de recolección limpio y desechar el eluido anterior.
- Abrir cuidadosamente la columna y añadir 100 µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 5 minutos y luego centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos.
  - La incubación de la columna de centrifugado cargada con el Buffer AE durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación normalmente incrementa el rendimiento de DNA.
  - Los DNAs purificados de las muestras de suero fueron almacenadas a 4 °C hasta su posterior procesamiento (PCRs).

### 3.2.2.) Protocolo para la cuantificación de DNA en suero

Para la determinación de la concentración de DNA en suero se utilizó el reactivo de Hoechst 33258 Dye y como variable cuantificable la medida de la fluorescencia del complejo formado (Dyna-Quant 200 fluorimeter, Mount Holly, New York).

El fundamento de la técnica está basado en que el reactivo Hoechst 33258 Dye es un mutágeno intercalante del DNA que se une a las regiones ricas en A-T (adenina-timina)

del DNA bicatenario. Esta unión del reactivo al DNA emite una fluorescencia proporcional a la concentración de DNA ( $\lambda$  excitación = 350 nm;  $\lambda$  emisión = 450 nm).

En el fluorímetro se cuantifica la fluorescencia emitida por el intercalante, proporcionando así la concentración de DNA en cada una de las muestras. La sensibilidad de esta determinación es de 6.8 ng/ml. Como referencia ó patrón para la curva de calibración, se utilizó DNA de timo de vaca (DNA estándar). Este DNA estándar es bicatenario, altamente polimerizado y contiene aproximadamente un 58% de A-T. La recta de calibración se construyó entre las concentraciones 0-200 ng/ml, a partir de una disolución stock de 40 ng/ml. La recta de calibración obtenida presentó un coeficiente de correlación entre la fluorescencia y las concentraciones estándar de DNA de  $r^2 = 0.9948$ . Las muestras problemas (DNA extraído del suero), con su fluorescencia conocida, fueron interpoladas en la recta de calibración para la cuantificación de las mismas. Los coeficientes intra e inter-ensayo fueron, 3.87 y 5.49 %, respectivamente.

Una vez purificado y cuantificado el DNA, se procedió al genotipado de los diferentes polimorfismos genéticos utilizando como herramienta amplificadora la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* ó *PCR*).

#### **4) ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todas las variables continuas se expresan como medias  $\pm$  desviaciones estándar. Las comparaciones de proporciones se llevaron a cabo con la prueba de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fischer, según procediera. Para la comparación de medias entre pares de grupos se utilizó la prueba de la t de Student. La presencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de estudio para los polimorfismos de un único nucleótido (*SNPs*) estudiados se comprobó con la prueba de chi-cuadrado. Para la estimación de la función de supervivencia se usó la prueba de Kaplan-Meier. Se utilizó

el programa estadístico SPSS versión 17.0 para Windows para el análisis de los datos.

Se consideraron diferencias estadísticas significativas si  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

## **1) DESCRIPCIÓN Y COMPARACIONES CLINICAS BASALES DE LA MUESTRA**

Se incluyeron 300 pacientes (215 varones; edad media  $63 \pm 11$  años) diagnosticados de síndrome coronario agudo con y sin elevación del segmento ST y 250 controles de similares edad y sexo (164 varones; edad media  $60 \pm 12$  años). En cuanto a los factores de riesgo cardiovasculares, los casos presentaron una mayor proporción de diabetes mellitus, hipercolesterolemia, tabaquismo, antecedentes de enfermedad coronaria previa y vasculopatía periférica. Asimismo las concentraciones de glucosa, colesterol total y sus diferentes fracciones, fueron significativamente mayores en los casos que en los controles. En el resto de los parámetros analíticos no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1).

**Tabla 1**

	Controles (n = 250)	Casos (n = 300)	P
Edad	60,54 ± 12,2	63,84 ± 11,12	0,23
Sexo (varones) —n (%)	164 (65,6)	215 (71,7)	0,12
IMC	29,14 ± 3,46	28,74 ± 4,44	0,34
Diabetes mellitus —n (%)	55 (22)	112 (37,3)	< 0,001
Hipercolesterolemia —n (%)	78 (31,2)	142 (47,3)	< 0,001
HTA —n (%)	133 (53,2)	163 (54,3)	0,79
Tabaquismo —n (%)	32 (12,8)	121 (40,3)	< 0,001
Vasculopatía periférica —n (%)	13 (5,2)	36 (12)	0,005
Enf. Coronaria previa —n (%)	0 (0)	61 (20,5)	< 0,001
Glucemia (mg/dl)	101,19 ± 24,80	151,99 ± 72,12	< 0,001
Colesterol total (mg/dl)	184,10 ± 45,58	195,61 ± 37,96	0,002
HDL-c (mg /dl)	40,37 ± 8,93	45,24 ± 10,05	< 0,001
LDL-c (mg/dl)	112,99 ± 38,97	118,26 ± 32,06	0,008
Triglicéridos (mg/dl)	159,95 ± 56,16	152,35 ± 71,47	0,17
Apo-B (mg/dl)	97,57 ± 26,44	101,78 ± 25,09	0,058
Albúmina (mg/dl)	3,80 ± 0,16	3,82 ± 0,32	0,91
Hb basal (mg/dl)	14,13 ± 1,55	14,30 ± 1,60	0,22
Leucocitos al ingreso	8062,35 ± 2130,13	10396,96 ± 3233,53	0,18
Creatinina (mg/dl)	0,93 ± 0,17	0,96 ± 0,38	0,20
Acido úrico (mg/dl)	6,14 ± 1,45	6,12 ± 3,02	0,34



## **1.1. Características clínicas cardiológicas de los casos**

Las características clínicas evaluadas en los casos fueron:

- Síndrome isquémico coronario agudo: tipo y presentación clínica (clasificación de Braunwald).
- Clasificación de riesgo TIMI de angina inestable /infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST
- Clase Killip al ingreso.
- Tratamiento de reperfusión.

De los 300 pacientes incluidos, 171 (57%) se diagnosticaron de un síndrome isquémico coronario agudo con elevación del segmento ST y 129 (43%) sin elevación del segmento ST. En cuanto a la presentación clínica del síndrome anginoso según la clasificación de Braunwald, 73 (24%) pacientes debutaron con angina clase I, 3 (1%) en clase II y 224 (75%) en clase III. En la práctica totalidad de los pacientes (98%) se trataba de una angina primaria, y 5 (2%) presentaron una angina postinfarto.

El riesgo TIMI de angina inestable y de infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST para ambos subgrupos de pacientes se muestra en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1**

	Casos n = 300
<b>Riesgos TIMI —n (%)</b>	
De angina inestable 0/1	4 (3,1%)
De angina inestable 2	20 (15,5%)
De angina inestable 3	32 (24,8%)
De angina inestable 4	26 (20,1%)
De angina inestable 5	16 (12,4%)
De angina inestable 6	21 (16,2%)
De angina inestable 7	10 (7,7%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 0/1	25 (14,6%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 2	22 (12,8%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 3	43 (25,1%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 4	28 (16,3%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 5	23 (13,4%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 6	8 (4,6%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 7	11 (6,4%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado 8	3 (1,7%)
De infarto de miocardio con segmento ST elevado >8	8 (4,6%)

El 91% de los pacientes presentaban una clasificación hemodinámica de Killip I al ingreso. Asimismo, el 56% fueron revascularizados con angioplastia transluminal

percutánea, el 3,4% con fibrinolíticos y el 11,3% con cirugía de revascularización coronaria.

## 1.2. Anatomía coronaria de los casos

La anatomía coronaria de los casos se expone en la Tabla 1.2. En lo que respecta a la presencia de lesiones obstructivas, el 31,4% de los pacientes no presentaban lesiones obstructivas significativas, mientras que el resto tenía afectación variable de las tres arterias coronarias, predominando la enfermedad de un vaso. La arteria más predominantemente afectada en nuestros pacientes fue la descendente anterior, seguida de la circunfleja y coronaria derecha.

**Tabla 1.2**

	Casos n = 300
Lesiones obstructivas no significativas —n (%)	94 (31,4)
Lesión de 1 vaso—n (%)	86 (28,6)
Lesiones de 2 vasos—n (%)	59 (19,7)
Lesiones de 3 vasos—n (%)	61 (20,4)
Arteria responsable del síndrome clínico del paciente—n (%)	
Arteria Descendente anterior	145 (48,3)
Arteria Coronaria derecha	66 (22)
Arteria Circunfleja	69 (23)
Arteria Tronco común de Coronaria izquierda	20 (6,6)

### 1.3. Complicaciones cardiovasculares durante el ingreso en los casos

Como puede apreciarse en la Tabla 1.3, la complicación cardiovascular más frecuente fue, con diferencia, la taquicardia y/o fibrilación ventricular, seguida por el síndrome de insuficiencia cardíaca, mientras que el accidente cerebrovascular fue la complicación más infrecuente.

**Tabla 1.3**

	Casos n= 300
<b>Complicaciones cardiovasculares—n (%)</b>	
Mortalidad	10 (3,3)
Isquemia recurrente	22 (7,5)
Infarto – reinfarto	3 (1)
Insuficiencia cardíaca	43 (14,7)
Accidente cerebro vascular	1 (0,3)
Fibrilación auricular	40 (13,7)
Taquicardia y/o fibrilación ventricular	89 (30,5)
Insuficiencia mitral aguda	6 (2,1)

#### 1.4. Tratamiento farmacológico en los casos

La totalidad de los pacientes recibieron tratamiento con estatinas, y un elevado porcentaje de los mismos, doble tratamiento antiagregante con aspirina y clopidogrel (98,7 y 81%, respectivamente), así como betabloqueantes (92%). Entre los fármacos antihipertensivos, el segundo grupo más utilizado después de los betabloqueantes, fueron los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (31,7%). La utilización del resto de fármacos puede observarse en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4**

Uso de Fármacos —n (%)	Casos n =300
Aspirina	296 (98,7)
Clopidogrel	243 (81)
Beta bloqueantes	276 (92)
Antagonistas del calcio	26 (8,7)
Seguril	51 (17)
IECA	95 (31,7)
ARA II	4 (1,3)
Espironolactona	10 (3,3)
Insulina	141 (47)
Antidiabeticos orales	53 (17,7)
Trimetazidina	4 (1,3)
Estatinas	300 (100)

### 1.5. Resultados de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg de los SNPs

Para los genotipos de la fosfolipasa A2-IIa, soluble CD40 ligando (sCD40L), mieloperoxidasa (MPO), matriz metaloproteínasa-9 (MMP-9), paraoxonasa 1 (PON 1), proteína C reactiva (PCR), interleucina-6 (IL-6) y del receptor de la melatonina 1A (Mel 1A), se confirmó que la proporción de estos genotipos se ajustaba al equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 1.5).

**Tabla 1.5**

	$\chi^2$	p
Genotipo Fosfolipasa A2-IIa	0,09	0,75
Genotipo Soluble CD 40 Ligando	2,51	0,11
Genotipo Mieloperoxidasa	3,11	0,07
Genotipo Matriz metaloproteínasa-9	0,76	0,38
Genotipo Paraoxonasa 1	0,79	0,37
Genotipo Proteína C reactiva	1,22	0,26
Genotipo Interleucina-6	1,61	0,20
Genotipo Receptor de la melatonina 1A	0,49	0,48

### 1.6. Distribuciones de frecuencias de los genotipos en los grupos de estudio

En la Tabla 1.6 se expone la distribución de frecuencias de los genotipos de la fosfolipasa A2-IIa, sCD40L, MPO, MMP-9, PON 1, PCR, IL-6 y del receptor de la Mel 1A entre ambos grupos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de la mayoría de los polimorfismos estudiados entre casos y controles. Concretamente, los genotipos más frecuentes en el grupo de los casos, comparado con los controles, fueron: el homocigoto GG del sCD40L (5,8% vs 2,4%) y CC de la MMP-9 (6,5% vs 2,5%), el heterocigoto CG de la PCR (5,8% vs 1,8%), el homocigoto GG de la IL-6 (6,9% vs 2,9%) y el heterocigoto CT del receptor Mel 1A (4,5% vs 1,3%).

**Tabla 1.6**

	Controles	Casos	p
rs1774131			
Genotipo Fosfolipasa A2-IIa (655 T/C)—n (%)			
AA	143 (26%)	145 (26,4)	
AG	93 (16,9)	129 (23,5)	
GG	14 (2,5)	26 (4,7)	
Total	250	300	0,08
rs3092952			
Genotipo Soluble CD40 Ligando (-3459 A/G)—n (%)			
AA	148 (27,5)	153 (28,4)	
AG	81 (15)	113 (21)	
GG	13 (2,4)	31 (5,8)	
Total	242	297	0,02

Genotipo Mieloperoxidasa (-463 G/A)—n (%)			
GG	214 (38,9)	259 (47,1)	
GT	36 (6,5)	41 (7,5)	
Total	250	300	0,80
rs17576			
Genotipo Matriz metaloproteinasa-9 (R279Q)—n (%)			
TT	123 (22,4)	131 (23,8)	
CT	113 (20,5)	133 (24,2)	
CC	14 (2,5)	36 (6,5)	
Total	250	300	0,02
Rs662			
Genotipo Paraoxonasa 1 (Q192R)—n (%)			
AA	124 (22,5)	143 (26)	
AG	104 (18,9)	122(22,2)	
GG	22 (4)	35 (6,4)	
Total	250	300	0,54
rs1800947			
Genotipo Proteína C reactiva (1059G/C)—n (%)			
GG	239 (43,5)	267 (48,5)	
CG	10 (1,8)	32 (5,8)	
CC	1 (0,2)	1 (0,2)	
Total	250	300	0,01



rs1800795			
Genotipo Interleucina-6 (-174G/C)—n (%)			
CC	140 (25,5)	139 (25,3)	
CG	94 (17,1)	122 (22,2)	
GG	16 (2,9)	38 (6,9)	
Total	250	299	0,01
rs28383653			
Genotipo Receptor de la MEL 1A (G166E)—n (%)			
CC	243 (44,2)	275 (50)	
CT	7 (1,3)	25 (4,5)	
Total	250	300	0,006

## 2) ANÁLISIS MULTIVARIADO

### 2.1. Comparación de proporciones de los SNPs entre los casos para cada factor de riesgo cardiovascular

Se comparó la proporción de polimorfismos favorables y desfavorables entre los casos, controlando por diferentes variables clínicas, como la diabetes mellitus, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo, vasculopatía periférica, y enfermedad arterial coronaria previa.

En el caso del sCD40L, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de polimorfismos favorables y desfavorables entre los casos, controlando por cada uno de los factores de riesgo cardiovasculares mencionados.

Genotipo		SNPs favorables	SNPs desfavorables	p
Soluble CD40 ligando (-3459 A/G) (rs3092952)		AA/AG (n =153)	GG (n=31)	
	<i>Variables clínicas</i> —n (%)			
	Diabetes mellitus	55 (36)	13 (42)	0,50
	Hipercolesterolemia	75 (49)	12 (39)	0,66
	HTA	81 (53)	15 (48)	0,60
	Tabaquismo	68 (44)	12 (39)	0,27
	Vasculopatía periférica	23 (15)	2 (6)	0,36
	EAC previa	29 (19)	5 (16)	0,74

Sin embargo, en el caso de la PCR, se observó una mayor proporción de polimorfismos favorables en los pacientes fumadores.

Genotipo		SNPs favorables	SNPs desfavorables	p
Proteína C reactiva (1059G/C) (rs1800947)		GG (n=267)	CG/CC (n=32)	
	<i>Variables clínicas</i> —n (%)			
	Diabetes	97 (36)	14 (44)	0,30
	Hipercolesterolemia	126 (47)	15 (47)	0,57
	HTA	144 (54)	18 (56)	0,63
	Tabaquismo	115 (43)	6 (19)	0,02
	Vasculopatía periférica	32 (12)	4 (12)	0,93
	EAC previa	58 (22)	3 (10)	0,24

En cuanto a la IL-6, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre los polimorfismos favorables y desfavorables, controlando por los diferentes factores de riesgo cardiovasculares.

Genotipo		SNPs favorables	SNPs desfavorables	p
Interleucina-6 (-174G/C) (rs1800795)		CC/CG (n=139)	GG (n=38)	
	<i>Variables clínicas</i> —n (%)			
	Diabetes	51 (37)	17 (45)	0,66
	Hipercolesterolemia	69 (50)	39 (50)	0,62
	HTA	75 (54)	24 (63)	0,46
	Tabaquismo	53 (38)	19 (50)	0,35
	Vasculopatía periférica	20 (14)	2 (5)	0,46
	EAC previa	29 (21)	9 (24)	0,19

En lo que respecta al polimorfismo desfavorable de la MMP-9, fue significativamente más frecuente en los pacientes diabéticos e hipertensos, mientras que para el resto de las variables clínicas analizadas no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Genotipo		SNPs favorables	SNPs desfavorables	p
MMP-9 (R279Q) (rs17576)		TT/CT (n=131)	CC (n=36)	
	<i>Variables clínicas—n (%)</i>			
	Diabetes	37 (28)	17 (47)	0,01
	Hipercolesterolemia	65 (50)	15 (42)	0,68
	HTA	60 (46)	25 (69)	0,01
	Tabaquismo	58 (44)	15 (42)	0,39
	Vasculopatía periférica	19 (14)	4 (11)	0,49
	EAC previa	30 (23)	9 (25)	0,38

Por último, los polimorfismos del Mel 1A mostraron diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la proporción de polimorfismos desfavorables, en los pacientes con vasculopatía periférica.

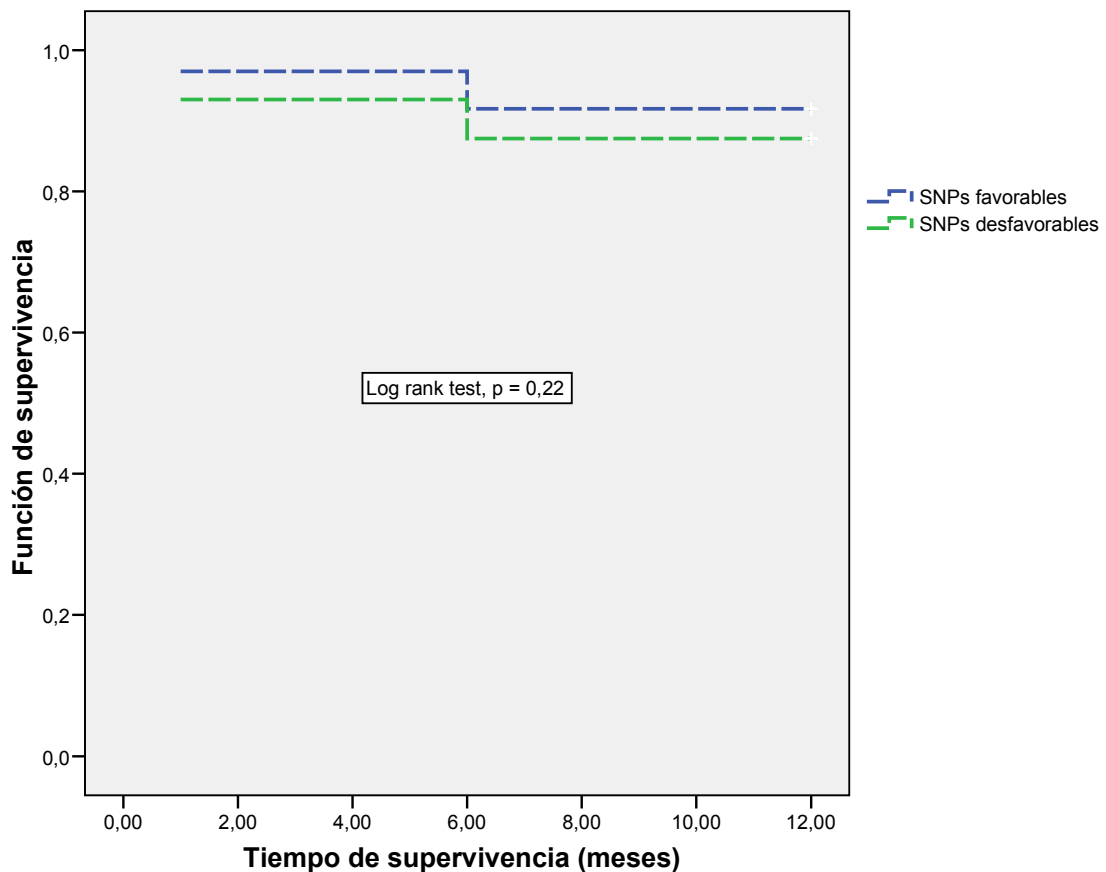
Genotipo		SNPs favorables	SNPs desfavorables	p
MEL1AG (G166E) (rs28383653)		CC (n=275)	CT (n=25)	
	<i>Variables clínicas—n (%)</i>			
	Diabetes	103 (37)	9 (36)	0,88
	Hipercolesterolemia	128 (46)	14 (56)	0,36
	HTA	145 (53)	18 (72)	0,06
	Tabaquismo	108 (39)	13 (52)	0,21
	Vasculopatía periférica	29 (10)	7 (28)	0,01
	EAC previa	53 (19)	8 (32)	0,13

**2.2. Distribuciones de frecuencias para casos y controles de la combinación sinérgica de los genotipos desfavorables de los SNPs del receptor de la melatonina con los mediadores inflamatorios**

Se analizó la distribución de la combinación sinérgica de los genotipos desfavorables del receptor de la melatonina 1A y de los mediadores inflamatorios (MMP-9, IL-6, PCR y sCD40L) entre la población de estudio, comprobándose que la prevalencia de la combinación desfavorable era significativamente más frecuente en los casos que en los controles.

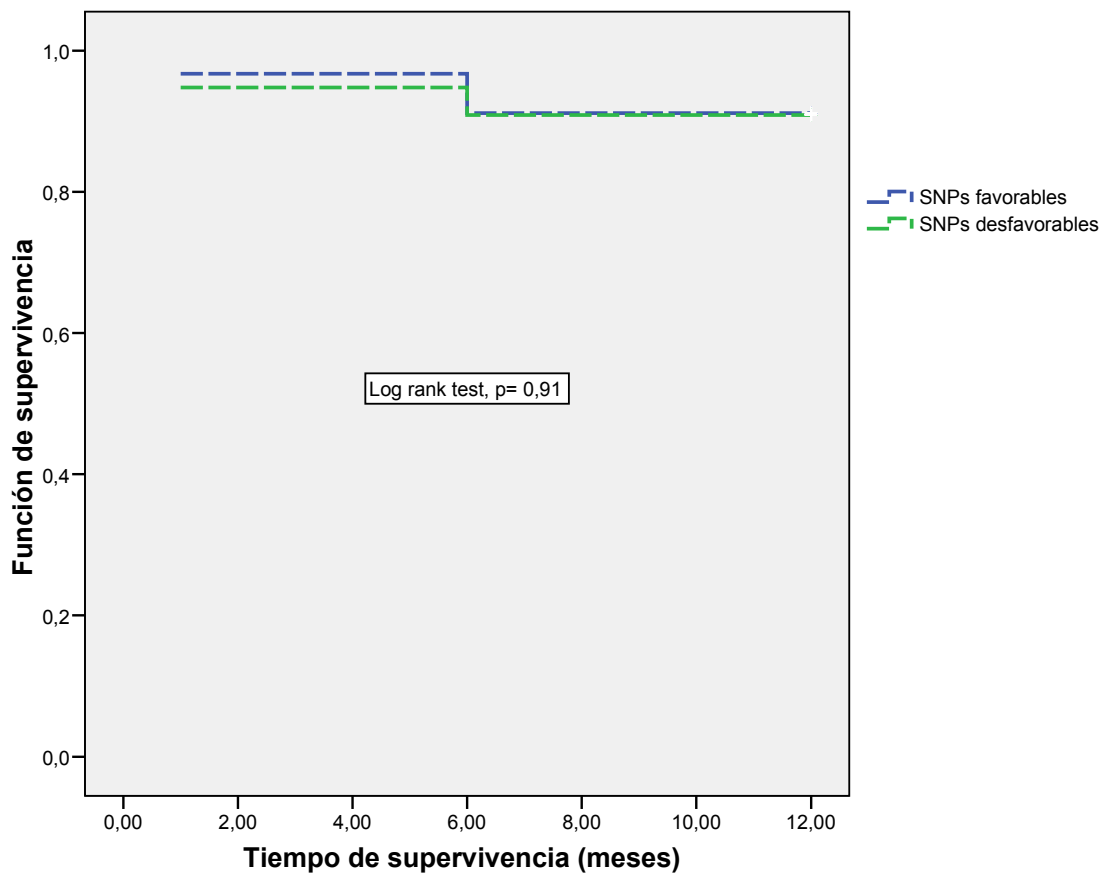
Combinación de Genotipos—n (%)	Controles	Casos	P
MEL (G166E) (rs28383653) + MMP-9 (R279Q) (rs17576)	21 (8)	58 (19)	<0,001
MEL (G166E) (rs28383653) + IL-6 (-174G/C) (rs1800795)	16 (6)	38 (13)	0,01
MEL (G166E) (rs28383653) + PCR (1059G/C) (rs1800947)	18 (7)	58 (19)	<0,001
MEL (G166E) (rs28383653) + CD40L (-3459 A/G) (rs3092952)	20 (8)	53 (18)	0,001

Asimismo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en las tasas de mortalidad a los 12 meses entre los polimorfismos favorables y desfavorables de la combinación sinérgica entre los mediadores inflamatorios y del receptor de la melatonina 1 A en la población de estudio (Figuras 3-6).

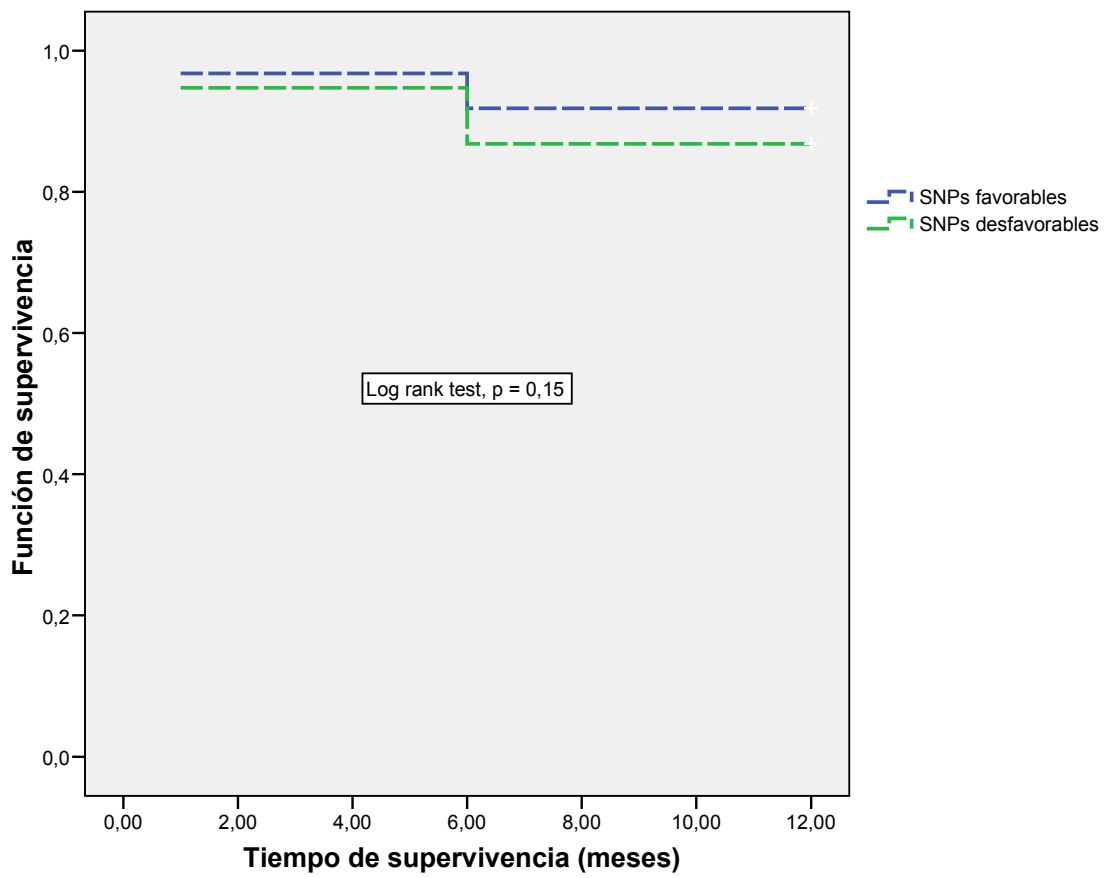


**Figura 3.-** Supervivencia en los grupos del estudio con relación a la combinación sinérgica de los SNPs del receptor de la melatonina con la molécula soluble CD40 ligando.

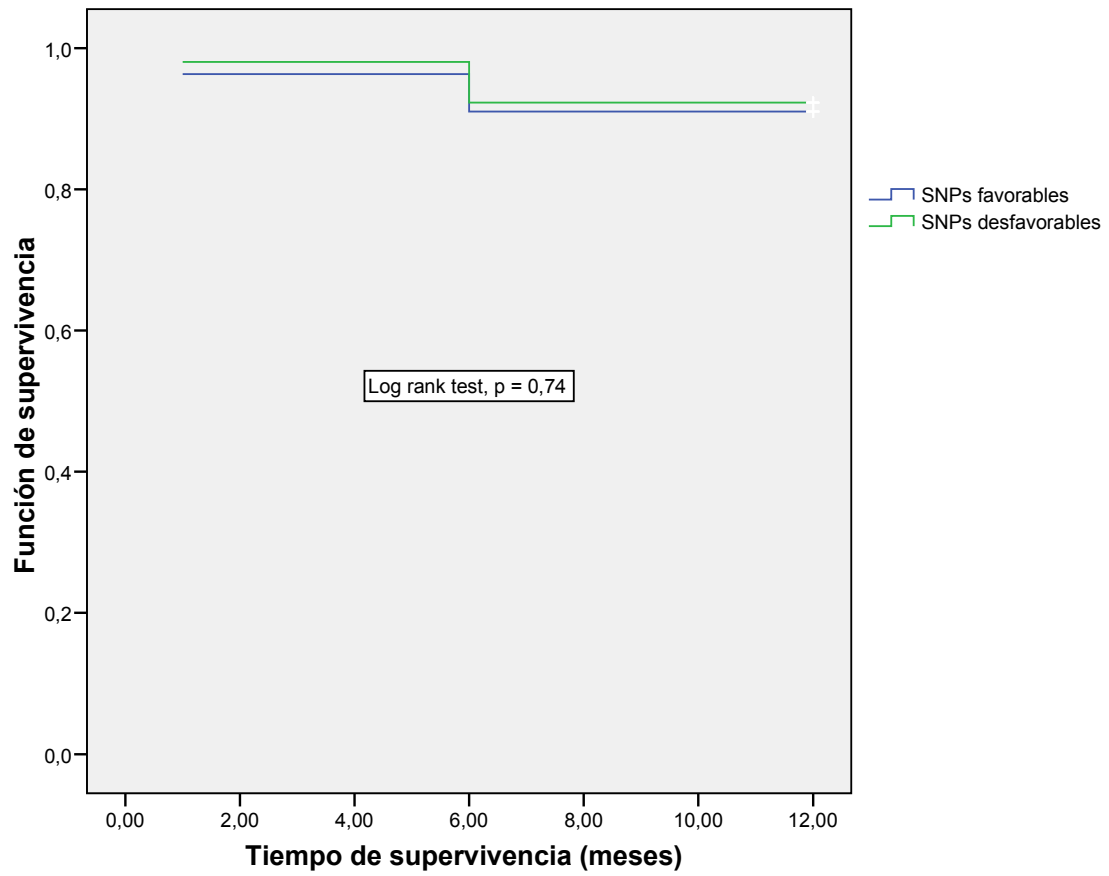




**Figura 4.-** Supervivencia en los grupos del estudio con relación a la combinación sinérgica de los SNPs del receptor de la melatonina con la molécula matriz metaloproteinasa-9.



**Figura 5.-** Supervivencia en los grupos del estudio con relación a la combinación sinérgica de los SNPs del receptor de la melatonina con la molécula proteína C reactiva.



**Figura 6.-** Supervivencia en los grupos del estudio con relación a la combinación sinérgica de los SNPs del receptor de la melatonina con la molécula interleucina-6.

## **DISCUSIÓN**

La EAC es un ejemplo de enfermedad compleja/multifactorial que presenta una fuerte agregación familiar demostrada en diversos estudios epidemiológicos. Este hecho apunta a un claro componente genético de la enfermedad, que constituye un factor de riesgo independiente de los factores de riesgo clásicos y cuya influencia se ha cuantificado en un 40-55% (Nora et al, 1980; Wienke et al, 2001; Zdravkovic et al, 2002). No obstante, el efecto neto del componente genético sobre la incidencia de la CI dependerá de la interacción con los diversos factores medioambientales, variables de una población a otra.

De ahí que uno de los grandes retos en los últimos años haya sido el estudio de la arquitectura genética de la CI, es decir, la identificación de los genes y sus variantes causales de la enfermedad. Para ello, y desde un punto de vista metodológico, existen dos tipos de aproximaciones: los estudios de ligamiento, que analizan si la transmisión de determinados genes preseleccionados se relaciona con la aparición de la enfermedad, requiriendo para ello la participación de individuos afectados y no afectados de una misma familia; y los estudios de asociación clásicos, que, basándose en la etiopatogenia de la enfermedad, seleccionan uno o varios genes “candidatos”, y, mediante un diseño de casos y controles o de cohortes, comparan las diferencias en la frecuencia de genotipos entre ambos grupos. De esta forma, aquellos genotipos más frecuentes en los casos, presentarían una asociación causal con la enfermedad (Sabatine et al, 2006; Elosua et al, 2009). Sin embargo, ambos tipos de estudios han tenido poco éxito en enfermedades complejas como la CI, fundamentalmente debido a una falta de reproducibilidad de los resultados (Hirschhorn et al, 2002), que obedece, entre otras causas, a la gran heterogeneidad genética y fenotípica de la EAC. Por ello, y para obtener asociaciones sólidas y reproducibles, resulta de gran importancia la selección adecuada de los genes candidatos, así como la definición exacta del fenotipo estudiado.

En este sentido, el hecho de que la aterosclerosis sea considerada una enfermedad inflamatoria sistémica, ha dado lugar a la búsqueda de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, que de alguna forma puedan jugar un papel en el desarrollo y la progresión de la enfermedad. Asimismo, la melatonina, cuya relación con la EAC ha sido demostrada en diversos estudios clínicos en humanos (Brugger et al, 1995; Sakotnik et al, 1999; Altun et al, 2002; Girotti et al, 2003), constituye otra candidata interesante, ya que a través de sus propiedades inmunomoduladoras, antioxidantes y antiinflamatorias, parece regular, al menos en parte, los diferentes mediadores inflamatorios implicados en la patogenia de la aterosclerosis. Por lo tanto, la identificación de nuevas variantes genéticas, tanto de diversos mediadores inflamatorios como de la melatonina y sus receptores, podría ampliar nuestro conocimiento acerca de la modulación/determinación genética del riesgo aterosclerótico, así como explicar, al menos en parte, las diferencias geográficas encontradas en la incidencia de la enfermedad.

En nuestro estudio, basado en un diseño de casos y controles, observamos diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de los siguientes polimorfismos de genes inflamatorios: -3459 A/G del sCD40L; R279Q de la MMP-9; +1059 G/C de la PCR; -174 G/C de la IL-6 y G166E del receptor de la melatonina MEL 1A. Concretamente, los genotipos más frecuentes en los casos, comparado con los controles, fueron: el homocigoto GG del sCD40L y CC de la MMP-9, el heterocigoto CG de la PCR, el homocigoto GG de la IL-6 y el heterocigoto CT del receptor MEL 1A.

Tras el análisis multivariado, la proporción de polimorfismos favorables y desfavorables entre los casos mostró diferencias estadísticamente significativas en el caso de la PCR, la MMP-9 y el receptor MEL 1A. Así, observamos una mayor proporción del genotipo favorable GG de la PCR en los sujetos fumadores. Por el contrario, hubo una mayor

proporción de genotipos desfavorables de la MMP-9 (CC) y del receptor MEL 1A (CT) en los pacientes diabéticos e hipertensos y en los pacientes con vasculopatía periférica, respectivamente.

A continuación comentaremos de forma más detallada los resultados correspondientes a cada uno de los polimorfismos que mostraron diferencias en su prevalencia entre ambos grupos de nuestra población:

1) POLIMORFISMO +1059 G/C DE LA PCR (véase Tabla 1.6)

Probablemente, de todos los mediadores inflamatorios analizados, la PCR sea aquel con mayor número de polimorfismos genéticos identificados hasta la fecha.

Este hecho se debe a que numerosos estudios epidemiológicos han observado una clara asociación entre niveles plasmáticos elevados de PCR y un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Danesh et al, 2004; Scirica, Morrow, 2006; Ridker, 2007). Sin embargo, no hay que olvidar que asociación estadística no es sinónimo de causalidad, ya que la presencia de variables confusoras ó de causalidad inversa pueden justificar la asociación encontrada. De hecho, los niveles basales de PCR son especialmente susceptibles a la influencia de variables confusoras, ya que múltiples factores de riesgo cardiovasculares (tabaquismo, hipertensión, diabetes, obesidad etc.) pueden contribuir a su elevación (Kushner et al, 2006). Por otro lado, el concepto de causalidad inversa hace referencia a la posibilidad de que sea la propia enfermedad, en este caso la aterosclerosis, la que produzca un aumento de los niveles plasmáticos de PCR.

Por este motivo, en un intento de aclarar si la PCR es simplemente un marcador de la aterosclerosis subyacente ó, si por el contrario, es un factor causal implicado en la patogenia de la misma (Pepys, 2005; Scirica, Morrow, 2006), numerosos grupos han investigado la existencia de polimorfismos genéticos que, a través de un aumento

crónico de los niveles basales de PCR, puedan conllevar un mayor riesgo cardiovascular a largo plazo. No obstante, la mayoría de ellos, salvo algunas excepciones (Miller et al, 2005; Szalai et al, 2005; Balistreri et al, 2006; Lange et al, 2006), no ha podido confirmar tal asociación (Zee, Ridker, 2002; Kovacs et al, 2005; Kardys et al, 2006; Kathiresan et al, 2006; Wang et al, 2006; Zacho et al, 2008).

En nuestro estudio no determinamos los niveles plasmáticos de PCR. Sin embargo, el polimorfismo analizado (+1059 G/C) ha demostrado una buena, aunque variable, correlación con los niveles plasmáticos de PCR en diversos estudios, mientras que su asociación con los diferentes fenotipos de enfermedad cardiovascular ha ofrecido resultados discordantes (Zee, Ridker, 2002; Davey Smith et al, 2005; Balistreri et al, 2006; Danik et al, 2006; Morita et al, 2006). Con respecto al efecto variable sobre los niveles plasmáticos de PCR, puede ser debido a que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo funcional, ya sea del propio gen de la PCR ó de un gen cercano implicado en la expresión de la misma, que difiera entre las poblaciones estudiadas. Así, en tres de los estudios mencionados (Zee, Ridker, 2002; Davey Smith et al, 2005; Danik et al, 2006), los portadores del alelo C (menos frecuente) tenían niveles plasmáticos claramente inferiores a los portadores del alelo G. Por el contrario, Balistreri *et al.* encontraron unos niveles plasmáticos de PCR más elevados en los portadores del alelo C, así como una mayor prevalencia de este alelo en los pacientes con IAM comparado con controles sanos (Balistreri et al, 2006).

Este estudio se realizó en una población caucasiana homogénea en la isla de Sicilia, por lo que podría existir algún efecto étnico o racial que explicara las diferentes frecuencias alélicas y concentraciones plasmáticas encontradas. De hecho, una de las principales características de la distribución de los polimorfismos genéticos de la PCR, es su marcada diferencia interracial (Crawford et al, 2006). En este sentido y tomando como



ejemplo el SNP +1059 G/C, Hegele et al. comunicaron la presencia del alelo C, que es el menos frecuente, en individuos de origen caucásico, pero no en inuits (Hegele et al, 2001). Siguiendo este planteamiento, cabría pensar que la diferencia interracial en la distribución alélica podría conllevar a su vez una diferencia interracial en el riesgo de enfermarse, justificándose de esta forma las diferentes asociaciones entre polimorfismos y enfermedad observadas de una población a otra.

En nuestro estudio, realizado en individuos de origen canario, observamos que los genotipos más frecuentes en los casos eran aquéllos que incluían el alelo C (CC y CG). Además, al igual que Balistreri et al., tras el análisis multivariado no observamos diferencias estadísticamente significativas en la proporción de polimorfismos favorables/desfavorables entre los pacientes con IAM, salvo en los fumadores, que presentaron una mayor proporción del polimorfismo favorable (GG). Este hallazgo refleja el hecho de que, en nuestra población, el tabaco es un factor de riesgo más potente que el polimorfismo genético, ya que se asocia a la enfermedad incluso en presencia del polimorfismo favorable. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la proporción de pacientes portadores de polimorfismos desfavorables comparada con la de los desfavorables fue tan sólo de un 30% aproximadamente (33 vs 267 pacientes), podemos concluir que la presencia del alelo de riesgo en nuestra población probablemente sólo sea un factor de riesgo más para el desarrollo de una enfermedad multifactorial, en la que la interacción con los factores medioambientales juega un papel decisivo.

## 2) POLIMORFISMO -174 G/C DE LA IL-6 (véase Tabla 1.6)

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que, debido a sus efectos proinflamatorios, se ha implicado en la patogenia de la aterosclerosis (Woods et al, 2000; Lindmark et al, 2001). Por este motivo, se han tratado de identificar polimorfismos funcionales del gen

de la IL-6, es decir, relacionados con los niveles plasmáticos de la citoquina y, por tanto, potenciales moduladores del riesgo ateroesclerótico.

Entre ellos, el más estudiado es el polimorfismo bialélico -174 G/C, localizado en el promotor del gen, y que ha demostrado su asociación con los niveles circulantes de IL-6 tanto *in vitro* como *in vivo* (Terry et al, 2000; Bennermo et al, 2004). Es por ello que numerosos grupos han estudiado su prevalencia en pacientes con IAM, obteniendo resultados discordantes en cuanto a su asociación con la enfermedad (Burzotta et al, 2001; Georges et al, 2001; Jenny et al, 2002; Nauck et al, 2002; Yamada et al, 2002; Bennermo et al, 2004; Kelberman et al, 2004; Latkovskis et al, 2004; Lieb et al, 2004; Antonicelli et al, 2005a, b).

En vista de la controversia existente, decidimos analizar dicho polimorfismo en nuestra población de estudio, observando una mayor prevalencia del genotipo GG en los pacientes con IAM. Tras el análisis multivariado, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de polimorfismos favorables (CC y CG) y desfavorables (GG) entre los casos.

Este hallazgo está en concordancia con Antonicelli et al., que comunicaron el valor pronóstico de dicho genotipo como predictor de muerte cardiovascular en pacientes varones durante el primer año tras sufrir un síndrome coronario agudo (Antonicelli et al, 2005a, b). El mecanismo fisiopatológico implicado en dicha asociación se postula que sea un aumento de los niveles plasmáticos de IL-6 en los portadores del alelo G, que conllevaría un mayor grado de inflamación y, en consecuencia, un mayor riesgo de desarrollar complicaciones ateroescleróticas como el IAM (Giacconi et al, 2004). Sin embargo, no existe unanimidad en cuanto a la asociación del alelo G con el riesgo de IAM. De hecho, dos grupos diferentes comunicaron la asociación del alelo C con un

aumento ligero a moderado del riesgo de IAM (Georges et al, 2001; Jenny et al, 2002), que sin embargo parece variar en función de las regiones geográficas estudiadas (Kelberman et al, 2004). Otros grupos por el contrario no encontraron asociación alguna entre dicho polimorfismo y el riesgo de IAM (Burzotta et al, 2001; Nauck et al, 2002; Yamada et al, 2002; Bennermo et al, 2004; Latkovskis et al, 2004; Lieb et al, 2004). Por último, tampoco queda claro cuál de los dos alelos (C ó G) se asocia con niveles de IL-6 más elevados, ya que los estudios realizados no ofrecen resultados concluyentes (Fishman et al, 1998; Rauramaa et al, 2000; Brull et al, 2001; Jones et al, 2001; Margaglione et al, 2001).

Las razones de estas discrepancias pueden ser muy diversas y obedecer a múltiples variables confusoras. En primer lugar, razones étnicas que determinen diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas entre las poblaciones. Por otro lado, diferencias en el diseño de los estudios, el tamaño muestral y la metodología, así como la influencia de factores medioambientales, que puede ser muy variable de una población a otra (Franceschi et al, 2005). Y por último, la posibilidad de la existencia de interacciones entre diferentes genes inflamatorios, con repercusiones funcionales sobre el desarrollo de la enfermedad.

En nuestra población, si bien no analizamos los niveles circulantes de IL-6, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo GG del SNP -174 G/C y la incidencia de IAM. Esta asociación puede ser debida a un aumento de los niveles plasmáticos de IL-6, que aumentaría la “carga inflamatoria” del individuo y, en consecuencia, su riesgo de enfermar. No obstante, no se puede descartar que el SNP analizado se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo que afecte la función de la IL-6 como proteína o incluso aumente la expresión de otros

genes inflamatorios, como por ejemplo el gen de la PCR, ejerciendo su efecto a través de dicha molécula (Vickers et al, 2002).

### 3) POLIMORFISMO +R279Q DE LA MMP-9 (véase Tabla 1.6)

Las matriz metaloproteinasas (MMPs) son unas enzimas proteolíticas implicadas en la degradación de la matriz extracelular de la placa aterosclerosa, volviéndola inestable y favoreciendo así su ruptura, con el consiguiente desencadenamiento de un síndrome coronario agudo (Libby, 2000). Por lo tanto, no hay duda sobre su papel en el remodelado vascular asociado a la aterosclerosis prematura y a la ruptura de la placa, efectos que son contrarrestados por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs) (Galis, Khatri, 2002).

Diversos estudios sugieren que los niveles circulantes de las MMPs dependen de la inestabilidad de la placa aterosclerótica subyacente, ya que se ha observado un claro aumento de los mismos en pacientes con síndromes coronarios agudos comparado con pacientes con angina de esfuerzo estable (Kai et al, 1998; Zeng et al, 2005). Estos hallazgos, junto con la evidencia de que las MMPs se expresan en la superficie de las placas ateroscleróticas (Galis et al, 1994; Orbe et al, 2003), apuntan a que las placas inestables son su principal fuente de producción.

Por otro lado, también se ha analizado la asociación entre polimorfismos genéticos de las MMPs y la incidencia de enfermedad cardiovascular, si bien es verdad que la mayoría de los grupos sólo han valorado genes ó polimorfismos aislados (Zhang et al, 1999; Wang et al, 2001; Cho et al, 2002).

En nuestro estudio analizamos el polimorfismo +R279Q del gen de la MMP-9, el segundo gen más estudiado después de la MMP-3 o estromalisina I. El polimorfismo analizado se localiza en el exón 6 y se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el

SNP C1562T del promotor. Observamos que el genotipo desfavorable CC es el más frecuente en los casos, y tras el análisis multivariado, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes diabéticos e hipertensos. Por lo tanto, cabe pensar que el efecto negativo del genotipo desfavorable en nuestros pacientes se manifieste sobre todo en los diabéticos e hipertensos.

La asociación del polimorfismo -1562 C/T con la EAC ha sido analizada en diversos estudios, siempre con resultados diferentes. Zhang et al. fueron los primeros en demostrar que el alelo T aumentaba la actividad transcripcional del promotor, por lo que sus portadores tenían niveles de MMP-9 más elevados, así como una EAC más severa, sin encontrar asociación con el IAM (Zhang et al, 1999). Posteriormente, otros grupos confirmaron su asociación con la EAC (Cho et al, 2002; Morgan et al, 2003), mientras que un metaanálisis más reciente de cinco estudios no encontró asociación entre el alelo T y la presencia de EAC documentada angiográficamente (Abilleira et al, 2006).

Se sabe que el polimorfismo -1562 C/T se encuentra en desequilibrio de ligamiento con los SNPs +R279Q y +6C/T. De hecho, Morgan *et al.* realizaron un análisis conjunto de los tres polimorfismos en 1510 pacientes consecutivos sometidos a coronariografía, observando que los portadores del alelo T del SNP -1562 C/T tenían una mayor prevalencia de EAC que los portadores del alelo C. Asimismo, en el análisis de los haplotipos, demostraron que el haplotipo C-G-C (-1562C, +279Q y +6C) se asociaba a un efecto protector frente a la aterosclerosis, así como a una EAC menos severa (Morgan et al, 2003). Blankenberg et al. por su parte, no observaron una asociación significativa entre los polimorfismos analizados (1562 C/T y R279Q) y la mortalidad cardiovascular, pero sí entre el alelo Q del SNP +R279Q y la incidencia de eventos cardiovasculares en pacientes con angina estable (Blankenberg et al, 2003).

Estos hallazgos en principio no están en concordancia con los nuestros, ya que el genotipo desfavorable en nuestra población fue el CC (del SNP 1562 C/T), que, según los estudios, debería tener un efecto protector frente a la aterosclerosis. Sólo Blankenberg *et al.* encontraron una asociación entre el alelo Q del SNP R279Q con mayores niveles de MMP-9 y con un peor pronóstico cardiovascular. Sin embargo, dicho estudio se realizó en pacientes con EAC documentada, de tal forma que no es comparable a nuestra población de estudio con casos incidentes.

En el mayor estudio de casos y controles realizado con polimorfismos de MMPs y que incluyó a más de 5000 pacientes, Horne et al. demostraron que el haplotipo CT/RQ de la MMP-9 se asociaba a un mayor riesgo de IAM comparado con el CC/RR (OR 1.25;  $p = 0.007$ ), manteniéndose dicha asociación tras el análisis multivariado e incluso reforzándose en los pacientes no diabéticos, mientras que en los diabéticos el efecto del genotipo desfavorable fue más débil (Horne et al, 2007). Esto probablemente implique que la diabetes es un factor de riesgo más potente para el desarrollo de la enfermedad que las diferentes combinaciones genotípicas de MMPs analizadas.

Por último, y en un intento de explicar la falta de resultados concordantes entre los diferentes estudios, hay que tener en cuenta la importancia de una adecuada selección y definición del fenotipo clínico en función del gen analizado, ya que los genes implicados en la ruptura de la placa no serán los mismos que los genes que inician el proceso aterosclerótico.

En lo que respecta a nuestro estudio, a pesar de haber analizado polimorfismos de la MMP-9 por su relación con la incidencia de eventos cardiovasculares agudos, encontramos genotipos desfavorables diferentes a los demás autores.

Esto hace pensar en la existencia de una gran variabilidad genética y alélica entre las diferentes MMPs, que sólo se podrá valorar adecuadamente realizando análisis de múltiples SNPs, ampliando suficientemente el tamaño muestral y seleccionando adecuadamente la población de estudio, intentando controlar en la medida de lo posible la influencia de factores étnicos y medioambientales.

#### 4) POLIMORFISMO -3459 A/G DEL sCD40L (véase Tabla 1.6)

El CD40 se expresa en una gran variedad de células inmunes a nivel de las lesiones ateroscleróticas, mientras que el CD40L se expresa predominantemente en las células T CD4+ y en las plaquetas activadas (Henn et al, 1998; Szabolcs et al, 2000; Buchner et al, 2003; Otterdal et al, 2004). La liberación del CD40L ligado a membrana da lugar a su forma soluble, el sCD40L, que está presente en el torrente circulatorio y cuya principal fuente son las plaquetas activadas (Henn et al, 1998).

El sistema CD40-CD40L juega un papel fundamental en la transformación de placas estables en inestables, a través de la activación de diversos mediadores inflamatorios y procoagulantes (Schonbeck , Libby, 2001). Asimismo, la presencia de niveles elevados de sCD40L al ingreso, se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes con síndrome coronario agudo (Heeschen et al, 2003; Varo et al, 2003).

En nuestro estudio analizamos la prevalencia entre casos y controles del polimorfismo -3459 A/G del CD40L, localizado en el brazo largo del cromosoma X (q26.3-q27.1). Dicho polimorfismo también fue analizado por Malärstig et al. en una muestra de 2359 pacientes con SCASEST, ya que, además de ser el más frecuente de los 6 SNPs estudiados, es el que mejor se correlaciona con los niveles de sCD40L. Sin embargo, a pesar de que los portadores del alelo G tenían unos niveles de sCD40L al ingreso un

10% superiores, no se observó un mayor riesgo de muerte ó IAM asociado a dicho alelo.

Con respecto a la distribución genotípica de dicho polimorfismo en nuestra población de estudio, observamos una mayor frecuencia del genotipo desfavorable GG entre los casos comparado con los controles (5,8% vs 2,4%), mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de polimorfismos favorables y desfavorables entre los casos tras el análisis multivariado; este hallazgo sugiere, al igual que Malärstig *et al.*, que la repercusión de dicho polimorfismo es insignificante (Malärstig *et al.*, 2006).

#### 5) POLIMORFISMO G166E DEL RECEPTOR MEL 1A (véase Tabla 1.6)

En humanos, sólo se han clonado los receptores Mel 1a (MT1) y Mel 1b (MT2), que pertenecen a la familia de receptores de la membrana celular y se expresan en múltiples órganos y tejidos, entre los que se encuentra el sistema cardiovascular. Concretamente, se ha demostrado su expresión en la pared ventricular, arterias coronarias, aorta y arterias periféricas. Sin embargo, sus efectos a estos niveles permanecen en gran parte desconocidos y se basan en meras hipótesis derivadas de modelos animales.

En vista de los efectos cardioprotectores de la melatonina, en parte mediados por sus receptores, parece lógico pensar en la existencia de polimorfismos genéticos de los mismos que, de alguna forma, modulen el riesgo ateroscлерótico en humanos (Cuzzocrea, Reiter, 2001; Reiter, Tan, 2003).

En los últimos años se han identificado varios polimorfismos genéticos, tanto del MT1 como del MT2, pero en ningún caso se ha investigado su asociación con la EAC y sus diferentes manifestaciones clínicas. Sin embargo, diversos grupos han analizado el efecto de determinados polimorfismos del MT2 sobre la homeostasis de la glucosa,



observando un efecto modulador de la glucemia en ayunas, así como una alteración de la secreción de insulina, que finalmente conlleva un mayor riesgo de DM2 (Bouatia-Naji et al, 2009; Lyssenko et al, 2009; Prokopenko et al, 2009). En cierto modo, al influir en las glucemias plasmáticas y predisponer al desarrollo de DM2, modificarían el riesgo cardiovascular del individuo, aumentando su probabilidad de desarrollar diferentes complicaciones ateroscleróticas.

En nuestro estudio analizamos el polimorfismo G166E del MT1, encontrando una mayor frecuencia del genotipo CT en los casos. Tras el análisis multivariado, observamos una mayor proporción del polimorfismo desfavorable en los pacientes con vasculopatía periférica. Por lo tanto, en este subgrupo de pacientes existirá un efecto aditivo/sinérgico entre el polimorfismo desfavorable y la enfermedad vascular. Desde un punto de vista fisiopatológico, y basándonos en la evidencia procedente de los estudios en animales (Masana et al, 2002), la melatonina podría ejercer un efecto vasoconstrictor a través de los receptores MT1 de la pared vascular, que agravaría la situación clínica en sujetos con vasculopatía periférica y aumentaría la incidencia de complicaciones cardiovasculares. Del mismo modo, en nuestro estudio también observamos que la prevalencia de la combinación sinérgica de los genotipos desfavorables del receptor MEL 1A y de los mediadores inflamatorios era significativamente mayor en los casos, si bien estos hallazgos no se tradujeron en diferencias significativas en las tasas de supervivencia a los 12 meses entre ambos grupos.

Al no existir evidencia alguna en la literatura de una relación fisiopatológica entre los receptores de la melatonina y la incidencia de EAC, nuestras interpretaciones de los resultados encontrados son meras hipótesis, que deberán confirmarse en estudios futuros

encaminados a esclarecer el papel de la combinación de estos polimorfismos en la aterosclerosis.

Tabla comparativa de nuestros resultados con estudios previos en EAC

POLIMORFISMO (SNP)	PROTEÍNA CODIFICADA	GENOTIPO DESFAVORABLE	ESTUDIOS CON ASOCIACIÓN POSITIVA	ESTUDIOS SIN ASOCIACIÓN
+1059 G/C	PCR	CG/CC	Balistreri et al (2006)-alelo C; Morita et al (2006)	Zee, Ridker (2002); Davey Smith et al, 2005; Danik et al (2006)
- 174 G/C	IL-6	GG	Antonicelli et al (2005a, b)-alelo G; Jenny et al (2002)-alelo C; Georges et al (2001)-alelo C; Kelberman et al (2004)-alelo C	Burzotta et al (2001); Yamada et al (2002); Nauck et al (2002); Bennermo et al (2004); Latkovskis et al (2004); Lieb et al (2004)
+ R279Q/-1562 C/T	MMP-9	CC	Zhang et al (1999)-alelo T; Morgan et al (2003)-alelo T; Cho et al (2002)-alelo T; Blankenberg et al (2003)-alelo Q; Horne et al (2007)-haplotipo CT/RQ	Abilleira et al (2006)-metaanálisis; Hlatky et al (2007)-SNP MMP9.7
- 3459 A/G	sCD40L	GG		Malärstig et al (2006)-alelo G
G166E	Receptor Mel 1A	CT	-	-

## **LIMITACIONES**

Nuestro estudio, basado en el diseño de los estudios de asociación integral del genoma con un grupo de casos y controles, presenta algunas limitaciones, que podemos esquematizar como sigue:

1º) Selección de genes candidatos:

Analizamos diferentes genes inflamatorios, por la relación existente entre inflamación y aterosclerosis, sin olvidar que la EAC presenta una gran heterogeneidad genética, en la que influyen genes relacionados con la función endotelial, trombosis, fibrinólisis y el metabolismo lipídico. Como “novedad”, además analizamos el gen del receptor de la melatonina 1A, por el desconocimiento que existe acerca de sus funciones a nivel del sistema cardiovascular humano.

En un futuro sería interesante analizar de forma simultánea no sólo varios genes implicados en la patogenia de la enfermedad y relacionados funcionalmente entre sí, sino también múltiples SNPs de cada uno de ellos ó haplotipos (es decir, SNPs que flanquean la variante causal de la enfermedad), aumentando así la posibilidad de encontrar asociaciones genéticas. Ello requerirá, sin embargo, muestras más grandes, así como una adecuada selección de genes de diferentes sistemas candidatos.

2º) Selección de la población de estudio:

Los sujetos incluidos en el presente estudio son todos de origen canario, con un mínimo de tres generaciones previas de canarios. Por lo tanto, a pesar de que se trata de una población étnicamente homogénea, los resultados encontrados pueden no ser aplicables a otras poblaciones.

### 3º) Definición del fenotipo clínico:

La EAC se caracteriza por una gran heterogeneidad fenotípica, por lo que resulta de crucial importancia definir adecuadamente el fenotipo clínico en función de los genes analizados, para detectar asociaciones genéticas y poder realizar comparaciones con otros estudios. En nuestro caso elegimos a sujetos con IAM, aunque quizás podríamos haber elegido otro “endpoint” clínico, ya que los genes inflamatorios actúan en diversas etapas del proceso aterosclerótico.

Por otro lado, el hecho de haber elegido a pacientes con IAM, podría conllevar cierto sesgo de selección, en el sentido de no haber incluido a aquéllos que fallecieron antes de llegar al hospital y que podrían ser portadores de un polimorfismo desfavorable no detectado en el análisis posterior.

### 4º) Ajuste multivariado ó control por factores de riesgo cardiovasculares convencionales:

El análisis multivariado trata de controlar la influencia de diferentes factores de confusión, como pueden ser los factores de riesgo cardiovasculares clásicos, sobre la asociación entre el polimorfismo genético y la enfermedad. En nuestro estudio controlamos por diferentes factores de riesgo cardiovasculares, siendo conscientes de la posibilidad de haber obviado algún factor desconocido que pueda influir de forma significativa sobre la asociación analizada. No obstante, ningún análisis multivariado es perfecto, ya que resulta imposible controlar todos los factores de confusión existentes, algunos de ellos desconocidos (Hingorani et al, 2006).

5º) Determinación de los niveles plasmáticos de los mediadores inflamatorios:

Al no haber determinado los niveles plasmáticos de los diferentes mediadores inflamatorios (PCR, IL-6, MMP-9 y sCD40L), desconocemos el efecto de los polimorfismos genéticos sobre los mismos. No obstante, de esta forma obviamos el efecto de variables confusoras ó de causalidad inversa, ambas circunstancias que podrían aumentar los niveles plasmáticos de los diferentes mediadores y llevarnos a interpretaciones erróneas acerca de la relación entre el gen y la enfermedad.

6º) Replicación de los resultados:

Uno de los aspectos más importantes para darle validez a un estudio, es la replicación de los resultados encontrados en una población independiente, pero comparable a la inicial. La reproducibilidad de las asociaciones significativas es la clave para su confirmación y una de las características de un buen estudio de asociación genética. En este sentido, nos deberíamos plantear dicho paso en un segundo estudio que incluya sujetos de las mismas características étnicas/geográficas y clínicas.

## **CONCLUSIONES**



1º) Existen diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas de determinados polimorfismos inflamatorios y del receptor Mel 1A entre sujetos con IAM y controles.

2º) Existen asimismo diferencias estadísticamente significativas entre determinados polimorfismos inflamatorios y del receptor Mel 1A favorables/desfavorables entre los sujetos con IAM, que persisten tras el control por los diferentes factores de riesgo cardiovasculares.

3º) La combinación sinérgica de los genotipos desfavorables del receptor Mel 1A con los mediadores inflamatorios es significativamente más frecuente en los sujetos con IAM, pero ello no conlleva una disminución de la supervivencia durante el seguimiento al cabo de 12 meses.

4º) Los resultados de nuestro estudio sugieren la existencia de diferentes polimorfismos genéticos implicados, al menos en parte, en la modulación del riesgo ateroesclerótico en humanos, cuya repercusión funcional habría que confirmarla mediante la realización de estudios de replicación, así como ampliando suficientemente el tamaño muestral y analizando múltiples SNPs de los diferentes genes candidatos en estudios sucesivos.

5º) La confirmación de la existencia de determinadas variantes genéticas que, en el contexto de un medioambiente “desfavorable”, aumentaran el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, podría llevar al desarrollo y posterior implementación de técnicas de cribaje genético en las poblaciones de alto riesgo, mejorando de esta forma las estrategias de prevención primaria y secundaria.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbate A, Bonanno E, Mauriello A, Bussani R, Biondi-Zoccai GG, Liuzzo G, et al. Widespread myocardial inflammation and infarct-related artery patency. *Circulation* 2004;110:46-50.
- Abete P, Bianco S, Calabrese C, Napoli C, Cacciatore F, Ferrara N, et al. Effects of melatonin in isolated rat papillary muscle. *FEBS Lett* 1997;412:79-85.
- Abilleira S, Bevan S, Markus HS. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet* 2006;43:897-901.
- Altun A, Yaprak M, Aktoz M, Vardar A, Betul UA, Olzbay G. Impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with cardiac syndrome X. *Neurosci Lett* 2002;327:143-145.
- Antonicelli R, Olivieri F, Cavallone L, Spazzafumo L, Bonafe M, Marchegiani F, et al. Tumor necrosis factor-alpha gene -308 G > A polymorphism is associated with ST-elevation myocardial infarction and with high plasma levels of biochemical ischemia markers. *Coronary Artery Dis* 2005a;16:489-493.
- Antonicelli R, Olivieri F, Bonafe M, Cavallone L, Spazzafumo L, Marchegiani F, et al. The interleukin-6 -174 G > C promoter polymorphism is associated with a higher risk of death after an acute coronary syndrome in male elderly patients. *Int J Cardiol* 2005b;103:266-271.
- Arangino S, Cagnacci C, Angiolucci M, Vacca AM, Longu G, Volpe A, et al. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol* 1999;83:1417-1419.
- Arendt J. Complex effects of melatonin. *Therapie* 1998;53:479-488.

- Balistreri CR, Vasto S, Listi F, Grimaldi MP, Lio D, Colonna-Romano G, et al. Association between +1059G/C CRP polymorphism and acute myocardial infarction in a cohort of patients from Sicily: a pilot study. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:276-281.
- Barr EL, Zimmet PZ, Welborn TA, Jolley D, Magliano DJ, Dunstan DW, et al. Risk of cardiovascular and all-cause mortality in individuals with diabetes mellitus, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *Circulation* 2007;116:151-157.
- Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, Boersma E, Budaj A, Fernández-Avilés F, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation myocardial infarction. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28:1598-1660.
- Becker-Andre M, Andre E, Delamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:1371-1379.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994;269:28531-28534.
- Benach J, Yasui Y, Borrell C, Rosa E, Pasarín MI, Benach N, et al. Examining geographic patterns of mortality: the atlas of mortality in small areas in Spain (1987-1995). *Eur J Publ Health*. 2003 Jun;13(2):115-123.
- Bennermo M, Held C, Green F, Strandberg LE, Ericsson CG, Hansson LO, et al. Prognostic value of plasma interleukin-6 concentrations and the -174 G > C

and -572 G > C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Atherosclerosis* 2004;174:157-163.

- Bennermo M, Held C, Stemme S, Ericsson C-G, Silveira A, Green F, et al. Genetic predisposition to the interleukin-6 response to inflammation: implications for a variety of major diseases? *Clin Chem* 2004;50:2136-2140.
- Berger P, McConnell JP, Nunn M, Kornman KS, Sorrell J, Stephenson K, et al. C-reactive protein levels are influenced by common IL-1 gene variations. *Cytokine* 2002;17:171-174.
- Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:168-172.
- Bevilacqua MP, Gimbrone MA. Inducible endothelial functions in inflammation and coagulation. *Semin Thromb Hemost* 1987;13:425-433.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Caligiuri G, van de Greef W, Quaranta G, Monaco C, et al. Episodic activation of the coagulation system in unstable angina does not elicit an acute phase reaction. *Am J Cardiol* 1996;77:85-87.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, et al. Elevated levels of C-Reactive Protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 1999;99:855-860.
- Biasucci LM, Liuzzo G, Ciervo A, Petrucca A, Piro M, Angiolillo DJ, et al. Antibody response to chlamydial heat shock protein 60 is strongly associated with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:3015-3017.
- Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem* 2004;279:48487-48490.

- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation* 2003;107:1579-1585.
- Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol* 1996;271:E246-E252.
- Bonafe M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M, et al. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001;31:2357-2361.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2 mice reveals a role for chemokines in the initiation for atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.
- Bouatia-Naji N, Rocheleau G, van Lommel L, Lemaire K, Schuit F, Cavalcanti-Proença C, et al. A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* 2008;320:1085-1088.
- Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proença C, Sparso T, Holmkvist J, Marchand M, et al. A variant near *MTNR1B* is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nature Genetics* 2009;41:89-94.
- Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1408.
- Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, et al. Interleukin-6 gene -174G/C and -572G/C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(9):1458-1463.

- Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, et al. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2063-2069.
- Brzezinski A. Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997;336:186-195.
- Büchner K, Henn V, Gräfe M, de Boer OJ, Becker AE, Kroczeck RA. CD40 ligand is selectively expressed on CD4+ T cells and platelets: implications for CD40-CD40L signalling in atherosclerosis. *J Pathol* 2003;201:288-295.
- Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 2002;347:5-12.
- Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Glieca F, Luciani N, Zamparelli R, et al. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol* 2001;88:1125-1128.
- Cabrera de León A, Rodríguez-Pérez M del C, del Castillo-Rodríguez JC, Brito-Díaz B, Pérez-Méndez LI; Muros de Fuentes M, et al. Coronary risk in the population of the Canary Islands, Spain, using the Framingham function. *Med Clin (Barc)* 2006;126:521-6.
- Cagnacci A, Elliott JA, Yen SS. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:447-452.
- Cagnacci C, Arangino S, Angiolucci M, Melis GB, Facchinetti F, Malmusi S, et al. Effect of exogenous melatonin on vascular reactivity and nitric oxide in

postmenopausal women: role of hormone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:261-266.

- Calabrò P, Golia E, Yeh ET. CRP and the risk of atherosclerotic events. *Semin Immunopathol* 2009;31:79-94.
- Caligiuri G, Liuzzo G, Biasucci LM, Maseri A. Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1295-1304.
- Cambien F, Tiret L. Genotype and risk of coronary heart disease. *Cardiovasc Risk Factors* 1997;7:118-128.
- Cardinali DP, Lynch HJ, Wurtman RJ. Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology* 1972;91:1213-1218.
- Cardinali DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr Rev* 1981;2:327-346.
- Carlberg C. Gene regulation by melatonin. *Ann NY Acad Sci* 2000;917:387-396.
- Carrillo-Vico A, Garcia-Maurino S, Calvo JR, Guerrero JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE<sub>2</sub> on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *FASEB J* 2003;17:755-757.
- Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:2272-2278.
- Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 2005;27:189-200.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the



regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:992-1000.

- Cavallo A, Daniels SR, Dolan LM, Bean JA, Khoury JC. Blood pressure-lowering effect of melatonin in type 1 diabetes. *J Pineal Res* 2004;36:262-266.
- Cerrato E, Boix Martínez R, Medrano Albero MJ, Ramírez Santa Pau M. Incidencia y prevalencia de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular en España: revisión sistemática. *Rev Esp Salud Pública*, ISSN 1135-5727, Vol. 80, N° 1, 2006, pags. 5-15.
- Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, et al. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;8:2317-2322.
- Chen J, Zhao J, Huang J, Su S, Qiang B, Gu D. -717A>G polymorphism of human C-reactive protein gene associated with coronary heart disease in ethnic Han Chinese: the Beijing atherosclerosis study. *J Mol Med* 2005;83:72-78.
- Chen WM, Erdos MR, Jackson AU, Saxena R, Sanna S, Silver KD, et al. Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest* 2008;118:2620-2628.
- Chiappelli M, Tampieri C, Tumini E, Porcellini E, Caldarera CM, Nanni S, et al. Interleukin-6 gene polymorphism is an age-dependent risk factor for myocardial infarction in men. *Int J Immunogenet* 2005;32:349-353.
- Cho HJ, Chae IH, Park KW, Ju JR, Oh S, Lee MM, et al. Functional polymorphism in the promoter region of the gelatinase B gene in relation to coronary artery disease and restenosis after percutaneous coronary intervention. *J Hum Genet* 2002;47:88-91.

- Chyu KY, Shah PK. Role of inflammation in atherothrombosis. *Drug News Perspect.* 2001;14:101-109.
- Cianflone D, Ciccirillo F, Buffon A, Trani C, Scabbia EV, Finocchiaro ML, et al. Comparison of coronary angiographic narrowing in stable angina pectoris, unstable angina pectoris, and in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1995;76:215-219.
- Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9:11-24.
- Crawford DC, Sanders CL, Qin X, Smith JD, Shephard C, Wong M, et al. Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2006;114:2458-2465.
- Crawford DC, Yi Q, Smith JD, Shephard C, Wong M, Witrak L, et al. Allelic spectrum of the natural variation in CRP. *Hum Genet* 2006;119:496-504.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in shock, inflammation and ischemic/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 2001;426:1-10.
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107:1255-1262.
- D'Aiuto F, Casas JP, Shah T, Humphries SE, Hingorani AD, Tonetti MS. C-reactive protein (+1444C>T) polymorphism influences CRP response following a moderate inflammatory stimulus. *Atherosclerosis* 2005;179:413-417.
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004;350:1387-1397.

- Davey Smith G, Lawlor DA, Harbord R, Timpson N, Rumley A, Lowe GD, et al. Association of C-reactive protein with blood pressure and hypertension: life course confounding and mendelian randomization tests of causality. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1051-1056.
- Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Eng J Med* 1984;310:1137-1140.
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68.
- de Maat MP, Trion A. C-reactive protein as a risk factor versus risk marker. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:651-657.
- De Vegt F, Dekker JM, Ruhé HG, Stehouwer CD, Nijpels G, Bouter LM, et al. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the Hoorn Study. *Diabetologia* 1999;42:926-931.
- De Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CD, et al. Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study. *JAMA* 2001;285:2109-2113.
- Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia M, Sánchez J, Marrero F, Armas-Trujillo D. Decreased nocturnal melatonin levels during acute myocardial infarction. *J Pineal Res* 2002; 33:248-252.
- Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González MJ, De la Rosa A, Vargas M, Marrero F. Ritmo luz / oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56: 555 - 560.

- Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García M, Ferrer J, de la Rosa A, Vargas M, et al. Light / dark patterns of interleukin – 6 in relation to the pineal hormone melatonin in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 2004; 26: 89 - 93.
- Domínguez Rodríguez A, Abreu González P, García González M, Ferrer Hita J, Vargas M, Reiter RJ. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and impaired nocturnal synthesis of melatonin in patients with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2005; 180:101-105.
- Dominguez Rodriguez A, Garcia Gonzalez MJ, Abreu Gonzalez P, Ferrer J, Kaski JC. Relation of nocturnal melatonin levels to C-reactive protein concentration in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2006; 97: 10 - 12.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci* 2003;8:d1093-d1108.
- Eison AS, Mullins UL. Melatonin binding sites are functionally coupled to phosphoinositide hydrolysis in Syrian hamsters RPMI 1846 melanoma cells. *Life Sci* 1993;53:PL393-PL398.
- Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. 24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol Int* 2001;18:973-985.
- Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, et al. Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res* 2001;21:85-91.

- Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Holzenbein T, et al. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res* 2003;35:40-44.
- Elosua R, Lluís C, Lucas G. Estudio del componente genético de la cardiopatía isquémica: de los estudios de ligamiento al genotipado integral del genoma. *Rev Esp Cardiol Supl* 2009;9:24B-38B.
- Ferreiros ER, Boissonnet CP, Pizarro R, Merletti PF, Corrado G, Cagide A, et al. Independent prognostic value of elevated C-Reactive Protein in unstable angina. *Circulation* 1999;100:1958-1968.
- Fichtlscherer S, Heeschen C, Zeiher AM (2004) Inflammatory markers and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 4:124-131.
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
- Floyd-Smith G, Whitehead AS, Colten HR, Francke U. The human C-reactive protein gene (CRP) and serum amyloid P component gene (APCS) are located on the proximal long arm of chromosome 1. *Immunogenetics* 1986;24:171-176.
- Franceschi C, Olivieri F, Marchegiani F, Cardelli M, Cavallone L, Capri M, et al. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev* 2005;126:351-361.
- Galis Z, Sukhova G, Lark M, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503.

- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251-262.
- Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 1998;92:76-84.
- Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, et al. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde. J Mol Med* 2001;79 :300-305.
- Giacconi R, Cipriano C, Albanese F, Boccoli G, Saba V, Olivieri F, et al. The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 2004;39:621-628.
- Girotti L, Lago M, Ianovsky O, Elizari MV, Dini A, Lloret SP, et al. Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure. *Endocrine*. 2003; 22:245-248.
- Goldmann ND, Liu T, Lei KJ. Structural analysis of the locus containing the human C-reactive protein gene and its related pseudogene. *J Biol Chem* 1987;262:7001-7005.
- Gu L, Okada Y, Clinton S, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein-deficient mice. *Mol Cell* 1998;2:275-281.
- Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationship. *Curr Top Med Chem* 2002;2:167-179.

- Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994;371:257-261.
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-1111.
- Hegele RA, Ban MR, Young TK. Serum C-reactive protein in Canadian Inuit and its association with genetic variation on chromosome 1q21. *Clin Chem* 2001;47:1707-179.
- Helgadóttir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdóttir S, Blondal T, Jonasdóttir A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 2007;316:1491-1493.
- Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-594.
- Herichova I, Zemana M, Mackova M, Griac P. Rhythms of the pineal *N*-acetyltransferase mRNA and melatonin concentrations during embryonic and post-embryonic development in chicken. *Neurosci Lett* 2001;298:123-126.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB, et al. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899-1904.
- Hingorani AD, Shah T, Casas JP. Linking observational and genetic approaches to determine the role of C-reactive protein in heart disease risk. *Eur Heart J* 2006;27:1261-1263.

- Hirose T, Smith RJ, Jetten AM. ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:1976-1983.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4:45-61.
- Horne BD, Camp NJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Kolek MJ, Nicholas ZP, et al. Multiple-polymorphism associations of 7 matrix metalloproteinase and tissue inhibitor metalloproteinase genes with myocardial infarction and angiographic coronary artery disease. *Am Heart J* 2007;154:751-758.
- Hughes RJ, Badia P. Sleep-promoting and hypothermic effects of day-time melatonin administration in humans. *Sleep* 1997;20:124-131.
- Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, Pezzini A, Assanelli D, Lorenzet R, et al. Polymorphisms of the interleukin-1beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:222-227.
- Instituto Nacional de Estadística. Disponible en <http://www.ine.es>
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet.* 2001;29:306-309.
- Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, Luong Ie, Kuller LH, Arnold AM, et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174 G > C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:2066-2071.



- Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, et al. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001;103:2260-2265.
- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, et al. Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:368-372.
- Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, Ilyinskaya O, Smirnov V, Tararak E, et al. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1391-1396.
- Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, Hofman A, Witteman JC. C-reactive protein gene haplotypes and risk of coronary heart disease: the Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2006;27:1331-1337.
- Kaski JC. Estudios de polimorfismos genéticos e infarto de miocardio: ¿una especie en vías de extinción? *Rev Esp Cardiol* 2009;62(4):347-349.
- Kathiresan S, Larson MG, Vasan RS, Guo CY, Gona P, Keaney JF Jr, et al. Contribution of clinical correlates and 13 C-reactive protein gene polymorphisms to interindividual variability in serum C-reactive protein level. *Circulation* 2006;113:1415-1423.
- Kelberman D, Hawe E, Luong LA, Mohamed-Ali V, Lundman P, Tornvall P, et al. HIFMECH Study Group. Effect of Interleukin-6 promoter polymorphisms in survivors of myocardial infarction and matched controls in the North and South of Europe. The HIFMECH Study. *Thromb Haemost* 2004;92:1122-1128.
- Kluff C, de Maat MP. Genetics of C-reactive protein: new possibilities and complications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1956-1959.

- Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegård A, Boquist S, et al. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. *Atherosclerosis* 2005;178:193-198.
- Krauchi K, Cajochen C, Wirz-Justice A. A relationship between heat loss and sleepiness: effects of postural change and melatonin administration. *J Appl Physiol* 1997;83:134-139.
- Kushner I, Jiang SL, Zhang D, Lozanski G, Samols D. Do post-transcriptional mechanisms participate in induction of C-reactive protein and serum amyloid A by IL-6 and IL-1? *Ann N Y Acad Sci* 1995;762:102-107.
- Kushner I, Rzewnicki D, Samols D. What does minor elevation of C-reactive protein signify? *Am J Med* 2006;119:166, e17-28.
- Kvetnoy IM. Extrapeineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 1999; 31:1-12.
- Lahiri DK, Davis D, Nurnberger JI, Jr. Detection of specific protein bands with melatonin-like immunoreactivity in different cell lines and human brain regions. *IUBMB Life* 1999; 48:127-132.
- Lange LA, Carlson CS, Hindorff LA, Lange EM, Walston J, Durda JP, et al. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA* 2006;296:2703-2711.
- Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet* 2004;31:207-213.
- Leatham EW, Bath PMW, Tose JA, Camm AJ. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. *Br Heart J* 1995;73:10-13.

- Lei KJ, Liu T, Zon G, Soravia E, Liu TY, Goldman ND. Genomic DNA sequence for human C-reactive protein. *J Biol Chem* 1985;260:13377-13383.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958;80:2587.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Lippy P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler Throm* 1993;13:197-204.
- Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 2000;86(Suppl):3J-9J.
- Libby P , Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 2001;103:1718-1720.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
- Libby P, Ridker P, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;155:1135-1143.
- Lieb W, Pavlik R, Erdmann J, Mayer B, Holmer SR, Fischer M, et al. No association of interleukin-6 gene polymorphism (-174 G/C) with myocardial infarction or traditional cardiovascular risk factors. *Int J Cardiol* 2004;97:205-212.
- Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, Siegbahn A. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or non invasive strategy. *JAMA* 2001;286:2170-2113.

- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997;19:91-102.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994;331:417-424.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Rebuffi AG, Gallimore JR, Caligiuri G, Lanza GA, et al. Plasma protein acute-phase response in unstable angina is not induced by ischemic injury. *Circulation* 1996;94:2373-2380.
- Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Vitelli A, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98:2370-2376.
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Caligiuri G, Buffon A, Rebuffi AG, et al. Enhanced inflammatory response in patients with pre-infarction unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1696-1703.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006;367:1747-57.
- Lowe SW, Sherr CJ. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:77-83.
- Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. Genetics of atherosclerosis. En: Topol EJ, editor. *Textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998; p.2389-2496.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-240.

- Lyssenko V, Nagorny CL, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spéjel P, et al. Common variant in *MTNR1B* associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genetics* 2009;41:82-88.
- Ma X, Idle JR, Krausz KW, Gonzalez FJ. Metabolism of melatonin by human cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:489-494.
- Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol.* 2004;25:177-195.
- MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem* 2004;50:130-134.
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 2007;316:1488-1491.
- Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993;14:1-10.
- Malärstig A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Soluble CD40L levels are regulated by the -3459 A>G polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-ST elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1667-1673.
- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, De Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in study of twins. *N Engl J Med* 1994;330:1041-1046.
- Margaglione M, Bossone A, Cappucci G, Colaizzo D, Grandone E, Di Minno G. The effect of interleukin-6 C/G-174 polymorphism and circulating interleukin-6 on fibrinogen plasma levels. *Haematologica* 2001;86:199-204.

- Markey SP, Higa S, Shih M, Danforth DN, Tamarkin L. The correlation between human plasma melatonin levels and urinary 6-hydroxymelatonin excretion. *Clin Chim Acta* 1985;150:221-225.
- Marrugat J, Elosua R, Marti H. Epidemiology of ischaemic heart disease in Spain: estimation of the number of cases and trends from 1997 to 2005. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:337-346.
- Marrugat J, Elosua R, Aldasoro E, Tormo MJ, Vanaclocha H, Segura A, et al. Regional variability in population acute myocardial infarction cumulative incidence and mortality rates in Spain 1997 and 1998. *Eur J Epidemiol.* 2004;19: 831-839.
- Marsik C, Sunder-Plassmann R, Jilma B, Kovar FM, Mannhalter C, Wagner O, et al. The C-reactive protein +1444C/T alteration modulates the inflammation and coagulation response in human endotoxemia. *Clin Chem* 2006;52:1952-1957.
- Martínez de Aragón MV, Llacer A. Mortalidad en España 1997. *Boletín Epidemiológico Semanal* 2000;8:253-64.
- Martínez-González J, Llorente-Cortes V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:218-231.
- Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1295-1302.
- Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF. Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res* 2001;30:13-21.

- Miller DT, Zee RY, Suk Danik J, Kozlowski P, Chasman DI, Lazarus R, et al. Association of common CRP gene variants with CRP levels and cardiovascular events. *Ann Hum Genet* 2005;69:623-638.
- Monaco C, D'Onofrio G, Rossi E, Milazzo D, Citterio F, Zini G, et al. Neutrophils are activated in acute coronary syndromes but not in severe peripheral vascular disease: a clue for different pathogenetic mechanisms? *Circulation* 1994;8:I-732.
- Monroe KK, Watts SW. The vascular reactivity of melatonin. *Gen Pharmacol* 1998;30:31-35.
- Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G. Melatonin. *Curr Med Chem* 1999;6:501-518.
- Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med* 2003;81:321-326.
- Morita A, Nakayama T, Doba N, Hinohara S, Soma M. Polymorphism of the C-reactive protein (CRP) gene is related to serum CRP level and arterial pulse wave velocity in healthy elderly Japanese. *Hypertens Res* 2006;29:323-331.
- Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr, et al. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994;94:885-891.
- Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Bohm BO, Wieland H, Marz W. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *Mol Med* 2002;80:507-513.

- Navarro-López F. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:413-431.
- Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980;61:503-508.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinine reductase 2. *J Biol Chem* 2000;275:31311-31317.
- Nosjean O, Nocolas JP, Klupsch F, Delarrange P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1369-1379.
- Obisesan TO, Leeuwenburgh C, Phillips T, Ferrell RE, Phares DA, Prior SJ, et al. C-reactive protein genotypes affect baseline, but not exercise training-induced changes, in C-reactive protein levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1874-1879.
- Olivieri F, Bonafe M, Cavallone L, Giovagnetti S, Marchegiani F, Cardelli M, et al. The -174 G > C locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. *Exp Gerontol* 2002;37:309-314.
- Orbe J, Fernandez L, Rodriguez JA, Rabago G, Belzunce M, Monasterio A, et al. Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed. *Atherosclerosis* 2003;170:269-276.
- Otterdal K, Pedersen TM, Solum NO. Release of soluble CD40 ligand after platelet activation: studies on the solubilization phase. *Thromb Res* 2004;114:167-177.



- Pang CS, Xi SC, Brown GM, Pang SF, Shiu SY. 2[125I]Iodomelatonin binding and interaction with beta-adrenergic signaling in chick heart/coronary artery physiology. *J Pineal Res* 2002;32:243-252.
- Pangerl B, Pangerl A, Reiter RJ. Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review. *J Neural Transm Gen Sect* 1990;81:17-29.
- Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001;154:681-689.
- Park HT, Back SY, Kim BS, Kim JB, Kim JJ. Developmental expression of “RZR $\beta$ , a putative nuclear-melatonin receptor” mRNA in suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience Lett* 1996;217:17-20.
- Park HT, Kim YJ, Yoon S, Kim JB, Kim JJ. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor  $\beta$  (RZR $\beta$ ), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Res* 1997;747:332-337.
- Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and plasma amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983;34:141-212.
- Pepys MB. CRP or not CRP? That is the question. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1091-1094.
- Pérez G, Marrugat J, Sala J. Myocardial infarction in Girona, Spain: attack rate, mortality rate and 28-day case fatality in 1988. Regicor Study Group. *J Clin Epidemiol.* 1993 Oct; 46(10):1173-1179.
- Pérez-Fernández R, Kaski JC. Interleucina-10 y enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:738-750.

- Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Schneyer U, et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *J Pineal Res* 2006;40:135-143.
- Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E. Melatonin and type 2 diabetes-a possible link? *J Pineal Res* 2007;42:350-358.
- Prasanna P, Pike S, Peng K, Shane B, Applin DR. Human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase: gene structure, tissue distribution of the mRNA, and immunolocalization in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2003;278:43178-43187.
- Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N, Thorleifsson G, et al. Variants in *MTNR1B* influence fasting glucose levels. *Nature Genetics* 2009;41:77-81.
- Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, et al. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 1997;150:1687-1699.
- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999;274:443-449.
- Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Huang GC, et al. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *J Pineal Res* 2008;44:273-279.
- Randak C, Roschinger W, Rolinski B, Hadorn HB, Applegarth DA, Roscher AA. Three siblings with nonketotic hyperglycaemia, mildly elevated plasma

- homocysteine concentrations and moderate methylmalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 2000;23:520-522.
- Rauramaa R, Väisänen SB, Luong LA, Schmidt-Trücksäss A, Penttilä IM, Bouchard C, et al. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2657-2662.
  - Reiling E, van't Riet E, Groenewoud MJ, Welschen LMC, van Hove EC, Nijpels G, et al. Combined effects of single-nucleotide polymorphisms in *GCK*, *GCKR*, *G6PC2* and *MTNR1B* on fasting plasma glucose and type 2 diabetes risk. *Diabetologia* 2009;52:1866-1870.
  - Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12: 151 - 180.
  - Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993;49:654-664.
  - Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237 - 256.
  - Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:273-285.
  - Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003;58:10-19.
  - Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 1994;13:1177-1185.

- Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8734-8738.
- Retterstol L, Eikvar L, Berg K. A twin study of C-reactive protein compared to other risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2003;169:279-282.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moyer LA, Goldman S, et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1998;99:839-844.
- Ridker PM. C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2129-2138.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516-1517.
- Rojas A, Ortiz R, Delgado I. Genética y medicina molecular en cardiología. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:91-108.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
- Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
- Rubio A, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C. Involvement of alpha- and beta-adrenergic receptors in the regulation of rat pineal N-acetyltransferase activity during development. *Endocrinology* 1993;132:393-398.
- Sabatine MS, Seidman JG, Seidman CE, 2006;113:e450-e455.

- Sakotnik A, Liebmann P, Stoschitzki K, Lercher P, Schauenstein K, Klein W, et al. Decreased melatonin synthesis in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 1999; 20:1314 – 1317.
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 2007;357:443-453.
- Sans S, Puigdefabregas A, Paluzie G, Monerde D, Balaguer-Vintro I. Increasing trends of acute myocardial infarction in Spain: the MONICA-Catalonia Study. *Eur Heart J* 2005; 26 (5): 505-515.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007;316:1331-1336.
- Scheer FA, Van Montfrans GA, van Someren EJ, Mairuhu G, Buijs RM. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension. *Hypertension* 2004;43:192-197.
- Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res* 2001;89:1092-1103.
- Schunkert H, Gotz A, Braund P, McGinnis R, Tregouet DA, Mangino M, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 2008;117:1675-1684.
- Scirica BM, Morrow DA. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 2006;113:2128-2151.

- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316:1341-1345.
- Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection. *Cardiol Rev* 2000;8:31-39.
- Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(4 Suppl S):15S-22S.
- Slack J, Evans KA. The increased risk of death from ischaemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women in ischaemic heart disease. *J Med Genet* 1966;2:239-257.
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8264-8268.
- Snieder H, Boomsma DI, van Doornen LJ, Neale MC. Bivariate genetic analysis of fasting insulin and glucose levels. *Genet Epidemiol* 1999;16:426-446.
- Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, Palmieri G, Partenzi A, Sangiorgi G, et al. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1579-1589.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30:243-247.
- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, et al. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1995;270:7037-7040.

- Steinmayr M, Andre E, Conquet F, Rondi-Reig N, Delhaye-Bouchaud N, Auclair N, et al. Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3960-3965.
- Stumpf I, Mühlbauer E, Peschke E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. *J Pineal Res* 2008;45:318-327.
- Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RY. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis* 2005;178:139-145.
- Suk Danik J, Chasman DI, Cannon CP, Miller DT, Zee RY, Kozlowski P, et al. Influence of genetic variation in the C-reactive protein gene on the inflammatory response during and after acute coronary ischemia. *Ann Hum Genet* 2006;70:705-716.
- Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 1999;99:2503-2509.
- Szabolcs MJ, Cannon PJ, Thienel U, Chen R, Michler RE, Chess L, et al. Analysis of CD154 and CD40 expression in native coronary atherosclerosis and transplant associated coronary artery disease. *Virchows Arch* 2000;437:149-159.
- Szalai AJ, McCrory MA, Cooper GS, Wu J, Kimberly RP. Association between baseline levels of C-reactive protein (CRP) and a dinucleotide repeat polymorphism in the intron of the CRP gene. *Genes Immunol* 2002;3:14-19.
- Szalai AJ, Alarcon GS, Calvo-Alen J, Toloza SM, McCrory MA, Edberg JC, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US Cohort (LUMINA).

XXX: association between C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms and vascular events. *Rheumatol (Oxf)* 2005;44:864-868.

- Szalai AJ, Wu J, Lange EM, McCrory MA, Langefeld CD, Williams A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J Mol Med* 2005;83:440-447.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, et al. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. *J Pineal Res* 1998;25:184-191.
- Tan DX, Manchester LC, Hardeland R, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, et al. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* 2003; 34:75-78.
- Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000;275:18138-18144.
- The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-678.



- Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction. Joint ESC/ACCCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525-2538.
- Tirosh A, Shai I, Tekes-Manova D, Israeli E, Pereg D, Shochat T, et al. Normal fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes in young men. *N Eng J Med* 2005;353:1454-1462.
- Topper JN, Gimbrone MA Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype: *Mol Med Today* 1999;5:40-46.
- Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-Reactive Protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC study group. Fragmin during instability in coronary artery disease. *Circulation* 1997;96:4204-4210.
- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation*. 1994;90:583-612.
- Van Cauter E. Putative roles of melatonin in glucose regulation. *Therapie* 1998;53:467-472.
- van den Heuvel CJ, Kennaway DJ, Dawson D. Thermoregulatory and soporific effects of very low dose melatonin injection. *Am J Physiol* 1999;276:E249-E254.

- Van der Helm-van Mil AH, van Someren EJ, van der Boom R, van Buchem MA, de Craen AJ, Blauw GJ. No influence of melatonin on cerebral blood flow in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5989-5994.
- van der Net JB, Oosterveer DM, Versmissen J, Defesche JC, Yazdanpanah M, Aouizerat BE, et al. Replication study of 10 genetic polymorphisms associated with coronary heart disease in a specific high-risk population with familial hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 2008;29:2195-2201.
- Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, et al. Soluble CD40L: risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;108:1049-1052.
- Vaxillaire M, Cavalcanti-Proença C, Dechaume A, Tichet J, Marre M, Balkau B, et al. The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* 2008;57:2253-2257.
- Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M, et al. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 2002;53:1029-1034.
- Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM. Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6200-6203.
- Walkup AS, Appling DR. Enzymatic characterization of human mitochondrial C1-tetrahydrofolate synthase. *Arch Biochem Biophys* 2005;442:196-205.
- Walsh MT, Divane A, Whitehead AS. Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23. *Immunogenetics* 1996;44:62-69.

- Wang J, Warzecha D, Wilcken D, Wang XL. Polymorphism in the gelatinase B gene and the severity of coronary arterial stenosis. *Clin Sci (Lond)* 2001;101:87-92.
- Wang Q, Hunt SC, Xu Q, Chen YE, Province MA, Eckfeldt JH, et al. Association study of CRP gene polymorphisms with serum CRP level and cardiovascular risk in the NHLBI Family Heart Study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2752-H2757.
- Watanabe RM, Valle T, Hauser ER, Ghosh S, Eriksson J, Kohtamäki K, et al. Familiality of quantitative metabolic traits in Finnish families with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Finland-United States Investigation of NIDDM Genetics (FUSION) Study investigators. *Hum Hered* 1999;49:159-168.
- Weedon MN, Frayling TM, Shields B, Knight B, Turner T, Metcalf BS, et al. Genetic regulation of birth weight and fasting glucose by a common polymorphism in the islet cell promoter of the glucokinase gene. *Diabetes* 2005;54:576-581.
- Weekley LB. Pharmacologic studies on the mechanism of melatonin-induced vasorelaxation in rat aorta. *J Pineal Res* 1995;19:133-138.
- Wienke A, Holm NV, Skytthe A, Yashin AI. The heritability of mortality due to heart diseases: a correlated frailty model applied to Danish twins. *Twin Res* 2001;4:266-274.
- Wilcoxon JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2839-2843.
- Woo P, Korenberg JR, Whitehead AS. Characterization of genomic and complementary DNA sequence of human C-reactive protein, and comparison

with the complementary DNA sequence of serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1985;260:13384-13388.

- Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000;21:1574-1583.
- Worns MA, Victor A, Galle PR, Hohler T. Genetic and environmental contributions to plasma C-reactive protein and interleukin-6 levels-a study in twins. *Genes Immunol* 2006;7:600-605.
- Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, et al. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-1923.
- Yang Q, Scalbert E, Delagrangé P, Vanhoutte PM, O'Rourke ST. Melatonin potentiates contractile responses to serotonin in isolated porcine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H76-H82.
- Zacho J, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Grande P, Sillesen H, Nordestgaard BG. Genetically elevated C-reactive protein and ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 2008;359:1897-1908.
- Zal B, Kaski JC, Arno G, Akiyu JP, Xu Q, Cole D, et al. Heat-shock protein 60-reactive CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004;109:1230-1235.
- Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med* 2002;252:247-254.

- Zee RY, Ridker PM. Polymorphism in the human C-reactive protein (CRP) gene, plasma concentrations of CRP, and the risk of future arterial thrombosis. *Atherosclerosis* 2002;162:217-219.
- Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 2007;316:1336-1341.
- Zeng B, Prasan A, Fung KC, Solanki V, Bruce D, Freedman SB, et al. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. *Intern Med J* 2005;35:331-335.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1788-1794.

**ANEXOS**



Hospital Universitario de Canarias

## **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE PARA ESTUDIOS GENÉTICOS**

Proyecto de Investigación titulado: **“POLIMORFISMO GENÉTICO DE LOS RECEPTORES DE LA MELATONINA Y LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS DE LA ATERTROMBOSIS EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN LA ISLA DE TENERIFE”**.

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal pretende profundizar en el conocimiento de factores genéticos y epidemiológicos que puedan predisponer al desarrollo de aterotrombosis en pacientes con infarto agudo de miocardio en la Isla de Tenerife. Asimismo se determinaran sustancias en la sangre relacionadas con la inflamación que predisponen a desarrollar una complicación hemodinámica, después de haberle realizado una angioplastia en la arteria responsable de su infarto.

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo la identificación de posibles factores genéticos y bioquímicos relacionados con la aterotrombosis, podría beneficiar en un futuro a otros pacientes que acuden como usted por infarto agudo de miocardio y en las cuales se le realiza una angioplastia de la arteria responsable del infarto.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el Equipo Médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide participar, se le extraerá dos tubos adicionales (15 cc) para obtener las muestras de sangre para extracción de ADN y estudios citogenéticos. El ADN es un elemento que está presente en todas sus células porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de “genes” que determina sus características físicas personales como el color de ojos, de piel, etc. Las diferencias entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas desarrollan unas enfermedades y otras no.

La toma de muestras de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la aguja en la piel y le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve infección, que desaparecen en pocos días. Más raramente mareo en el momento de la extracción de sangre.

Esta prueba no tiene carácter diagnóstico sino solo investigador, y usted tiene total libertad para participar. Además le garantizamos que :

1. El ADN será utilizado exclusivamente para los fines del estudio, es decir, “determinar los polimorfismos genéticos de los receptores de la melatonina y los mediadores inflamatorios de la aterotrombosis en pacientes con infarto agudo de miocardio”. No podrá ser utilizado para ningún otro estudio sin autorización expresa del paciente, y quedará custodiado y etiquetado de manera anónima en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna, Tenerife).
2. La información que se derive del análisis es confidencial, y no podrá ser utilizada con otros fines diferentes al del estudio.
3. Si usted lo solicita sus muestras de sangre así como de DNA serán destruidas. En ese caso se le informará adecuadamente y en su momento de la fecha de destrucción del material.
4. Bajo ningún concepto y en ningún momento las muestras serán motivo de lucro directo o transacción comercial, bien sea por la venta del material o de los derechos para realizar estudios sobre los mismos.
5. Al material custodiado se le aplicarán las normativas vigentes, nacionales o europeas que procedan.

Yo. \_\_\_\_\_, **AUTORIZO** la extracción de DNA a partir de una muestra de sangre periférica, con el único fin de analizar polimorfismos genéticos de interés para el estudio mencionado.

En \_\_\_\_\_ a de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**D.**

**D.**

**Médico**



## ANEXO 1

### Preparación de oligonucleótidos para la PCR

Código N°	Nombre de oligo	Volumen añadir (µl)	Concentración final del stock	Metabolismo de Melatonina	Inflamación	Localización
2	rs3093059F	194	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
3	rs1774131F	187	100uM		soluble-PLA2IIa	Zona Pre-PCR
4	rs3092952F	164	100uM		soluble-CD40L	Zona Pre-PCR
6	rs7208693F	237	100uM		MPO	Zona Pre-PCR
7	rs28936679F	320	100uM	AA-NAT		Zona Pre-PCR
8	rs1800885F	331	100uM	MEL1AR		Zona Pre-PCR
13	rs1417938F	301	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
14	rs1801253F	195	100uM	B1AR		Zona Pre-PCR
17	rs17149149F	227	100uM	HIOMT		Zona Pre-PCR
18	GPR50_501F	310	100uM	MEL-related R		Zona Pre-PCR
19	rs3918242F	228	100uM		MMP9	Zona Pre-PCR
20	rs17576F	328	100uM		MMP9	Zona Pre-PCR
22	rs28383653F	245	100uM	MEL1AR		Zona Pre-PCR
23	RS3816844F	247	100uM		soluble-oxLDLR	Zona Pre-PCR
24	5A_6AF	247	100uM		MMP3	Zona Pre-PCR
25	rs662F	245	100uM		PON1	Zona Pre-PCR
26	PPAR_161F	223	100uM		PPAR	Zona Pre-PCR
28	rs1800947F	284	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
29	MPO_463F	264	100uM		MPO	Zona Pre-PCR
31	rs1800795F	271	100uM		IL6	Zona Pre-PCR
36	rs3091244F	149	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
2	RS3093059R	344	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
3	RS1774131R	205	100uM		soluble-PLA2IIa	Zona Pre-PCR
4	RS3092952R	265	100uM		soluble-CD40L	Zona Pre-PCR
6	RS7208693R	296	100uM		MPO	Zona Pre-PCR
7	RS28936679R	283	100uM	AA-NAT		Zona Pre-PCR
8	RS1800885R	263	100uM	MEL1AR		Zona Pre-PCR
13	RS1417938R	182	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
14	RS1801253R	187	100uM	B1AR		Zona Pre-PCR
17	RS17149149R	241	100uM	HIOMT		Zona Pre-PCR
18	GPR50_501R	226	100uM	MEL-related R		Zona Pre-PCR
19	RS3918242R	229	100uM		MMP9	Zona Pre-PCR
20	RS17576R	259	100uM		MMP9	Zona Pre-PCR
22	RS28383653R	220	100uM	MEL1AR		Zona Pre-PCR
23	rs3816844R	212	100uM		soluble-oxLDLR	Zona Pre-PCR
24	5A_6AR	194	100uM		MMP3	Zona Pre-PCR
25	RS662R	223	100uM		PON1	Zona Pre-PCR
26	PPAR_161R	262	100uM		PPAR	Zona Pre-PCR
28	RS1800947R	133	100uM		CRP	Zona Pre-PCR
29	MPO_463R	305	100uM		MPO	Zona Pre-PCR
31	rs1800795R	179	100uM		IL6	Zona Pre-PCR
36	RS3091244R	133	100uM		CRP	Zona Pre-PCR

F= forward (orientación hacia adelante)  
R= reverse (orientación hacia atrás)  
Para diluir los oligos (primers) originales se utiliza: TE = Tris/EDTA buffer (pH 7.4; Sigma-Aldrich Cat.No: 93302)  
Los (F+R) se prepararon a 25 µM (25 µl Forward + 25 µl Reverse + 25 µl TE buffer + 25 µl H<sub>2</sub>O)

## ANEXO 2

### Mezcla de *primers* para la PCR (AMI-plex)

Todas las disoluciones stocks de los *primers* (F+ R) están a una concentración de 25 µM

Stocks (F+ R) de <i>primers</i>	Volumen (µl)	Localización	Metabolismo MEL	Inflamación
rs8192552(F+R)	5,0	pre-PCR room		
rs3093059(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs1774131(F+R)	1,5	pre-PCR room		
rs3092952(F+R)	3,5	pre-PCR room		
rs1799983(F+R)	5,0	pre-PCR room		
rs7208693(F+R)	3,5	pre-PCR room		
rs28936679(F+R)	5,0	pre-PCR room		
rs1800885(F+R)	2,5	pre-PCR room		
rs5443(F+R)	3,5	pre-PCR room		
rs699(F+R)	5,0	pre-PCR room		
CTSG_125R(F+R)	1,5	pre-PCR room		
rs429358(F+R)	5,0	pre-PCR room		
rs1417938(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs1801253(F+R)	3,0	pre-PCR room		
rs6867(F+R)	3,0	pre-PCR room		
rs1805124(F+R)	4,0	pre-PCR room		
rs17149149(F+R)	2,0	pre-PCR room		
GPR50_501(F+R)	5,0	pre-PCR room		
rs3918242(F+R)	1,5	pre-PCR room		
rs17576(F+R)	5,0	pre-PCR room		
GPla_807(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs28383653(F+R)	3,0	pre-PCR room		
RS3816844(F+R)	3,5	pre-PCR room		
5A_6A(F+R)	3,5	pre-PCR room		
rs662(F+R)	2,0	pre-PCR room		
PPAR_161(F+R)	2,0	pre-PCR room		
APOE_560(F+R)	8,0	pre-PCR room		
rs1800947(F+R)	2,0	pre-PCR room		
MPO_463(F+R)	3,5	pre-PCR room		
rs2878575(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs1800795(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs20417(F+R)	6,0	pre-PCR room		
rs6025(F+R)	2,0	pre-PCR room		
rs7654853(F+R)	3,0	pre-PCR room		
rs28933386(F+R)	3,0	pre-PCR room		
rs3091244(F+R)	4,0	pre-PCR room		
ddH <sub>2</sub> O	480,0	pre-PCR room		
<b>Total Vol. 1x:</b>	<b>600,0</b>			

<b>ANEXO 3</b>		
Condiciones de la PCR multiplex	Muestras (n°)=	104
Componentes	Concentración final	µl en mezcla
GeneAmp PCR Buffer	10x(no MgCl <sub>2</sub> )	1,8
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	187,2
dNTP Mix	Mix each 25 mM	509,6
PCR primers stock	Each 25 µM	52
AmpliTaq Gold	5 unit / µl	728
Template DNA	ng/µl	0,25
ddH <sub>2</sub> O	-----	4
Total	-----	14,45
<p>Aliquotar 14 µl/tubo y añadir el correspondiente DNA            Programa de ciclos para PCR: <b>95 °C, 10 min.; 35 ciclos (95 °C, 30sec; 60 °C, 1min; 65 °C, 30 sec.); 65 °C, 6 min.; hasta ∞ 15 °C</b>            La realización de la media de primers y de la PCR, se llevó a cabo bajo campana de flujo laminar estéril y en habitación pre-PCR.</p>		
<b>Condiciones de purificación de productos mediante EXO+SAP</b>		
<p><b>EXO (Exonuclease I) + SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)</b> se utilizan para eliminar los dNTPs y primers sobrantes de la PCR que pueden interferir en el marcaje para el genotipado de los SNPs</p> <p><b>EXO:</b> Exonuclease I (10 unit/µl)  <b>SAP:</b> Fosfatasa alcalina (1 unit/µl)  <b>Mezclar: 30 H2O +7ul SAPBuffer 10X + 30 SAP + 1,2 ul of EXO I.</b></p> <p>Luego alicotar 3,5ul de la mezcla anterior en los pocillos y añadir 2,5 µl de cada producto de PCR en el pocillo que le corresponda.</p> <p><b>Incubación:</b> 37°C durante 40 min y posteriormente a 80°C durante 15 min para detener la reacción de defosforilación.</p> <p><b>Lugar:</b> La realización de este paso se llevó a cabo en la habitación post-PCR.</p>		

### ANEXO 4

#### Mezcla de SBE oligos para la reacción de SNaPshot (minisequenciación de SNPs)

Todos los *stocks* de *primers* individuales deben estar a una concentración de 50 µM antes de la mezcla.

Nombre del oligo:	Volumen (µl)	Localización	Metabolismo MEL	Inflamación
rs8192552snR	5,0	post-PCR room		
RS3093059snF	1,5	post-PCR room		
RS1774131snF	1,5	post-PCR room		
RS3092952snR	1,5	post-PCR room		
RS1799983snR	5,0	post-PCR room		
rs7208693snR	4,5	post-PCR room		
rs28936679snF	5,0	post-PCR room		
RS1800885snF	5,0	post-PCR room		
RS5443snR	5,0	post-PCR room		
rs699snF	7,0	post-PCR room		
CTSG_125snR	2,0	post-PCR room		
rs429358snF	5,0	post-PCR room		
RS1417938snF	3,0	post-PCR room		
rs1801253snF	5,0	post-PCR room		
RS6867snF	1,5	post-PCR room		
RS1805124snR	5,0	post-PCR room		
RS17149149snF	5,0	post-PCR room		
GPR50_501snR	5,0	post-PCR room		
RS3918242snR	2,0	post-PCR room		
RS17576snR	5,0	post-PCR room		
GPIA_807snR	3,0	post-PCR room		
RS28383653snR	6,0	post-PCR room		
RS3816844snR	6,0	post-PCR room		
5A_6AsnR	5,0	post-PCR room		
RS662snF	3,0	post-PCR room		
PPAR_161snF	3,0	post-PCR room		
APOE_560snR	7,0	post-PCR room		
RS1800947snF	2,5	post-PCR room		
MPO_463snF	3,0	post-PCR room		
RS2878575snF	3,0	post-PCR room		
rs1800795snR	5,0	post-PCR room		
RS20417snR	7,0	post-PCR room		
RS6025snR	5,0	post-PCR room		
RS7654853snR	5,0	post-PCR room		
RS28933386snR	5,0	post-PCR room		
RS3091244snR	6,0	post-PCR room		
stock (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	40,0	post-PCR room		
ddH <sub>2</sub> O	106,0	post-PCR room		
<b>Total Volumen:</b>	<b>300,0</b>	post-PCR room		
Nota: La mezcla de <i>primers</i> ha de realizarse en frio (en hielo)				

<b>ANEXO 5</b>		
<b>Condiciones de SNaPshot (Single Base Extension = Minisecuenciación)</b>		
Este procedimiento ha de hacerse en la zona de post-PCR		
<b>Mezcla de reacción (8 µl/muestra)</b>		
Componentes	Muestras= Stock Volumen (µl)	107 µl de mezcla
Mezcla de reacción (*)	4	428
ddH <sub>2</sub> O	2	214
Mezcla con todos los SBE primers	1	107
Producto de PCR purificado por EXOSAP	1	NO
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>---</b>
Alicuotar 7 µl de la mezcla anterior y añadir 2µl de cada producto de PCR purificado en el pocillo que le corresponda.		
<b>Ciclo del programa (SNaPshot):</b> 30 ciclos (96 °C, 10 sec; 55 °C, 5 sec; 60 °C, 30 sec); y 10 °C hasta ∞.		
Entonces, añadir 1 unidad de SAP en cada pocillo e incubar 37 °C, 45 min; 80 °C, 15 min.		
Preparación de la placa para su análisis en los secuenciadores automáticos ABI3130xl:		
<b>Mezclar:</b> 1.2 µl de los productos de SNaPshot purificados previamente por SAP + 0.12 µl GS-120 Liz + 12 µl Formamide.		
(*)= ABI PRISM(R) SNaPshot™ Multiplex Kit		
Se usaron 22 segundos de inyección a 2000 voltios y un tiempo de carrera de 1000 segundos con la matriz de colores E5 (Matrix Standard Set DS-02 dR110, dR6G, dTAMRA, dROX & LIZ dyes; ABI cat nº 4323014).		