



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**POLIMORFISMO DE SUSTITUCIÓN +219G>A DEL GEN  
DE LA PROTEÍNA C REACTIVA EN PACIENTES CON  
FIBRILACIÓN AURICULAR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ANDREA ESTEFANÍA DEL CAMPO SFEIR**

**Profesor patrocinante:**  
Dr. Sergio Lavandero G.

**Directores de memoria:**  
Dr. Sergio Lavandero G.  
QF. Juan Roldán S.

**SANTIAGO, 2008**

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera comenzar agradeciendo a cada uno de los que me apoyaron durante el desarrollo de este proyecto:*

*Debo comenzar agradeciendo a mis padres y hermanos que sin su apoyo e impulso no hubiese podido continuar. A mis queridas compañeras de departamento Tami, Tere y Paula, que tanto aguantaron y apoyaron mis desvelos.*

*Con gusto quiero agradecer a todos los que forman parte de mi querido laboratorio “del segundo piso” o Unidad de Farmacogenómica, especialmente a Melissa y Juan, porque sin ellos este proyecto no existiría.*

*No puedo dejar fuera de esta tesis a personas que me ayudaron muchísimo con su experiencia y sabiduría como lo son Juan Pablo, Valentina y Rodrigo que me tuvieron una paciencia enorme al momento de contestar mis preguntas.*

*Agradezco de todo corazón a mis profesores Dr. Sergio Lavandero y Dra. Rosemarie Mellado por su apoyo incondicional a pesar de los pesares y por darme fuerza en los momentos en que pensé que esto no resultaría.*

*Finalmente agradezco a mis amigos y amigas de siempre por estar cada vez que los necesité y por pasar tantos momentos espectaculares junto a mí.*

## **FINANCIAMIENTO**

Esta memoria de título se realizó en el Laboratorio de Farmacogenómica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y se financió por los Proyectos DI MULT 06/09-2, FONDECYT 1070641 y FONDAP 15010006.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>6</b>
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES .....	6
1.2. FIBRILACIÓN AURICULAR .....	7
1.2.1 Bases moleculares de la conducción cardiaca y fibrilación auricular .....	9
1.2.2. Fibrilación auricular, inflamación y proteína C reactiva.....	11
1.2.3 Proteína C reactiva .....	11
1.3 FARMACOGENÓMICA .....	13
1.3.1. Gen para PCR.....	15
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>17</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
5.1. MATERIALES .....	17
5.1.1. Equipos .....	17
5.1.2. Herramientas.....	17
5.1.3. Materiales utilizados para la toma de muestra .....	18
5.1.4. Reactivos utilizados en la determinación del polimorfismo .....	18
5.2. MÉTODOS .....	18
5.2.1. Tipo de estudio .....	18
5.2.2. Lugar de realización.....	19
5.2.3. Criterios de inclusión .....	19
5.2.4. Criterios de exclusión:.....	19
5.2.5 Toma de muestra y recopilación de datos.....	20
5.2.6. Aislamiento y cuantificación del DNA cromosomal .....	20
5.2.7. Determinación del polimorfismo +219G>A en el exón 2 del gen de PCR.....	21
5.2.8. Expresión de resultados y análisis estadístico .....	23
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
6.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA CTPP. ....	25
6.2. DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA Y ALÉLICA DEL POLIMORFISMO +219G>A DEL GEN DE PCR .....	26
6.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES.....	26
6.4. RELACIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y FIBRILACIÓN AURICULAR.....	27
6.5. RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE ESTATINAS Y $\beta$ -BLOQUEADORES Y LA APARICIÓN DE FA POSTOPERATORIA.....	28
6.6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE PCR PRE Y POSTOPERATORIOS EN RELACIÓN AL GENOTIPO.....	29

6.7. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE PCR PRE Y POSTOPERATORIOS EN RELACIÓN A LA APARICIÓN DE FA. .....	29
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>34</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia más común y prevalente en la población adulta, en especial aquella hipertensa. La FA se caracteriza por una rápida activación eléctrica descoordinada de la aurícula, con el consiguiente deterioro de su función contráctil. La inflamación es un factor de riesgo en pacientes con FA e incluso podría tener un papel causal en su desarrollo. Al respecto se ha descrito que los niveles de la proteína C reactiva (PCR), una proteína inflamatoria generada en la pared de los vasos y el hígado, están incrementados tanto en la FA paroxística como en la de tipo persistente. Por otra parte se ha sugerido que los niveles plasmáticos de esta proteína podrían estar determinados por ciertos polimorfismos en su gen, en particular el +219G>A.

Este trabajo tuvo por objetivos: a) evaluar si factores inflamatorios sistémicos y/o locales determinan la aparición de FA por remodelado de la aurícula y b) investigar si el polimorfismo +219G>A del gen para PCR determina un mayor riesgo y los niveles plasmáticos circulantes de esta proteína inflamatoria. En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio, la FA que se presenta en un 20% de los pacientes que se someten a cirugía cardiaca electiva. En estos pacientes se determinaron los niveles de PCR antes y después de la cirugía y se genotificaron para este polimorfismo mediante la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa en su versión confrontando dos pares de partidores.

A este estudio ingresaron 109 pacientes de los Hospitales Clínicos de la Universidad Católica y de la Universidad de Chile. El promedio de edad fue de  $61 \pm 11$  años y el 82% fue de sexo masculino. El 48% de los pacientes presentó hipertensión arterial, el 40% dislipidemia y un 24% diabetes. La incidencia de FA postoperatoria fue de 26%. Los niveles promedio de PCR pre y postoperatorios fueron de 3,4 y 75,6 mg/L, respectivamente. Las frecuencias genotípicas fueron 0,394 para el homocigoto GG, y 0,303 para el homocigoto AA y el heterocigoto GA. Las frecuencias alélicas calculadas cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg y fueron de 0,546 y 0,454 para el alelo G y el alelo A, respectivamente. Se realizó la asociación entre los distintos genotipos y la aparición de FA a través de un análisis estadístico de  $\chi^2$ , no encontrándose diferencia significativa entre ellos.

Los resultados muestran que no existe relación entre el polimorfismo y la aparición de FA postoperatoria ni entre el polimorfismo y los niveles plasmáticos de PCR.

## ABSTRACT

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia in the adult population, especially in hypertensive patients. AF is characterized by a rapid activation of uncoordinated electrical atrium, with the consequent deterioration on the contractile function. Inflammation is one risk factor in patients with AF and might even has a causal role in its development. In this regard, it has been described that levels of C-reactive protein (CRP), an inflammatory protein produced in the wall vessels and liver, are increased in both the paroxystic and persistent AF. Moreover it has been proposed that circulating CRP levels could be determined by certain polymorphisms in the gene, in particular the +219G>A.

In the present work, we investigated: a) whether systemic and/or local inflammatory factors determine the onset of AF by remodelling of the atrium and b) if the polymorphism +219 G> A PCR gene determines a higher risk and plasma CRP levels. We used as a model for study, the AF occurring in 20% of patients who undergo elective cardiac surgery. In these patients, CRP levels were determined before and after surgery and they were genotyped for this polymorphism through the polymerase chain reaction in the version confronting two pairs of primers.

109 patients of the Hospital Clinico de la Universidad Catolica and the Hospital Clinico de la Universidad de Chile were genotyped. The average age was  $61 \pm 11$  years and 82% were male. 48% of these patients presented hypertension, 40% dyslipidemia and diabetes by 24%. The incidence of postoperative AF was 26%. The average levels of CRP pre and postoperative were 75.6 and 3.35 mg/L, respectively. The genotype frequencies were 0,394 for the GG homozygous, and 0,303 for homozygous AA and heterozygotes GA. The allelic frequencies calculated comply with the Hardy-Weinberg, and were 0,546 and 0,454 for the G allele and the A allele, respectively. We performed the association between different genotypes and the emergence of AF through a statistical analysis and found no significant difference between them.

The present results showed that there is no relationship between the polymorphism and the occurrence of postoperative AF nor between polymorphism and plasma levels of CRP.

## **ABREVIATURAS**

A : Adenina

AHA : American Heart Association

C : Citosina

CTPP : Confronting two pairs of primers

DNA : Acido dextrirribonucleico

ECV : Enfermedades cardiovasculares

EDTA : Etilén diamino tetra acético

FA : Fibrilación auricular

G : Guanina

HCUC : Hospital clínico Universidad Católica

HCUCH : Hospital clínico Universidad de Chile

IAM : Infarto agudo al miocardio

IL-1 : Interleuquina 1

IL-6 : Interleuquina 6

PCR : Proteína C reactiva

SNP : Polimorfismo de un solo nucleótido

T : Timina

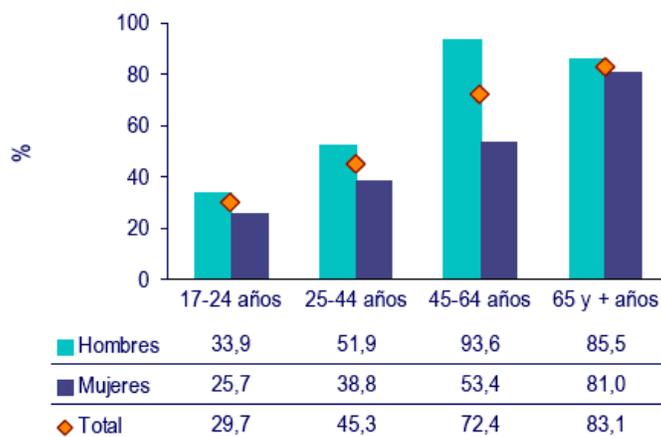
TNF- $\alpha$  : Factor de necrosis tumoral alfa

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en los países en vías de desarrollo. Además, datos de la Organización Mundial de la Salud al año 2003 muestran que alrededor del 29% de las muertes en el mundo son causa de algún tipo de enfermedad cardiovascular (1). El aumento de este tipo de enfermedades se debe principalmente a cambios en los hábitos alimenticios, actividad física y aumento del consumo de tabaco a nivel mundial, producto de la industrialización y globalización (1). Chile no escapa de esta realidad, desde 1969 hasta la fecha estas enfermedades son la principal causa de mortalidad, donde aproximadamente el 45% ocurre en personas entre 35 y 74 años. En este grupo etario, las tasas de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares e isquémica del corazón son 1,4 y 2 veces más altas en los hombres que en las mujeres, respectivamente, según los informes del Ministerio de Salud en Chile (2). En la Encuesta Nacional de Salud del año 2003 se pueden observar datos de prevalencia de ECV en las distintas regiones del país, estos datos muestran que el riesgo cardiovascular es significativamente mayor en las regiones I, II, III, V, VIII, XII que en la Región Metropolitana, tomando en cuenta que estos datos han sido ajustados por las distintas variables como edad, sexo y nivel educacional de la población (3). Al año siguiente la Encuesta Nacional de Salud (2004) mostró que los factores de riesgo de ECV en la población chilena mayor de 17 años alcanzan una prevalencia promedio de hipercolesterolemia de 35,5%, de hipertensión arterial de 33,7% y niveles de obesidad y sobrepeso de un 60% de la población (4). En lo que concierne al sexo de la población es bien sabido que el sexo masculino tiene mayor riesgo alto y muy alto de enfermedad cardiovascular que el sexo femenino, donde existe una cantidad mayor de personas con riesgo moderado (Figura 1). Otro factor de riesgo cardiovascular es la Diabetes Mellitus tipo 2, que hasta el año 2003 se encontraba presente en el 4,2% de la población chilena adulta (3). Estos antecedentes brindan un panorama general y actual del impacto de las

enfermedades cardiacas, sus factores de riesgo en la población chilena y cómo se han ido estableciendo como una problemática nacional de salud.



**Figura 1. Riesgo cardiovascular según sexo y edad en Chile al año 2004.** Encuesta Nacional de Salud (2004)

## 1.2. Fibrilación auricular

En sentido amplio, el término enfermedad cardiovascular (ECV) puede englobar cualquier padecimiento del corazón o del sistema cardiovascular, entre los que se encuentran, las arritmias cardiacas, las cardiomiopatías, la aterosclerosis, la insuficiencia cardiaca, la hipertensión arterial y el infarto agudo al miocardio (IAM).

Se define como arritmia cardiaca a la pérdida de la sincronización del transporte de iones y el impulso eléctrico a través del miocardio. Esta patología suele presentarse como respuesta a modificaciones estructurales del corazón, manifestándose como alteraciones en el funcionamiento de canales o en la comunicación intercelular (5). Desde un punto de vista estructural se manifiestan como mal funcionamiento de válvulas o problemas en la irrigación cardiaca que terminan por cambiar el curso normal del impulso eléctrico.

Entre ellas, la fibrilación auricular (FA) es la más frecuente en la población general (6) y se caracteriza por una activación auricular rápida e irregular que conlleva a una deficiencia en la contracción. Como resultado se produce un llenado ventricular reducido y un estancamiento de la sangre en la aurícula, lo que la convierte en un factor de predisposición importante para insuficiencia cardíaca e infarto tromboembólico (7).

Cuando se presenta un paciente con FA y no se conoce a ciencia cierta el curso en el tiempo de la arritmia; entonces se declara como el primer episodio de FA. La FA paroxística es aquella caracterizada por revertir a ritmo sinusal en forma espontánea en general en menos de 24 horas y por definición en menos de 7 días. Si el paciente presenta dos o más episodios se dice que es recurrente. Por otro lado, la FA persistente, es aquella que persiste por más de 7 días, hasta que se realiza una cardioversión farmacológica o eléctrica. La FA persistente puede ser la primera manifestación de la FA u ocurrir luego de varios episodios de FA paroxística. Tanto la FA paroxística como la persistente tienen tendencia a la recurrencia. La FA permanente es aquella en la cual los intentos de cardioversión han fallado o se reinstala dentro de las 48 horas. Los casos de FA de larga duración en los cuales la cardioversión no ha sido indicada o no fue aceptada por el paciente también se incluyen en este grupo, es la FA aceptada como permanente. De la anterior clasificación se debe recordar su flexibilidad, pudiendo existir migración de pacientes desde la categoría paroxística a persistente y de ésta a permanente.

La prevalencia de FA en la población mundial fluctúa entre 0,7-1%, alcanzando un 0,1% en población joven, 2-3% en mayores de 45 años, un 5% entre mayores de 65 años y un 8-9% en octogenarios. La FA incrementa significativamente la morbilidad, afectando negativamente la calidad de vida, aumentando al doble la mortalidad en los individuos que la presentan (8-17). Adicionalmente, la FA es una frecuente complicación de diversos desórdenes cardíacos, metabólicos y de cirugías de bypass coronario, alcanzando un 25%-40% de incidencia en los post operados (18). Además esta arritmia es más frecuente en pacientes mayores de 63 años y que tienen antecedentes de cirugía cardíaca previa o

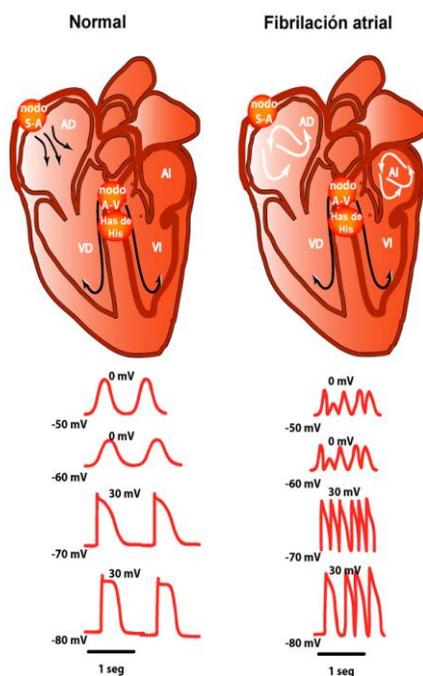
requieren un mayor número de puentes aorto-coronarios. Por otra parte, la FA post-operatoria se correlaciona con el tamaño de la aurícula izquierda y con un menor empleo de bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos en el preoperatorio (19). Desde el punto de vista clínico, la aparición de FA post-operatoria se asocia con riesgos aumentados para otras patologías y una estadía hospitalaria más prolongada, derivando así además en costos económicos indeseados y afectando la calidad de vida del paciente (20-24).

### **1.2.1 Bases moleculares de la conducción cardiaca y fibrilación auricular**

El ritmo cardiaco normal es comandado por las células marcapaso del nódulo sinusal, desde allí parte el impulso eléctrico que primeramente estimula la contracción de las aurículas y, subsecuentemente, alcanza el nódulo auriculoventricular, desde donde se propaga a través de las ramas del Az de His y la red de Purkinje hasta los ventrículos para promover su contracción. El paso de las señales eléctricas y, por tanto, la propagación del impulso está determinada por canales iónicos y transportadores electrogénicos en las células cardiacas. Estas corrientes iónicas se encuentran bien definidas en el ritmo normal, comenzando siempre con la despolarización de la membrana por la entrada de  $\text{Na}^+$ , seguida de una fase de meseta que involucra los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y una subsecuente repolarización que compete a los canales de  $\text{K}^+$ , finalmente la bomba  $\text{Na}^+ -\text{K}^+$  es la encargada de restablecer el equilibrio iónico (25). La FA puede ser explicada por variados mecanismos electrofisiológicos, entre los más estudiados se encuentran, la actividad focal, reentrada simple de circuitos y reentrada múltiple de circuitos. La actividad focal se refiere a la aparición espontánea de focos ectópicos dentro de la aurícula debido a un aumento en la despolarización auricular, estos focos ectópicos estarían entonces generando impulsos rápidos e irregulares fuera del ritmo cardiaco normal lo que se traduciría en FA.

Las arritmias causadas por simples y múltiples reentradas se caracterizan por lo que se llama remodelado eléctrico (Figura 2), que se traduce en una serie de modificaciones en la conducción de los distintos iones siendo la más importante la que ocurre a nivel de los canales lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ , ión que al acumularse acorta el período

refractario auricular y por tanto promueve el mantenimiento de estos impulsos eléctricos irregulares (26-27). Estos cambios eléctricos en la aurícula se acompañan de remodelado auricular, el cual puede ser causado por estrés metabólico, hemodinámico o inflamatorio, ya sean agudos o crónicos. El remodelado se caracteriza por dilatación y fibrosis progresiva de la aurícula izquierda que contribuye además a una falla en la conducción (21). Una explicación alternativa a este evento es que la rápida activación auricular y la acumulación de calcio causan la apoptosis de los cardiomiocitos de la aurícula, lo que desembocaría en una respuesta inflamatoria que conllevaría al remodelado estructural y, por ende, a la persistencia de FA (26).



**Figura 2. Variaciones electrofisiológicas en fibrilación auricular.** La FA puede ser causada por diversos mecanismos que finalmente provocan impulsos eléctricos rápidos y desordenados que modifican el impulso cardiaco normal.

### **1.2.2. Fibrilación auricular, inflamación y proteína C reactiva**

La inflamación es un factor de riesgo en pacientes con FA e incluso se ha sugerido que podría tener un papel causal en el desarrollo de algunas arritmias auriculares (26, 30). Por ejemplo, se ha encontrado que el nivel de proteína C reactiva (PCR), un importante marcador inflamatorio, se encuentra aumentado tanto en la FA paroxística como persistente, incluso a las pocas horas de iniciada la arritmia, por lo cual se le postula un efecto promotor de su perpetuación. Además altos niveles de PCR podría constituir un factor de riesgo para eventos vasculares y muerte (31). La evidencia de que factores inflamatorios contribuyen a la aparición de FA se sugirió primeramente a partir de su gran incidencia en pacientes post-operados de cirugía cardiaca (32,34). La activación del sistema del complemento después de la cirugía de bypass coronario, implica fuertemente a la PCR, una proteína de fase aguda que aumenta sus niveles en, al menos, un 25 % frente a un estímulo inflamatorio (26). Consecuentemente, los niveles de PCR pueden servir para predecir tanto el éxito de la conversión a ritmo sinusal como las recurrencias de la FA (32-34). Con posterioridad a la conversión a ritmo sinusal, los niveles de PCR tienden a disminuir. Por otra parte, un estudio retrospectivo en 5.806 pacientes que fueron seguidos por un promedio de 7,8 años, demostró que niveles elevados de PCR se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar FA a futuro, y que estos niveles serían más elevados si se trata de un cuadro que persiste en el tiempo. Todo lo anterior ha llevado a postular que la inflamación jugaría un papel en la génesis y en la perpetuación de la FA, como también en el proceso de remodelado auricular e incluso en la ocurrencia de tromboembolismo (11,17, 35-43).

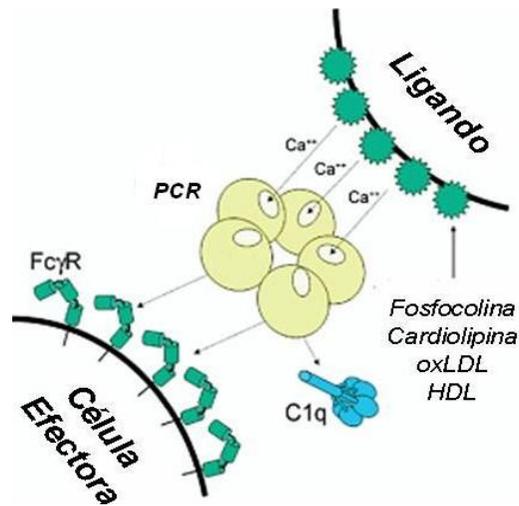
### **1.2.3 Proteína C reactiva**

La PCR es una proteína pentamérica de fase aguda que aparece en respuesta a desequilibrio homeostático. Esta proteína forma parte del sistema de inmunidad innata y su síntesis se induce en respuesta al daño tisular. La PCR es producida principalmente por

los hepatocitos y las células del músculo liso de los vasos sanguíneos. Su expresión está regulada por proteínas producidas por las distintas citoquinas pro-inflamatorias, interleuquina-1 (IL-1) e IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (44). En la estructura de esta proteína existe un sitio de unión a ligando dependiente de calcio y otro de reconocimiento para la proteína C1q del complemento, lo que se traduce en la activación del sistema y un sitio de interacción con el receptor de Fc localizado en las células mononucleares (Figura 3) (49).

En individuos sanos los valores promedio basales de PCR alcanzan 0,8 mg/L, y en presencia de estímulos inflamatorios pueden alcanzarse niveles alrededor de 10.000 veces mayores (45).

La PCR comienza a liberarse entre las 4 y 6 h post-estímulo, alcanzando sus niveles máximos a las 48 h, justamente en el momento en que se ha visto la mayor aparición de FA post operatoria (46). En lo que concierne al sistema cardiovascular se ha propuesto que la PCR tiene relación con la captación de LDL por parte de los macrófagos, acelerando el proceso aterosclerótico. Adicionalmente, diversas investigaciones han mostrado que la PCR disminuye la producción de óxido nítrico, inhibiendo la agregación plaquetaria y promoviendo la aterogénesis (47). Además, la PCR promueve la producción de moléculas de adhesión como VCAM y E-selectina a través de un aumento del factor NFκB (60). Por otra parte, ella participa en la eliminación de materiales autólogos, amplificando la activación de la vía clásica del complemento ya que se une a la lisofosfolina presente en la membrana de las células apoptóticas, e inicia su opsonificación a través de mecanismos dependientes de calcio (45,48). Los niveles de PCR en el organismo son dependientes de variados factores y se postula que a mayor edad sus niveles incrementan debido a un aumento en la apoptosis, así también depende del índice de masa corporal y más recientemente se ha vinculado a variaciones genéticas del gen de PCR heredables en un 40% (3).



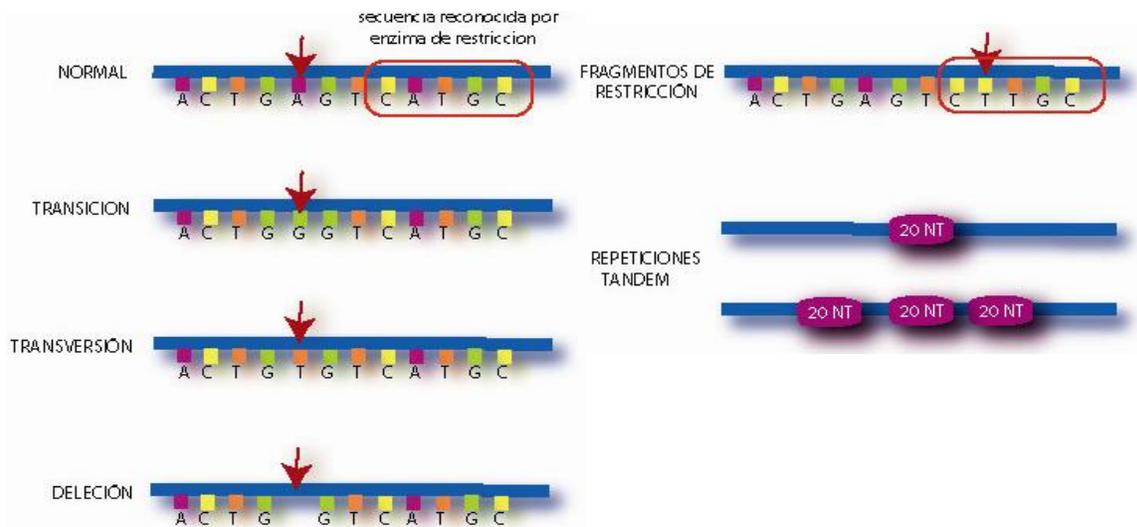
**Figura 3. Proteína C Reactiva.** (49). La PCR es una proteína de fase aguda que se compone de 5 subunidades en las cuales posee dominios de unión a ligando, dominios de unión a la proteína C1q del complemento y a los receptores Fc de las células productoras de inmunoglobulinas.

### 1.3 Farmacogenómica

Durante los últimos años se ha desarrollado una nueva ciencia que vincula los aspectos genéticos del ser humano con la farmacología y farmacodinamia. Los avances tecnológicos permiten el estudio de la variabilidad genética interindividual. La farmacogenómica aspira al desarrollo de terapias individuales y efectivas. El desarrollo de la biomedicina y genómica ha permitido investigar las bases genéticas de las enfermedades, entre ellas la FA. Una de las vertientes de la investigación farmacogenómica es la identificación de genes y sus productos que puedan asociarse a enfermedades, los que podrían constituir blancos de nuevos medicamentos (50).

Una variación genética implica un cambio de una forma alélica a otra en un gen y esta variación puede implicar la pérdida o ganancia de alguna función ya sea de manera parcial o total. Según la frecuencia con la que se observen estos cambios en la población podemos distinguir entre mutación y polimorfismo. En este último, las variaciones se

encuentran en más del 1% de la población. Se definen distintos tipos de variaciones según el cambio generado en el DNA, siendo los más frecuentes los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), generalmente originados por una transición (cambio de A por G o T por C o viceversa) o una transversión (G o A por T o C) o por deleción de una única base. Además se han definido polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción y polimorfismos de repeticiones tándem (Figura 4). Estos polimorfismos se usan para detectar e identificar genes asociados a diversas enfermedades, además de respuestas individuales a diferentes terapias farmacológicas (16, 50).

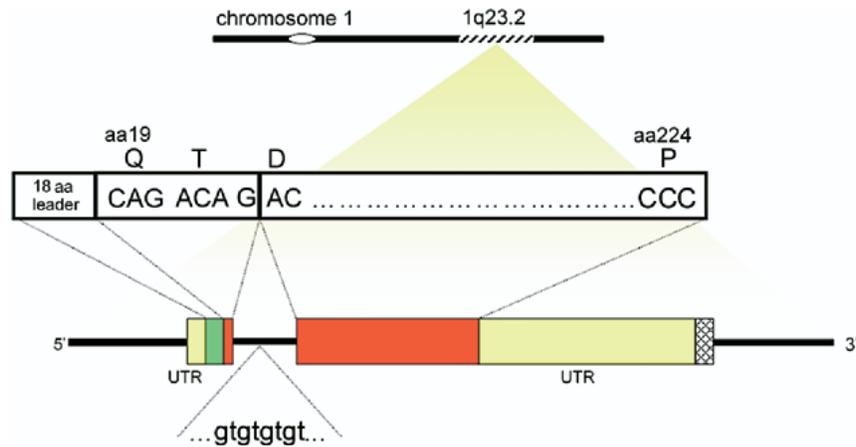


**Figura 4. Variaciones genéticas posibles en el DNA.** Existen diversos tipos de variaciones genéticas entre las cuales las más frecuentes son las variaciones de un solo nucleótido donde se encuentran las transiciones y las transversiones. Además existen otras variaciones que pueden afectar el DNA.

Es importante señalar que un polimorfismo puede ser determinante directo del fenotipo, actuar como modulador ya sea por sí mismo o en conjunto con otros factores, o jugar un papel aparentemente nulo. La identificación de genes mediadores de la susceptibilidad a desarrollar arritmias se ha postulado como un gran paso hacia el desarrollo del diagnóstico y, tal vez, de la terapéutica (13).

### 1.3.1. Gen para PCR

El gen de la PCR se localiza en el cromosoma 1 q21q23, y está formado por 2 exones. El primer exón codifica un péptido señal y los dos primeros aminoácidos de la proteína madura, mientras que el segundo codifica los 204 aminoácidos restantes de la proteína, seguido de un codón de término. Ambos exones se encuentran separados por un intrón que varía en longitud de repeticiones GT (Figura 5) (49). Se expresa en altos niveles en tejido hepático y, en menor grado, en el músculo liso y pulmón. Una vez que se describió este gen surgió la inquietud de estudiar su regulación y los niveles sanguíneos de esta proteína debido a su posible papel como predictor de eventos cardiovasculares no deseados. En la actualidad se han descrito 10 SNP para la PCR, los cuales se han asociados a un incremento en sus niveles en patologías tales como, diabetes, enfermedades cardiovasculares y lupus eritematoso (51). Estudios recientes han mostrado la asociación de los polimorfismos 2667G>C y 3014G>A con enfermedades cardiovasculares (52). Adicionalmente, se ha encontrado asociación entre algunos polimorfismos del gen de PCR y los niveles plasmáticos presentes de la proteína, entre ellos, las sustituciones exónicas en +1059G>C, en -286C>T>A, la sustitución intrónica T>A, la sustitución +1444C>T en la región no traducida (UTR) 3', las sustituciones -732A>G en la región promotora del gen de PCR y +219G>A en la secuencia lateral 3' del exón 2 del gen de PCR, y el de repetición del dinucleótido GT dentro del intrón del gen de PCR, además de otras asociaciones establecidas como haplotipos. En el caso específico del polimorfismo en +219G>A, su efecto se ha asociado a niveles plasmáticos de PCR un 70% más altos entre quienes presentan genotipo GG que entre los portadores del alelo A, por lo que resulta especialmente interesante estudiar la relación de FA y este último polimorfismo. (59)



**Figura 5. Gen de la proteína C reactiva. (49)** El gen para PCR se compone de dos exones separados por un intrón compuesto de un número variable de repeticiones GT. El primer exón codifica para un péptido señal y los dos primeros aminoácidos de la proteína madura mientras que el segundo exón codifica los 204 aminoácidos restantes.

## 2. HIPÓTESIS

El polimorfismo +219G>A del gen de PCR se asocia con la incidencia de fibrilación auricular como complicación postoperatoria en pacientes sometidos a cirugía cardiaca electiva.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia del polimorfismo +219G>A del gen de PCR se asocia con incidencia de fibrilación auricular en pacientes sometidos a cirugía cardiaca electiva.

#### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer la técnica de la reacción en cadena de polimerasa en su versión con pares de partidores contrapuestos (CTPP) para determinación del polimorfismo de sustitución +219G>A en la secuencia lateral 3' del exón 2 del gen de la proteína C reactiva.
- Determinar el polimorfismo de sustitución +219G>A en la secuencia lateral 3' del exón 2 del gen de PCR en los pacientes estudiados y comparar su frecuencia alélica entre pacientes que presentan fibrilación auricular como complicación postoperatoria con las de los que no presentan.
- Relacionar el polimorfismo de sustitución +219G>A en la secuencia lateral 3' del exón 2 del gen de PCR con la presencia de fibrilación auricular como complicación postoperatoria en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca electiva.

#### **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **5.1. Materiales**

###### **5.1.1. Equipos**

Termociclador Gene Cycler Bio-Rad, Transluminador Vilber Lourmat, cámara vertical para geles de poliacrilamida, centrífuga Heraeus Suprafuge 220, Speedvac.

###### **5.1.2. Herramientas**

Para gestionar la inclusión de los pacientes al estudio se diseñaron dos herramientas utilizadas por el equipo de investigación que consistieron en:

- Consentimiento informado aprobado por la Comisión de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, donde se especificaba el objetivo de la investigación y la

participación del paciente. Este consentimiento se leyó y posteriormente lo firmó cada una de las personas que se incluyeron en el estudio.

- Ficha especialmente diseñada para el estudio en la cual se recolectaron los datos más relevantes del paciente, en lo que respecta a la investigación.

### **5.1.3. Materiales utilizados para la toma de muestra**

Tubos Vacuteiner estériles de 5 ml tratados con EDTA, jeringas de 20 ml, algodón, alcohol 96º, tela adhesiva, guantes quirúrgicos.

### **5.1.4. Reactivos utilizados en la determinación del polimorfismo**

GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix fue adquirido en cat. M7122 Promega (Madison, WI). El marcador de DNA de 100pb se obtuvo de Winkler T. Los partidores utilizados para la amplificación del polimorfismo +219G>A se sintetizaron por Invitrogen y consistieron en:

Secuencia F1 = 5' acccaggccacaagagtg 3' 18 nt 61,1% G/C

Secuencia F2 = 5' gccacatggagagagactg 3' 19 nt 57,9% G/C

Secuencia R1 = 5' gtttgcttctgtcctcat 3' 19 nt 47,4% G/C

Secuencia R2 = 5' cttatagacctgggcagt 3' 18 nt 50,0% G/C

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Tipo de estudio**

El estudio realizado es de tipo prospectivo en que se reclutó pacientes sometidos a cirugía cardíaca electiva. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de cada uno de

los centros asistenciales participantes, dando a cada uno de los pacientes información del estudio y solicitando la firma del consentimiento informado.

### **5.2.2. Lugar de realización**

El reclutamiento de pacientes se hizo entre quienes se sometieron a cirugía cardiaca electiva en el Hospital Clínico de la Universidad Católica (HCUC) y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH). La toma de las muestras se realizó en el mismo centro asistencial. Las determinaciones de laboratorio de polimorfismo se realizaron en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

### **5.2.3. Criterios de inclusión**

- De ambos sexos.
- Pacientes mayores de 18 años con indicación de cirugía cardiaca electiva y en ritmo sinusal al momento de la operación, con función sistólica preservada (fracción de eyección de VI >45%).
- Consentimiento informado firmado

### **5.2.4. Criterios de exclusión:**

- Pacientes con cirugía de urgencia.
- Pacientes con IAM en los últimos 2 meses.
- Pacientes con antecedentes de patología neoplásica o reumatológica u otras patologías inflamatorias crónicas en tratamiento
- Pacientes con tratamiento esteroideal crónico hasta 1 mes previo a la cirugía.

- Shock cardiogénico preoperatorio.
- Pacientes con pericarditis o miocarditis aguda preoperatoria.
- Pacientes con antecedentes previos de FA.

### **5.2.5 Toma de muestra y recopilación de datos**

Los pacientes se reclutaron en los servicios de Cardiología antes mencionados. Según la revisión de fichas clínicas se decidió cuales pacientes podían participar en el estudio, analizando los criterios de inclusión y exclusión. Tras la revisión de las fichas se le explicó al paciente seleccionado el objetivo del estudio y se le pidió firmar la aprobación del consentimiento informado, luego se les entrevistó personalmente para terminar de completar los datos que ya habían sido revisados en la ficha clínica del paciente. Para aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio, una enfermera tomó una muestra de 5 ml de sangre venosa periférica que luego se llevaron a Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Unidad de Farmacogenómica, almacenándolas a 4°C para la posterior extracción del DNA genómico. Para la determinación de los niveles de PCR las muestras de sangre se obtuvieron tanto del preoperatorio como de post-operatorio.

### **5.2.6. Aislamiento y cuantificación del DNA cromosomal**

El DNA se extrajo de los leucocitos de la sangre utilizando el método de precipitación por sales. Este método consiste en la hemólisis y posterior centrifugación de la muestra para separar los glóbulos rojos del plasma y poder extraer el DNA presente en los núcleos de las células de la serie blanca mediante la utilización de medios de lisis más enérgicos. Una vez que el DNA se separó con cloruro de sodio, se precipitó con acetato de sodio y etanol frío para luego ser resuspendido con solución de TE. La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría a partir de la absorbancia a 260 nm, utilizando la siguiente fórmula: Concentración de DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) = (A<sub>260</sub>) x (50) x (factor de dilución). Dado que los aminoácidos aromáticos absorben a 280 nm, la pureza del DNA se evaluó

por la formula:  $(A260/A280) > 1,6$ ; tomándose un valor óptimo entre 1,8 y 2,0 para esta relación.

### 5.2.7. Determinación del polimorfismo +219G>A en el exón 2 del gen de PCR

Para la determinación del polimorfismo se utilizó una variación de la técnica de reacción en cadena de polimerasa, donde se confrontan dos pares de partidores. Esta técnica implica el diseño de un par de partidores para cada alelo del gen, el partidior sentido del gen del primer par (F1) se encuentra río arriba, mientras que el partidior reverso del segundo par (R2) se encuentra río abajo amplificando una región de tamaño 382 pb entre ambos (Figura 6). Luego este fragmento se amplifica por dos pares de partidores específicos para cada alelo, donde la base 3' del partidior reverso (R1) del primer par es complementaria al alelo A y amplifica solo un fragmento de 270 pb, mientras que el partidior en sentido del gen de PCR (F2) del segundo par de partidores que complementa el alelo G, amplifica un fragmento de 149 pb.

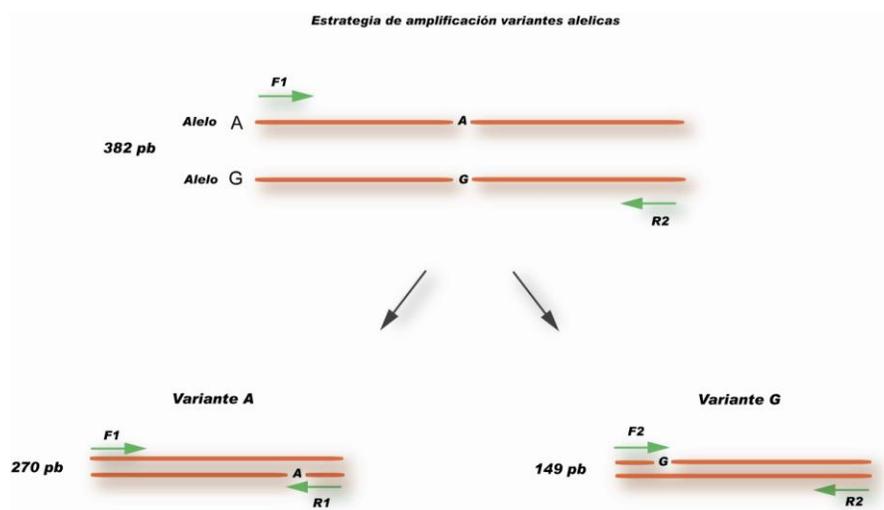


Figura 6. Estrategia de amplificación de variantes alélicas reacción en cadena de polimerasa por CTPP.

Para llevar a cabo la amplificación del DNA previamente extraído se utilizaron 4  $\mu$ l de DNA de cada muestra divididos en dos tubos Eppendorf de 0,2 ml (2  $\mu$ l en cada tubo). A cada uno de los tubos se le agregó 8,5  $\mu$ l de agua nanopura autoclavada y 12,5  $\mu$ l de GoTaq<sup>®</sup>Green Master Mix.

Se programó el termociclador de manera tal de comenzar la reacción con una denaturación del DNA a 95°C durante 2 min, posteriormente se programaron 40 ciclos de: a) 95°C por 40 seg para denaturación del DNA. b) 58°C por 40 seg para alineación de los partidores y c) 72°C por 40 seg para extensión. Finalizando con 5 min a 72°C.

Para lograr una mejor amplificación de los fragmentos requeridos a cada una de las muestras se le agregó 0,5  $\mu$ l de una solución 25  $\mu$ M de cada uno de los partidores 1 y 4 para amplificar el fragmento común durante los primeros 10 ciclos y así tener mas DNA templado para los fragmentos específicos de cada alelo. Posterior a los 10 ciclos se les agregó 0,5  $\mu$ l del partidador 2 (25  $\mu$ M) a uno de los tubos y 0,5  $\mu$ l del partidador 3 (25  $\mu$ M) al otro tubo para la amplificación específica de los alelos presentes durante los 30 ciclos posteriores. Este procedimiento se definió debido a que el partidador específico para el alelo A competía con el partidador reverso del segundo par por lo que no se podían visualizar bien las bandas en el gel de poliacrilamida. Una vez finalizada la amplificación del DNA se tomaron 15  $\mu$ l de la solución amplificada y se llevaron a un gel de poliacrilamida preparado al 8 % para así ser separados los distintos fragmentos amplificados de DNA por electroforesis en TBE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio por 10 min y las diferentes bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

Los resultados para la variante G fueron para el amplificado común F1-R2 = 382 bp y para el amplificado específico F2-R2 = 149 bp. Para la variante A, el amplificado común F1-R2 = 382 bp mientras que para el amplificado específico F1-R1 = 270 bp. (Figura 7)

### Secuencia amplificada del gen de la proteína C reactiva

```
CATCCCCGCATTCCAATAF1TACCCAGGCCACAAGAGTGGACGTGAACCACAGGGTGTCCTGTCCAGAGGAGCCCATCTC
CCATTTCCCAGCTCCCTATTTGGAGGATAGTTGGATAGTTACGTGTTCCCTAGCAGGACCAACTACAGTCTTCCAAG
GATTGAGTTATGGACTTTGGGAGTGAGACATCTTTTGGCTGCTGGATTTCCAAGCTGAGAGGACGTGAACCTGGGACC
ACCAGTAGCCATCTTGTF2TGCCACATGGAGAGAGACTGTGAGGACAGAAGCCAACTGGAAGTGGAGGAGCCAAGGGA
R1TACTCCTGTCTTCGGTTG
TTGACAAACAACAGAGCCTTGACCACGTGGAGTCTCTGAATCAGCCTTGCTGGAACCAGATCTACACCTGGACTGCC
R2TGACGG
CAGGTCTATAAGCCAATAAAGCCCTGTTTACTTGAGTGAGTCCAAGCTGTTTTCTGATAGTTGCTTTAGAAGTTGTG
GTCCAGATATTC
```

**Figura 7. Ubicación de los partidores utilizados en el gen de la proteína C reactiva para encontrar el polimorfismo +219G>A.**

#### 5.2.8. Expresión de resultados y análisis estadístico

Las frecuencias alélicas se calcularon usando los métodos estándares para el conteo de genes. Se usaron las pruebas de  $\chi^2$  para evaluar las asociaciones entre FA y las diversas características presentes en los casos como: sexo, HTA, dislipidemia, diabetes, consumo de estatinas y  $\beta$ -bloqueadores, considerándose como significativos aquellos resultados que presentaron un valor de  $p < 0,05$ . Para la comparación de medias de PCR antes y después de la cirugía entre los diferentes genotipos se utilizó el análisis estadístico para muestras no paramétricas de Kruskal- Wallis. Para la comparación de medias de PCR frente a pacientes con y sin FA se utilizó el análisis estadístico para muestras no paramétricas de Mann-Whitney. Se utilizó la ecuación de Hardy-Weinberg ( $p^2+2pq+q^2$ ) para evaluar el equilibrio poblacional en la muestra estudiada, considerándose valores cercanos a 1 característicos de una población que ha alcanzado un estado de inercia

evolutiva. Algunos de los resultados se expresaron en porcentajes y otros como promedio  $\pm$  desviación estándar.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estandarización de la técnica de reacción en cadena de polimerasa CTPP.

La genotipificación de los pacientes se llevó a cabo por la reacción en cadena de polimerasa-CTPP anteriormente descrita. La estandarización de este SNP permitió obtener los fragmentos de DNA mostrados en la Figura 7, la que corresponde a la fotografía de un gel de poliacrilamida al 8 % bajo la luz UV. Se trabajó con esta variante metodológica debido a la inexistencia de una enzima de restricción que reconociera el sitio de corte específico en los fragmentos amplificados. En la Figura 7 se aprecian bandas a 382 pb correspondiente al fragmento de DNA común en todos los pacientes. La banda de 270 pb corresponde al fragmento que posee al alelo A mientras que la de 147 pb corresponde al alelo G.

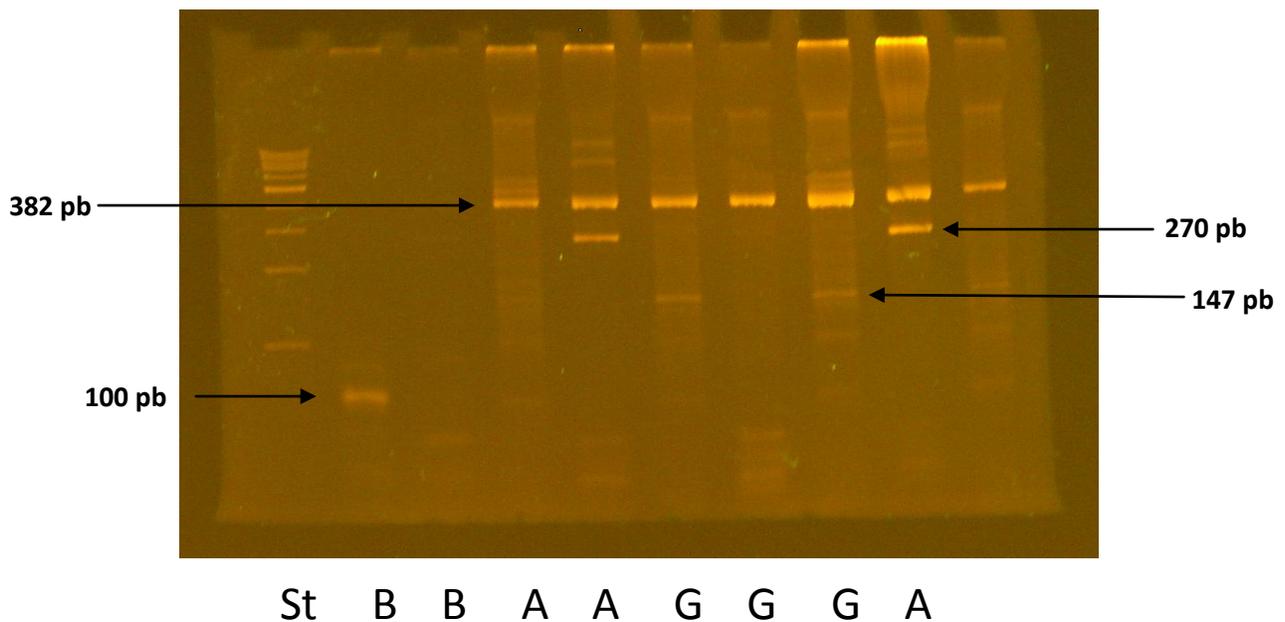


Figura 7. Visualización UV de las bandas del polimorfismo en gel de poliacrilamida 8%. St estándar de tamaño de DNA, B corresponde al blanco sin DNA, G corresponde a alelo G y A corresponde al alelo A

## 6.2. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo +219G>A del gen de PCR

Se genotipificaron 109 pacientes en ambos centros hospitalarios. La Tabla 1 muestra las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas para el polimorfismo +219G>A del gen de PCR en la totalidad de los pacientes reclutados al inicio del estudio. Las frecuencias genotípicas fueron 0,394 para el homocigoto GG y de 0,303 para el homocigoto AA y el heterocigoto GA, respectivamente. Las frecuencias alélicas fueron de 0,546 y 0,454 para los alelos G y A, respectivamente. Al realizar el estudio de equilibrio de Hardy–Weinberg para las respectivas frecuencias alélicas el valor obtenido es 1, lo que señala que existe un equilibrio evolutivo entre los alelos estudiados dentro de la subpoblación previamente escogida.

**Tabla 1. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo +219G>A del gen de PCR**

SNP	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica		
+219G>A n= 109	G=0,546	A=0,454	GG=0,394 n=43	GA=0,303 n=33	AA=0,303 n=33

Ecuación que establece el Equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$p^2+2pq+q^2 = (0,546)^2 + 2(0,546)(0,454) + (0,454)^2 = 1,00$$

## 6.3. Características clínicas de los pacientes

Las características clínicas mostradas en la Tabla 2 corresponden al universo de pacientes que finalizaron el estudio. De los 109 pacientes genotipificados, 10 se retiraron del estudio por lo que no se realizó su asociación con FA, mientras que otros tres pacientes no fueron evaluados clínicamente para FA por lo que el universo total de pacientes evaluados en el estudio es de 96. De estos 96 pacientes 79 fueron de sexo masculino. El promedio de edad fue de  $61,4 \pm 11,1$  años. A pesar del gran rango de edad que presentaron los pacientes, el 57% fue mayor de 60 años. En lo que respecta a los factores de riesgo cardiovascular, la hipertensión arterial resultó ser el más frecuente,

presentándose en un 47,9% de los pacientes del estudio. El 41,7 % presentó dislipidemia y un 24% diabetes mellitus tipo 2. La incidencia de FA postoperatoria fue de 26% y los niveles promedio de PCR preoperatorio y postoperatorio fueron de  $3,46 \pm 7,37$  y  $76,2 \pm 82,98$  mg/L, respectivamente (n=70). El uso preoperatorio de estatinas y  $\beta$ -bloqueadores fue un 46,9% de los pacientes para cada medicamento. Mientras que el consumo de cualquier otro medicamento no perteneciente a este grupo fue de 40,6%.

**Tabla 2. Características clínicas**

Característica	Valor
N	96
Edad (años)	$61,4 \pm 11,1$
Hombres (%/n)	82,3(79)
FA (%/n)	26
Enfermedades concomitantes (%/n) (n=98)	
Hipertensión arterial	47,9(46)
Dislipidemia	41,7 (40)
Diabetes mellitas	24 (23)
Medicamentos (%/n) (n=98)	
Estatinas	46,9 (45)
$\beta$ -bloqueadores	46,9 (45)
Otros medicamentos	40,6% (39)
Niveles de PCR (media $\pm$ SD) (mg/L)	
Preoperatorio (n=70)	$3,4 \pm 7,4$
Postoperatorio (n=70)	$76,2 \pm 83,0$

FA= fibrilación auricular, Análisis estadístico de  $\chi^2$

#### 6.4. Relación entre factores de riesgo cardiovascular y fibrilación auricular.

La Tabla 3 muestra la relación entre los factores de riesgo cardiovascular más importantes y frecuentes y la presencia o ausencia de FA luego de la cirugía. Entre los factores analizados se encuentran, la edad, el sexo, la HTA, la dislipidemia y la DM. Como se muestra en la tabla, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de HTA (p=0,244), dislipidemia (p=0,346) y diabetes (p=0,415), a su vez, el grado de significancia en la diferencia de sexo no alcanzó significancia estadística con un valor de

p= 0,063. Se observó que el promedio de edad de esos pacientes que desarrollaron FA post-operatoria fue significativamente mayor que el promedio de edad de quienes no la presentaron (p=0,0086).

**Tabla 3. Factores de riesgo cardiovascular**

	Fibrilación Auricular		P	OR (IC 95%)
	Presente	Ausente		
Edad promedio	66,7 ± 11,7	59,9 ± 10,3	0,0086**	
<b>Sexo</b>				
Masculino	17	62	0,063*	3.242 (1.086 – 9.675)
Femenino	8	9		
<b>HTA</b>				
Si	9	37	0,244*	1.93 (0.755-4.9)
No	16	34		
<b>Dislipidemia</b>				
Si	8	32	0,346*	1,74(0,66-4,52)
No	17	39		
<b>Diabetes Mellitus</b>				
Si	4	19	0,415*	1,91(0,58- 6,31)
No	21	52		

\*Análisis estadístico de  $\chi^2$ . \*\*Análisis estadístico de t-student.

### 6.5. Relación entre el consumo de estatinas y $\beta$ -bloqueadores y la aparición de FA postoperatoria.

La Tabla 4 presenta los resultados frente al consumo de dos tipos de medicamentos y su relación con la aparición de FA. La ausencia de consumo preoperatorio de estatinas mostró ser un factor de predisposición para la aparición de FA postoperatoria con un riesgo relativo de 7,16. Mientras que para el uso preoperatorio de  $\beta$ -bloqueadores se observó un efecto protector reflejado en una diferencia significativa en relación a FA con un valor de p=0,036.

**Tabla 4. Medicamentos y fibrilación auricular**

	Fibrilación Auricular		P	OR (IC 95%)
	Presente	Ausente		
<b>Estatinas</b>				
No	21	30	<0,001*	7.16 (2,2-23,1)
Si	4	41		
<b>β-bloqueadores</b>				
No	18	33	0,036*	3,0 (1,1 -7,9)
Si	7	38		

\* significancia por análisis estadístico de  $\chi^2$

### 6.6. Comparación de los niveles de PCR pre y postoperatorios en relación al genotipo

En la Tabla 5 se observa que al comparar los niveles sistémicos de PCR para los diferentes genotipos no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre estos y sus respectivas medias ya sea para niveles pre o postoperatorios.

**Tabla 5. Niveles de PCR y genotipos del polimorfismo +219G>A**

Genotipo	Nivel de PCR (mg /L)			
	Preoperatorio	*P	Postoperatorio	*P
GG	3,21 ± 8,23	0,107	78,10 ± 83,57	0,573
GA	5,43 ± 8,59		91,56 ± 94,60	
AA	1,78 ± 3,09		58,01 ± 71,34	

\*Análisis estadístico de Kruskal-Wallis.

### 6.7. Comparación de los niveles de PCR pre y postoperatorios en relación a la aparición de FA.

La Tabla 6 muestra que los niveles sistémicos de PCR en pacientes que presentaron FA y en pacientes que no la presentaron no difirieron significativamente antes de la cirugía ni tampoco al realizar el análisis después de la cirugía. Los valores de PCR preoperatorio fluctuaron entre 2 mg/L a 17 mg/L, mientras que para valores después de la cirugía la fluctuación ocurrió entre 46 mg/L llegando incluso a valores de 180 mg/l.

**Tabla 6. Niveles de PCR y presencia de fibrilación auricular**

Presencia FA	Nivel de PCR (mg/L)			
	Preoperatorio	*P	Postoperatorio	*P
Si	5,45 ± 12,50	0,662	46,97 ± 62,43	0,214
No	2,57 ± 3,68		86,33 ± 87,55	

\*Análisis estadístico de Mann-Whitney.

## 7. DISCUSIÓN

La fibrilación auricular es una de las patologías cardiovasculares más frecuentes en la población mundial y también en Chile, particularmente en las personas de edad avanzada (8-10). La FA exhibe una alta incidencia en el postoperatorio de cirugías cardíacas, por lo que nuestro estudio buscó determinar si existe una mayor susceptibilidad a la aparición de FA y exámenes preeliminarios a la cirugía, como lo son los exámenes de PCR, para así poder prever y prevenir la aparición de cualquier efecto no deseado relacionado con esta arritmia o con los niveles de esta proteína.

Los estudios realizados muestran que los diversos factores de riesgo cardiovascular incrementan en cierto grado la probabilidad de fibrilación auricular (61). En el presente estudio se relacionaron las características clínicas de estos pacientes con FA con el fin de comparar los resultados con los de otros grupos de investigación y además verificar si la subpoblación chilena estudiada seguía los mismos patrones. A su vez al realizar la caracterización de estos pacientes se puede inferir qué tipo de paciente es el más frecuentemente sometido a cirugía cardíaca en nuestro país. Auer *et al.*, 2005, realizó un estudio en 254 pacientes donde se mostró que la edad es un factor significativamente influyente en la aparición de FA postoperatoria, Fatkin *et al.*, 2007, muestra resultados bibliográficos similares haciendo notar que la prevalencia para mayores de 80 años es de casi 10%. En el presente estudio los pacientes alcanzaron una edad promedio de  $61,6 \pm 11,1$ , y la diferencia de los promedios entre el grupo con FA y sin FA postoperatoria fue estadísticamente significativa, el grupo con FA tuvo un promedio además mayor a los 65 años, es en este grupo etario (mayor a 65 años) donde la incidencia comienza a ser mayor (8-17), mientras que el valor promedio para pacientes sin FA postoperatoria no alcanzó los 60 años ( $p= 0,0086$ ). Diversos estudios han mostrado que el mayor factor de predisposición es efectivamente la edad, mientras que al igual que en este estudio, otros factores de riesgo cardiovascular no son mayormente influyentes en la aparición de esta complicación. Taylor *et al.*, 2005, en un estudio realizado en 100 pacientes sometidos a

cirugía cardíaca y monitoreados durante ésta mostró que las características del grupo con aparición de FA no se diferenciaban de las características clínicas del grupo sin FA. Apoyando los resultados obtenidos en este estudio en lo que concierne a hipertensión, diabetes mellitas y sexo. Lo *et al.*, 2005, en su estudio a 152 pacientes sometidos a cirugía cardíaca encontró que solo la edad, el tipo de cirugía (parámetro no estudiado en este estudio) y los niveles basales de PCR eran buenos predictores de fibrilación auricular. Por otra parte se llevó un seguimiento de los medicamentos administrados previos a la cirugía, pertenecientes al grupo de las estatinas y  $\beta$ -bloqueadores, esta elección fue basada en literatura que comenta la existencia de una relación entre estos grupos de medicamentos y la protección que estos producen frente a fibrilación auricular, dato que fue corroborado en esta trabajo al verse demostrado estadísticamente que el grupo que consumía estatinas presentó una diferencia significativamente menor en la aparición de FA ( $p=0,002$ ). En lo que concierne a los niveles de PCR estos no se vieron afectados por la presencia de los distintos genotipos, no hubo diferencias significativas entre ellos tanto para los niveles preoperatorios y postoperatorios de la proteína en cuestión. En el 2003 la American Heart Association (AHA) estableció a la PCR como el marcador inflamatorio de elección para establecer el riesgo cardiovascular. Establecieron además límites para diferentes categorías de riesgo, bajo riesgo  $< 1.0$  mg/L, riesgo moderado  $1.0-3.0$  mg/L, riesgo alto mayor a  $3.0$  mg/L. En este estudio además se realizó el análisis de los niveles de PCR para los pacientes que presentaron FA y los que no presentaron FA también para niveles pre y postoperatorios sin presentar tampoco mayores diferencias entre ambos grupos. Por lo que se puede concluir que este polimorfismo en particular no tiene relación con la presencia de FA post cirugía cardíaca. Otros autores han descrito que los niveles de IL-6 podrían ser un factor predictor de ECV e incluso de FA ya que la inflamación es un factor clave en la perpetuación de esta patología. Por otra parte, Conway *et al.* 2004, realizaron un estudio en el cual se reclutaron 77 pacientes recurrentes de FA, y sus resultados mostraron que los niveles de IL-6 son un buen predictor de accidentes cerebrovasculares en este tipo de pacientes. Los resultados obtenidos por Marcus *et al.* 2008, asocian los niveles de IL-6, particularmente un genotipo del gen de esta citoquina,

con la aparición de FA en pacientes con cardiopatía coronaria. Por estos motivos y además debido a la complejidad de esta patología dada la influencia de múltiples factores tanto genéticos como ambientales, sería necesario analizar si polimorfismos del gen de este antecesor de la PCR en la cascada inflamatoria podrían llegar a afectar la aparición de FA en los pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Otra posibilidad existente es que debida la fuerte asociación existente entre la PCR y la IL-6 tal vez no son variaciones genéticas por separado las que provocarían una predisposición a desarrollar enfermedades cardiovasculares sino la asociación de varios polimorfismos de los distintos genes participantes en el proceso inflamatorio que perpetúa la FA.

El análisis de todos estos parámetros tanto clínicos como bioquímicos y los resultados presentados en este estudio son un primer paso hacia la realización de análisis más rigurosos y con un mayor número de pacientes, con la tarea de profundizar y demostrar con seguridad los vínculos y el valor de cada uno de estos parámetros en relación con la fibrilación auricular, ya sean factores de riesgo modificables o no modificables conocidos, o aquellos factores que pudieran llegar a tomar una mayor importancia al momento de prevenir las enfermedades cardiovasculares y las complicaciones a las que conllevan. Las limitaciones de este estudio son variadas y es por estos motivos que se requeriría de mayor rigurosidad y análisis. La mayor limitación de este trabajo fue el pequeño número de pacientes reclutados en el estudio dada la baja frecuencia en que se realizaban las intervenciones quirúrgicas además de la gran cantidad de criterios de exclusión, que dejan fuera a un grupo de pacientes bastante numeroso que se somete a la cirugía pero no se incluyen en el estudio. Otro importante factor limitante fue el monitoreo y la pesquisa de los casos de fibrilación auricular, ya que los pacientes luego de la operación eran llevados a la unidad coronaria donde son monitorizados por solo 24 horas, mientras que se ha descrito que la gran mayoría de los eventos de FA ocurren a las 48 horas después de la operación, por lo que probablemente bastantes casos pudieran ser falsos negativos y haber presentado FA sin que se haya notificado. Además solo se realizó una revisión de fichas clínicas para verificar la presencia del

evento por lo que existe la posibilidad de errores humanos en la pesquisa de FA. Pese a los inconvenientes, el trabajo muestra un enfoque diferente y propone a la farmacogenómica como una ciencia en desarrollo que podría ayudar a solucionar problemas que con no se han resuelto con las terapias hasta ahora utilizadas.

## 8. CONCLUSIONES

- La aparición de fibrilación auricular se manifestó en el 26% de los pacientes estudiados.
- El sexo masculino mostró una mayor recurrencia a cirugía cardiaca electiva presentando el 82.3% de la población estudiada.
- La población analizada presentó frecuencias alélicas acordes con el equilibrio de Hardy-Weinberg.
- No se encontró relación entre la presencia del polimorfismo +219G>A del gen de la proteína C reactiva y la aparición de fibrilación auricular post operatoria de cirugía cardiaca.
- Tampoco se encontró relación entre el polimorfismo mencionado y los niveles plasmáticos de la proteína.
- No hubo relación entre los niveles de proteína C reactiva plasmáticos y la aparición de fibrilación auricular como efecto secundario a la operación.
- Los pacientes que consumían estatinas previo a la operación presentaron una menor frecuencia de fibrilación auricular que mostró diferencias significativas con aquellos pacientes que no las consumían.
- La edad resultó ser el mejor factor predictivo de fibrilación auricular post operatoria. Existiendo una diferencia significativa entre los promedios de edad del grupo que presentó y que no presentó fibrilación auricular.

## 9. REFERENCIAS

- (1) <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/cvd/en/>
- (2) Ministerio de Salud. Norma Técnica N°8 Exenta N° 799 Hipertensión Arterial, Programa Salud Adulto Mayor 1995. [www.minsal.cl](http://www.minsal.cl)
- (3) Kolz M, Koenig W, Muller M. DNA variants, plasma levels and variability of C-reactive protein in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study. *Eur Heart J*. 2008; 29:1250-8.
- (4) Mizón C, Atalah E. Transición epidemiológica en Chile: lecciones aprendidas del proyecto North Karelia. *Rev Chil Nutr*.2004; 31: 276-282.
- (5) Shah M, Akar FG, Tomaselli GF. Molecular basis of arrhythmias. *Circulation*. 2005; 112: 2517-2529.
- (6) [http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/16\\_1\\_Fibrilacion\\_y\\_Flutter\\_Auricular06.pdf](http://www.med.uchile.cl/apuntes/archivos/2006/medicina/16_1_Fibrilacion_y_Flutter_Auricular06.pdf) 24-11-07
- (7) Fatkin D, Otway R, Vandenberg JI. Genes and atrial fibrillation: a new look at an old problem. *Circulation* 2007; 116:782-792.
- (8) Veenhuyzen GD, Simpson CS, Abdollah H. Atrial fibrillation. *CMAJ*.2004; 171:755-760.
- (9) Wyse DG, Gersh BJ. Atrial fibrillation: A perspective. Thinking inside and outside the box. *Circulation*.2004; 109:3089-3095.
- (10) Brundel B, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns H. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002;54: 315-324.
- (11) Korantzopoulos P, Kolettis T, Siogas K, Goudevenos J. Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. *Med Scie Monit*. 2002; 9:225-229.
- (12) Thijssen V, Ausma J, Borgers M. Structural remodeling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res*. 2001; 52(1):14-24.

- (13) Roden DM. Human Genomics and its Impact on Arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med.* 2004; 14:112-116.
- (14) Kim YH, Lee JH, Lim DS, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim M. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med.* 2003; 35:336-349.
- (15) Hersi A, Wyse DG. Management of atrial fibrillation. *Curr Prob Cardiol.* 2005;30:175-233.
- (16) Mestroni L. Genomic medicine and atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41:2193-2196.
- (17) Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, Tracy R, Van Wagener DR, Psaty BM, Lauer MS, Chung MK. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation.* 2003;108:3006-3010.
- (18) Villareal R, Hariharan R, Liu B, Kar B, Lee V, Elayda M, Lopez J, Rasekh A, Wilson J, Massumi A, Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 43:742–8.
- (19) Murphy GJ, Ascione R, Caputo M, Angelini GD. Operative factors that contribute to post-operative atrial fibrillation: insights from a prospective randomized trial. *Card Electrophysiol Rev.* 2003;7:136-139.
- (20) Fontes M L., Mathew J P., Rinder HM. Atrial fibrillation after cardiac surgery/ cardiopulmonary bypass is associated with monocyte activation, *Anesth Analg.* 2005; 101:17–23
- (21) Boos C J, Anderson R A, Lip G Y. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J.* 2006; 27, 136–149.
- (22) Taylor D, Groen J G, Thorn S L. New insights into onset mechanisms of atrial fibrillation and flutter after coronary artery bypass graft surgery, *Heart.* 2002; 88;499-504
- (23) Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 2002;415; 219-226.
- (24) Siebert J., Anisimowicz L., Lango R. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: does the type of procedure influence the early postoperative incidence? *J Cardiothorac Sur.* 2001;19: 455-459.

- (25) Cardiovascular Physiology. David E. Mohrman, Lois Jane Heller Colaborador David E. Mohrman, Lois Jane Heller Publicado por McGraw-Hill Professional, 2002.
- (26) Engelmann M, Svendsen J H. Inflammation in the genesis and perpetuation of atrial fibrillation *Eur Heart J*. 2005; 26; 2083–2092.
- (27) Van Wagoner D R. and Nerbonne J M. Molecular Basis of Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation *J Mol Cell Cardiol* . 2000;32, 1101–1117.
- (30) Aviles R J, Martin D O., Apperson-Hansen C. Inflammation as a Risk Factor for Atrial Fibrillation *Circulation* 2003;108;3006-3010.
- (31) Conway D S, Buggins P, Hughes E. Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2004; 148:462-6.
- (32) Anders J. Ahlsson, Lennart Bodin, Olof H. Lundblad, Postoperative atrial fibrillation is not correlated to C-Reactive protein. *Ann Thorac Surg* 2007;83:1332–7
- (33) Bernard Lo, Rob Fijnheer, Arno P. Nierich, C-Reactive Protein is a risk indicator for atrial fibrillation after myocardial revascularization. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1530 – 5
- (34) Chung K, Martin D O, Sprecher D. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation, *Circulation*. 2001; 104:2886-2891.
- (35) Abdelhadi RH, Chung MK, Van Wagoner DR. Editorial: New hope for the prevention of recurrent atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2004;25:1089-1090.
- (36) Conway D, Buggins P, Hughes E, Lip G. Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am Heart J*. 2004; 148:462-466.
- (37) Psychari SN, Apostolou TS, Sinos L. Relation of elevated C-reactive protein and interleukin-6 levels to left atrial size and duration of episodes in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol* . 2005; 95:764-767.
- (38) Dernellis J, Panaretou M. Relationship between C-reactive protein concentrations during glucocorticoid therapy and recurrent atrial fibrillation. *Eur Heart J*. 2004;25:1100-1107.
- (39) Folkeringa RJ, Tieleman RG, Crijns H. Non-antiarrhythmic drugs to prevent atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2004; 4:516-518.

- (40) Chung MK, Martin DO, Sprecher D. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias. *Circulation*. 2001;104:2886-2891.
- (41) Gaudino M, Andreotti F, Zamparelli R. The -174G/C Interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication?. *Circulation*. 2003; 108 Suppl 1:II195-9.
- (42) Sata N, Hamada N, Horinouchi T, Amitan. Is inflammation a consequence or a cause of atrial fibrillation?. *Jpn Heart J*. 2004; 45:441-445.
- (43) Anderson JL, Allen Maycock CA, Lappe DL. Frequency of elevation of C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 2004; 94:1255-1259.
- (44) Springall del Villar M y Bojalil Parra R. Proteína C reactiva más que un marcador sistémico de inflamación. *Contactos*.2006; 60:37-41.
- (45) G.M. HIRSCHFIELD and M.B. . C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *Q J Med*. 2003; 96:793-807
- (46) Ahlsson A J, Bodin L, Lundblad O H, Postoperative atrial fibrillation is not correlated to C-reactive protein. *Ann Thorac Surg*. 2007;83:1332-7.
- (47) Yaron G, Brill A, Dashevsky O. C-reactive protein promotes platelet adhesion to endothelial cells: a potential pathway in atherothrombosis. *Br J Haematol*. 2006; 134:426-31.
- (48) Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2000;192:1353-64.
- (49) Hage F G, Szalai A J, C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1115-22.
- (50) Wolf CR, Smith G, Smith RL. Pharmacogenetics. *BMJ*.2000; 320:987-990.
- (51) 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 Immun* 2002; 3:14-19.

- (52) 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.
- (53) Suk HJ, Ridker PM, Cook NR, Zee RYL. Relation of polymorphism within the C-reactive protein gene and plasma CRP levels. *Atherosclerosis*.2005; 178:139-145.
- (54) Szalai AJ, Alarcón GS, Calvo-Alén J, Toloza SM, McCrory MA, Edberg JC, McGwin G Jr, Bastian HM, Fessler BJ, Vilá LM, Kimberly RP, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US Cohort (LUMINA). XXX: association between C-reactive protein (CRP) gene polymorphisms and vascular events. *Rheumatology*. 2005; 44:864-8.
- (55) Spek CA, Koster T, Rosendaal FR, Bertina RM, Reitsma PH. Genotypic variation in the promoter region of the protein C gene is associated with plasma protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.1995; 15:214-218.
- (56) Aiach M, Nicaud V, Alhenc-Gelas M, Gandrille S, Arnaud E, Amiral J, Guize L, Fiessinger J, Emmerich J. Complex association of protein C gene promoter polymorphism with circulating protein C levels and thrombotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* .1999; 19:1573-1576.
- (57) Kovacs A, Green F, Hansson L, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson C, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. 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.
- (58) Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GDO, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. 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.
- (59) Obisesan T, Leeuwenburgh C, Phillips T, Ferrell RE, Phares DA, Prior SJ, Hagberg JM. 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.
- (60) Osman R, L'Allier PL, Elgharib N, Tardif J. Critical appraisal of C reactive protein throughout the spectrum of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2006; 2: 221–237.

- (61) Lange L, Carlson C S, Hindorff L, Lange E, Walston J, D ,Cushman M, Bis J, Zeng D, Lin D, Kuller L, Nickerson D, Psaty B, Tracy R, Reiner A. Association of polymorphisms in the CRP gene with circulating c-reactive protein levels and cardiovascular events. *JAMA*. 2006;296:2703-2711