



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

“Análisis de los SNPs rs10801999 de CASQ2, rs185788586 de CACNA1C y rs11869286 de TCAP en la población del estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA)”.

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Abigail Urbina Córdova

Matrícula: 2133061026

ASESORES

Interno: Dra. Rebeca Córdova Moreno _____

Número económico: 17857

Externo: Dra. Leonor Jacobo Albavera _____

Resumen

El presente informe documenta las actividades que se realizaron durante el servicio social, el cual se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en el mundo. En México, las enfermedades isquémicas ocupan el primer lugar como causa de defunción y, dentro de estas enfermedades, la enfermedad arterial coronaria se considera una enfermedad compleja que, además de tener un componente genético, también tiene un componente ambiental.

Se analizaron tres SNP (Polimorfismos de un Solo Nucleótido) en casos de enfermedad arterial coronaria (EAC) y en controles del estudio de la Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA) para evaluar su posible asociación con la enfermedad y con parámetros metabólicos de riesgo cardiovascular. Para este proyecto se seleccionaron 846 muestras de ADN de individuos sanos las cuales se utilizaron para el SNP rs11869286, 1457 muestras para el SNP rs10801999 y 1218 muestras para el SNP rs185788586. Para determinar la asociación entre los SNPs estudiados y el riesgo de EAC, se utilizó un modelo de regresión logística donde el nivel de *significancia estadística* fue de establecido con un valor de $P < 0.05$. Los resultados muestran que ninguno de los tres SNPs analizados se asoció significativamente con la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad arterial coronaria, SNP, riesgo cardiovascular, PCR.

ÍNDICE

Marco Institucional.....	1
Introducción.....	1
Antecedentes del proyecto.....	2
Ubicación geográfica.....	3
Objetivos.....	3
Especificación de las actividades de acuerdo al calendario propuesto.....	4
Impacto de las actividades del servicio social	6
Aprendizaje y habilidades obtenidas.....	7
Fundamento de las actividades.....	8
Referencias.....	¡Er

ror! Marcador no definido.

1. Marco institucional

El presente informe documenta las responsabilidades y actividades que se realizaron durante el servicio social con una duración de 480 horas, el cual se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en el Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares. El INMEGEN es una institución de investigación perteneciente a la Secretaría de Salud. Tiene sus orígenes en el consorcio promotor integrado por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD), hasta que el 19 de julio de 2004 el entonces presidente de México, Vicente Fox, firma el decreto para la creación del instituto. Su principal objetivo es el de investigar el genoma humano de los mexicanos, tener un compromiso para resolver problemas reales en el ámbito de la salud de los mexicanos, contribuir al desarrollo de proyectos de investigación científica y en la formación de recursos humanos de excelencia y con apego a principios éticos, universales y de respeto a los derechos humanos (González B. 2017).

2. Introducción

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en el mundo. En México, las enfermedades del corazón representaron casi 20% de las defunciones totales en el país en 2015, y de acuerdo con información del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), dentro de las defunciones totales, las enfermedades isquémicas ocupan el primer lugar como causa de defunción con 68.5%. Además de un componente genético, se han encontrado asociaciones a factores de riesgo cardiovascular, como el colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), la edad, la obesidad, el tabaquismo, los niveles bajos de colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), los triglicéridos, la diabetes mellitus, y la hipertensión. Las enfermedades cardiovasculares se clasifican como una enfermedad compleja, aunque existen formas de presentación

con un patrón de herencia mendeliana simple, como la hipercolesterolemia familiar. Las enfermedades complejas pueden estar asociadas a múltiples polimorfismos de genes, interactuando con otros factores de riesgo cardiovascular (Rodríguez-Esparragón *et al.*, 2011).

Se han utilizado estudios de asociación para mapear los genes causales de la enfermedad arterial coronaria. Los estudios de asociación generalmente siguen un diseño de casos y controles e investigan los genes candidatos que se considera, por su función, que pudieran estar involucrados en la fisiopatología de la enfermedad (Portilla C *et al.*, 2014). Al comparar la frecuencia de los polimorfismos genéticos en los casos y controles, se puede determinar si estos polimorfismos están asociados con la enfermedad o no. El tipo de polimorfismo más utilizado en estos estudios es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que consiste en una variación en una base en la secuencia de ADN; estos enfoques han permitido determinar nuevas posibles rutas patológicas de la enfermedad, contribuyendo a identificar poblaciones susceptibles de riesgo. Por tanto, el objetivo de este proyecto es analizar tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en casos de Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) y en controles del estudio de Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA) para evaluar su posible asociación con la enfermedad y con parámetros metabólicos de riesgo cardiovascular, con el fin de aportar información sobre los posibles factores genéticos responsables del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares.

3. Antecedentes del proyecto

El proyecto surgió hace 10 años en colaboración con el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICh), para evaluar la posible asociación de distintos SNPs con la EAC y con parámetros metabólicos que son considerados como factores de riesgo cardiovascular. Dado que los factores de riesgo clásicos sólo explican algunos casos, se están buscando nuevos factores etiológicos en el ámbito de la genética molecular. Los polimorfismos son mutaciones del ADN, que a veces alteran la función de la proteína codificada, son frecuentes y pueden ser un factor de riesgo genético cuando el organismo se enfrenta a determinados

factores de riesgo ambientales (Navarro-López F., 2002). El progreso alcanzado por la biología molecular ha facilitado la detección de numerosos polimorfismos que pueden tener un efecto patógeno, y han hecho pensar en la hipótesis de que la suma de polimorfismos de riesgo y un marco ambiental propicio, pueden facilitar la aparición de la aterosclerosis y de la enfermedad arterial coronaria (Checa Caratachea M. A., 2007).

4. Ubicación geográfica

El inmueble se ubica en la dirección, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Ciudad de México, C.P 14610.



Figura 1. Ubicación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Las actividades que se realizaron dentro del Laboratorio de Enfermedades Cardiovasculares fueron supervisadas por la Dra. Leonor Jacobo y con el apoyo de la Dra. Mayra Domínguez; a su vez la máxima autoridad del laboratorio es la Dra. Teresa Villarreal y, también se cuenta con una gran diversidad de estudiantes de distintas carreras que asisten para realizar sus prácticas y tesis de licenciatura, maestría y doctorado.

5. Objetivo

Analizar tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en casos de Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) y en controles del estudio de la Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA) para evaluar su posible asociación con la enfermedad y con parámetros metabólicos de riesgo cardiovascular.

6. Especificación de las actividades desarrolladas de acuerdo al calendario propuesto

Las actividades se realizaron durante un periodo de seis meses en un horario de lunes a viernes de 9:30 am a 3:00 pm, estas actividades sirvieron para generar información para la evaluación de la relación de los SNPs con factores de riesgo metabólico. El proyecto se dividió en tres fases: la primera consistió en la búsqueda de información publicada que tenga relación con el objeto de estudio y tuvo una duración aproximada de dos meses, la segunda etapa consistió en genotipificar los tres SNPs en las muestras, utilizando la técnica de PCR en tiempo real, tuvo una duración aproximada de tres meses y la última etapa consistió en realizar el análisis estadístico para evaluar la asociación de los SNPs con la enfermedad y con parámetros de riesgo cardiovascular.

Lista de actividades realizadas durante el servicio social:

➤ Asistencia a seminarios y ponencias

Durante esta actividad programada para los días martes y viernes se expusieron y discutieron temas relacionados con investigación del genoma de población latina, con la finalidad de aclarar dudas y compartir bases teóricas para la investigación.

➤ Registro y control de bases de datos.

Esta actividad consistió en revisar las bases de datos en archivos de Excel de genotipificación alélica obtenidos de técnicas de microarreglos y conocer el número de muestras que faltaban por genotipificar; también se realizaron tres bases de datos en archivos de Excel para registrar los resultados de los genotipos obtenidos mediante PCR en tiempo real de los SNPs rs10801999 de *CASQ2*, rs185788586 de *CACNA1C* y rs11869286 de *TCAP*.

➤ Selección de las muestras de controles GEA

Para este proyecto se seleccionaron 846 muestras de ADN de individuos sanos (controles), las cuales se utilizaron para el análisis del SNP rs11869286, 1457 muestras para el análisis del SNP rs10801999 y 1218 muestras para el análisis del SNP rs185788586. Esta selección de muestras se hizo a partir de la revisión de las bases de datos de los genotipos obtenidos mediante microarreglos y de los resultados de PCR en tiempo real, en los cuales solo se incluyeron los resultados de las muestras con score de calidad mayor a 0.80, y placas que estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg; además se revisó la concordancia de estos resultados con las frecuencias alélicas de los polimorfismos reportadas para la población latina en bases de datos como HapMap y 1000 genomas.

➤ Genotipificación de los SNPs en las muestras de controles de GEA.

Para esta actividad se utilizaron tres ensayos de sondas Taqman, uno para cada uno de los SNPs. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR en tiempo real la DNA polimerasa rompe la sonda hibridada con el DNA, provocando una emisión de fluorescencia, la cual dependiendo del genotipo de la muestra, corresponde a uno de los dos fluoróforos acoplados a las sondas de cada ensayo o a ambos fluoróforos en el caso de las muestras con genotipo heterocigoto.

La amplificación se realizó en placas de 96 pozos con un volumen final de 5.1 µl que contiene 2.5 µl de mezcla de reacción de PCR comercialmente disponible (Master Mix), 0.1 µl de sonda y 2.5 µl de muestra y se usó el termociclador Light Cycler 480, donde las condiciones de termociclado consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguidos de 40 ciclos de 50 °C a 60 °C y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

➤ Análisis estadístico

Todas las frecuencias se estimaron utilizando el método de conteo de alelos mediante las fórmulas:

$$f(\text{dominante}) = f(AA) + f(Aa)/N$$

$$f(\text{recesivo}) = f(aa) + f(Aa) / N$$

donde: N es el número total, AA es el alelo común, Aa es alelo heterocigoto y aa es el alelo raro.

Las frecuencias genotípicas se analizaron para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa “*Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium*” (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Para determinar la asociación entre los genotipos de los SNPs y el riesgo de Enfermedad Arterial Coronaria, se utilizó un modelo de regresión logística donde el nivel de significación estadística fue de $P < 0.05$.

➤ **Mantenimiento de las muestras**

Para la calidad y confiabilidad de los resultados, las muestras se conservaron etiquetadas y almacenadas en 20 cajas marcadas como controles GEA en refrigeración a 4 °C; se realizó una carpeta fotográfica para registrar las muestras faltantes. Al finalizar los ensayos de genotipificación de los 3 SNPs de este proyecto quedaron 140 tubos de muestras vacíos, a los cuales se les agregó 10µl de agua grado biología molecular y se determinó la concentración de DNA, utilizando un espectrofotómetro (Nano Drop) para que estas muestras puedan ser utilizadas en futuros proyectos.

7. Impacto de las actividades del servicio social

Los estudios genéticos de las enfermedades cardiovasculares buscan identificar biomarcadores que permitan explicar los mecanismos asociados con la enfermedad, así como identificar variantes genéticas para establecer asociaciones y factores de riesgo a estas enfermedades. A medida que los estudios de asociación genética arrojan nuevos genes vinculados con el riesgo de enfermedades cardiovasculares, es necesario la replicación de dichos estudios para confirmar tales asociaciones y establecer la distribución de las variantes genéticas en las diversas poblaciones humanas.

Desde el punto de vista de Salud Pública estos resultados son de gran interés para la población mexicana pues demuestran que la enfermedad arterial coronaria puede ser prevenible si se logran identificar los principales factores de riesgo metabólico para la población y así poder establecer programas que controlen estos factores modificables.

Los resultados obtenidos de las placas de PCR en tiempo real son el número de individuos homocigotos para el alelo común y el alelo raro para cada SNP, así como los individuos heterocigotos, de los cuales sólo se aceptaron para el análisis de asociación las muestras con score mayor a 0.80 y placas en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

<i>SNP</i>	<i>Homocigotos para el alelo común</i>	<i>Heterocigoto</i>	<i>Homocigotos para el alelo raro</i>	<i>Equilibrio H-W (P)</i>
<i>rs10801999</i>	254	104	12	0.727093
<i>rs185788586</i>	18	19	2	0.284045
<i>rs11869286</i>	542	191	18	0.809721

Estos datos se utilizaron para el análisis de asociación de los polimorfismos con la enfermedad arterial coronaria, empleando también los genotipos obtenidos previamente para los casos mediante microarreglos. Los resultados estadísticos de análisis de regresión logística mostraron que no hubo una asociación significativa de ninguno de los tres SNPs con la enfermedad y que tampoco se asociaron a factores de riesgo cardiovascular.

8. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social.

La principal habilidad obtenida durante el servicio social fue adquirir los conocimientos básicos para utilizar el termociclador Light Cycler 480 para la realización de los ensayos de PCR en tiempo real; esto requiere de compromiso para realizar buenas prácticas de laboratorio, que son una serie de reglas y

procedimientos que se consideran de cumplimiento obligatorio, debido a que es la única forma de asegurar la calidad e integridad de los datos obtenidos en determinados estudios o investigaciones, incluye habilidades de control de muestras, uso de material de laboratorio como micropipetas, centrifugas, reactivos, uso de equipos especializados y llevar un correcto registro de los resultados.

El uso de la bitácora fue otro aprendizaje adquirido ya que se debe llevar un orden para entender claramente lo realizado en laboratorio, así como especificar las condiciones en que se realizaron las técnicas de este proyecto que incluyeron, purificación de ADN, cuantificación de ADN de las muestras y genotipificación de los SNPs, así como el registro de las fechas en que se realizaron todas las actividades. Otra herramienta necesaria para el desarrollo del proyecto fue la revisión y creación de bases de datos en Excel.

9. Fundamento de las actividades desarrolladas

La propuesta de este servicio social está vinculado a la misión de la UAM – Xochimilco porque su finalidad es aportar conocimiento para identificar y resolver problemas, así como para trabajar en equipos interdisciplinarios y desarrollar investigación orientada a la solución de problemas socialmente relevantes; este proyecto pretende aportar conocimiento sobre los factores de riesgo genético para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, las cuales son la principal causa de muerte en todo el mundo (OMS, 2017).

10. Referencias

Checa Caratachea, M.A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Laboratorio de Biología Molecular. Unidad de Investigación. Rev Inst Nal Enf Resp Mex Vol. 20 Núm. 3, Pág. 213-221.

González, B. (2017). INMEGEN: Investigación. México, CDMX.
En:<http://www.inmegen.gob.mx>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Principales causas de mortalidad. Disponible en: <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/registros/vitales/mortalidad/>

Navarro-López, F. (2002). Bases genéticas de la enfermedad coronaria. Servicio de Cardiología (ICMCV). Hospital Clínico (IDIBAPS). Universidad de Barcelona. Vol. 55. Núm. 04.

OMS. (2017). Enfermedades cardiovasculares: Datos y cifras. México, Organización Mundial de la Salud. En: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).

Portilla, E. C., Muñoz, W., Sierra, C. (2014). Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. Revista Colombiana de Cardiología. Volumen 21, Número 5, páginas 318-326.

Rodríguez Esparragón F., Medina Fernández-Aceituno A., Rodríguez Pérez J. C. (2011). Variantes genéticas, riesgo cardiovascular y estudios de asociación de genoma completo. Revista Española de Cardiología, Volumen 64, Número 6, páginas 509-514.

UAM. (2010). Plan de trabajo 2010. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco Coordinación de Extensión Universitaria Sección de Servicio Social y Orientación Educativa.

