

División Académica de Ciencias de la Salud



“Estudio de los polimorfismos de los genes proproteína convertasa de subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) y adn metiltransferasa 3 (DNMT3A) en pacientes mexicanos con enfermedad arterial coronaria prematura”

Tesis para obtener el Grado de:
Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:
Erasmó Zamarrón Liconá

Director:
Dr. Manuel Alfonso Baños González
Dra. Nonantzit Iracema Hernández Pérez

Villahermosa, Tabasco.

Agosto 2021

Índice general

1. Introducción	6
1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular	7
1.2 Fisiopatología de la aterosclerosis	8
1.2.1 Enfermedad arterial coronaria	8
1.2.2 Inicio de la formación de la placa de ateroma: activación del endotelio	14
1.2.3 Formación de la placa: mecanismos inflamatorios	15
1.2.4 Crecimiento de la placa: formación de células espumosas.....	17
1.2.5 Ruptura de la placa: mecanismos de coagulación y trombosis arterial.	18
1.2.6 Hemostasia primaria y mecanismos protrombóticos.....	20
1.2.7 Activación, adhesión y agregación de las plaquetas.....	21
1.3 Regulación génica	24
1.3.1 Estructura de los genes.....	24
1.3.2 Genética de la enfermedad arterial coronaria.....	24
1.3.3 Genética de poblaciones	26
1.3.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	28
1.3.5 Desequilibrio de ligamiento.....	29
1.5 EL GEN PCSK9.....	34
1.5.1 Mecanismo de acción de PCSK9	36
1.6 Gen DNMT3.....	38
1.6.1 Epigenética	39
1.6.2 Metilación del ADN.....	41
2. Planteamiento del problema.....	42
3. Justificación	43
4. Hipótesis	45
5. Objetivos.....	46
5.1 Objetivo General.....	46
5.2 Objetivos específicos.....	46
6. Materiales y métodos	46
6.1 Tipo de estudio	46
6.2 Población de estudio:.....	47

6.2.1 Proyecto GEA.....	47
6.2.2 Estudio de ancestría.....	48
6.2.3 Grupos de estudio.....	49
6.3 Criterios de exclusión.....	49
6.4 Mediciones clínicas y antropométricas.....	49
6.5 Mediciones bioquímicas.....	50
6.6 Mediciones tomográficas.....	52
6.7 Mediciones moleculares.....	53
6.7.1 Selección de los polimorfismos genéticos.....	53
6.7.2 Extracción de ADN genómico.....	53
6.7.3 Genotipificación.....	54
6.8 Análisis Estadístico.....	54
7. Resultados.....	55
7.1 Tamaño de muestra.....	55
7.2 Estudios de ancestría.....	55
7.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	56
7.3.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de PCSK9.....	56
7.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de DNMT3A.....	56
7.4 Edad y género.....	57
7.5 Parámetros metabólicos, clínicos y cardiovasculares.....	57
7.6 Estimación de los factores de riesgo.....	58
7.7 Mapas de discriminación alélica.....	58
7.8 Asociación de los polimorfismos del gen PCSK9 con EAC prematura.....	60
7.8.1 Análisis de polimorfismos de PCSK9 en participantes en el grupo de control... 61	
7.8.2 Análisis de polimorfismos de PCSK9 en participantes del grupo AS.....	63
7.8.3 Asociación de polimorfismos de PCSK9 con colesterol-LDL y triglicéridos.....	65
7.8.4 Asociación de polimorfismos del gen PCSK9 con aterosclerosis subclínica.....	66
7.9 Asociación de los polimorfismos del gen DNMT3A con EAC prematura.....	68
7.9.1 Análisis de polimorfismos de DNMT3A en participantes del grupo de control... 68	
7.9.2 Análisis de polimorfismos de DNMT3A en participantes del grupo AS.....	71
8. Discusión.....	75
9. Conclusiones.....	85
10. Perspectivas.....	86
11. Anexos.....	¡Error! Marcador no definido.

Índice de TABLAS y FIGURAS

TABLA 1. Principales causas de mortalidad a nivel mundial.....	8
TABLA 2 Principales causas de muerte en México	8
TABLA 3. Polimorfismos analizados	53
TABLA 4. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg de polimorfismos de PCSK9.....	56
TABLA 5. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg de polimorfismos de DNMT3A.....	57
TABLA 6. Características clínicas y metabólicas de los grupos de estudio.	58
TABLA 7. Prevalencia de factores de riesgo en la población estudiada	60
TABLA 8. Conteo de pruebas realizadas.....	60
TABLA 9. Asociación entre rs2479409 con anomalías metabólicas en el grupo control	62
TABLA 10. Asociación entre rs615563 con anomalías metabólicas en el grupo control	62
TABLA 11. Asociación entre rs615563 con anomalías metabólicas en el grupo AS (aterosclerosis subclínica)	64
TABLA 12. Asociación entre rs2479409 con anomalías metabólicas en el grupo AS (aterosclerosis subclínica)	64
TABLA 13. Asociación entre el polimorfismo rs2479409 con LDL-C y triglicéridos.	66
TABLA 14. Frecuencia de haplotipos en individuos con y sin aterosclerosis subclínica	67
TABLA 15. Asociación entre rs13420827 con anomalías metabólicas en el grupo control	69
TABLA 16. Asociación entre rs752208 con anomalías metabólicas en el grupo control	69
TABLA 17. Asociación entre rs1550117 con anomalías metabólicas en el grupo control	70
TABLA 18. Asociación entre rs 13420827 con anomalías metabólicas en el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica (AS)	72
FIGURA 1. Arteria sana. Captación normal de lípidos. [22].....	10
FIGURA 2. Síntesis del óxido nítrico	12
FIGURA 3. Factores de riesgo cardiovascular y la síntesis de óxido nítrico.	13
FIGURA 4. Daño endotelial. [22]	16

FIGURA 5. Progresión de la placa. [22]	19
FIGURA 6. Ruptura de la placa. [22].....	22
FIGURA 7. Representación de un gen eucarionte. [86].....	24
FIGURA 8. Desequilibrio de ligamiento.....	31
FIGURA 9. Modelo en bloques del desequilibrio de ligamiento.....	32
FIGURA 10. Mecanismo de acción de PCSK9. [120]	37
FIGURA 11. Mantenimiento de los patrones de metilación del ADN. [123].....	39
FIGURA 12. Representación de la influencia ambiental en el genoma humano. [131].....	40
FIGURA 13. La vía epigenética.....	42
<i>FIGURA 14 Mapa de discriminación alélica de rs2479409 del gen PCSK9</i>	59
FIGURA 15. Asociación del polimorfismo rs2479409 del gen PCSK9 con aterosclerosis subclínica	67

1. Introducción

La aterosclerosis, la patología subyacente de la enfermedad arterial coronaria, es una enfermedad multifactorial, muy común, con factores de riesgo genéticos y ambientales. Su herencia se estima en un 50-60%, pero sus bases genéticas no están completamente dilucidadas, aunque muchos genes, involucrados en inflamación, metabolismo de lípidos, coagulación, y regulación de tono vascular, han sido asociados con varios fenotipos relacionados con aterosclerosis. [1-3]

En todo el mundo, tan solo hasta el año 2016, murieron 12,077,370 millones de personas al año por enfermedades del corazón, de las cuales 9,433,224 corresponden exclusivamente a enfermedad arterial coronaria (52.8% del total de muertes por causa cardiovascular). En México, también las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte, con 123,900 defunciones registradas por enfermedad cardíaca y 101,400 por enfermedad arterial coronaria que en términos porcentuales superamos, la frecuencia mundial (63.5% EAC en México). [4]

La enfermedad arterial coronaria (EAC) tiene una etiología multifactorial con participación de factores genéticos y ambientales, por lo que la identificación de genes de susceptibilidad es muy importante para el desarrollo de tratamientos más eficaces y la predicción de riesgo de la enfermedad. El análisis de diversos polimorfismos hallados en genes candidatos, que codifican para proteínas importantes para el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular, está siendo estudiado en población mexicana, para conocer la genética de la enfermedad cardiovascular. [5, 6]

1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares constituyen uno de los principales problemas de salud a nivel mundial.

En el mundo solo hasta 2016, morían 12, 077,370 millones de personas al año por enfermedades del corazón, de las cuales 9,433,224 corresponden exclusivamente a enfermedad arterial coronaria (52.8% del total de muertes por causa cardiovascular).

En México, hasta 2016, según reportes de las causas de muerte, de la Organización Mundial de la Salud, había 123,900 muertes por enfermedades cardiovasculares y de éstas, 101. 400 fueron a causa de enfermedad arterial coronaria, es decir, más del 63% del total de muertes en México por enfermedad cardiovascular fueron por EAC. [4]

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) incluyen varias enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos, pero no hay universalmente aceptada una definición del término ECV. La American Heart Association (1999), define las ECV incluyendo la hipertensión o presión sanguínea alta, la enfermedad arterial coronaria (EAC), angina de pecho (transitorio dolor de pecho asociado con un inadecuado suministro sanguíneo al músculo cardíaco), infarto de miocardio (con o sin elevación del segmento ST), enfermedad reumática del corazón, defectos cardiovasculares congénitos e insuficiencia cardíaca. De estas variantes de las enfermedades cardiovasculares, las que cobran más vidas son aquellas relacionadas con alteración en el funcionamiento normal, de las arterias coronarias, y el común denominador de la EAC es la presencia y desarrollo de aterosclerosis.

TABLA 1. Principales causas de mortalidad a nivel mundial

Lugar	Causa	Muertes (millones)	% total de muertes
0	Todas las causas	56,874	100
1	Enfermedad isquémica del corazón	9,433	16.6
2	Infarto cerebral	5,781	10.2
3	EPOC	3,041	5.3
4	Infecciones de vías respiratorias bajas	2,957	5.2
5	Alzheimer y otras demencias	1,992	3.5
6	Cáncer de traquea, bronquios y pulmón	1,708	3
7	Diabetes mellitus	1,599	2.8
8	Accidente vehicular	1,402	2.5
9	Enfermedades diarreicas	1,383	2.4
10	Tuberculosis	1,293	2.3

[7] 2000-2016

TABLA 2 Principales causas de muerte en México

Orden	Principales causas	Defunciones	Porcentaje (%)
	Total	623,600	100
1	Enfermedades del corazón	116,002	18.6
2	Enfermedades isquémicas del corazón	79,301	12.7
3	Diabetes mellitus	89,420	14.3
4	Tumores malignos	75,229	12.1
5	Accidentes	36,293	5.8
6	De tráfico en vehículos de motor	15,847	2.5
7	Enfermedades del hígado	34,765	5.6
8	Enfermedad alcohólica del hígado	12,760	2
9	Enfermedades cerebrovasculares	32,675	5.2
10	Agresiones	23,063	3.7

[8] 2013

1.2 Fisiopatología de la aterosclerosis

1.2.1 Enfermedad arterial coronaria

La enfermedad arterial coronaria es la principal causa de enfermedades cardiovasculares, caracterizada principalmente por la acumulación de células

inflamatorias, lipoproteínas y tejido fibroso en la túnica íntima arterial. [9] La enfermedad puede iniciar desde la infancia y progresar en un estado subclínico, y eventualmente se manifiesta pasada la cuarta década de la vida. [10] El engrosamiento progresivo de la pared arterial por la formación de placas ateroscleróticas, conlleva complicaciones cardiovasculares a causa de la formación de trombos en las placas, y ocasiona así la estenosis de la luz vascular y la consecuente necrosis del tejido afectado. [11] [12]

Los procesos fisiopatológicos que conducen a aterosclerosis son desencadenados por factores de riesgo cardiovasculares modificables, tales como la diabetes, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la dislipidemia, y la hiperhomocisteinemia, y factores de riesgo cardiovasculares no modificables como la edad, el género, la historia familiar y la susceptibilidad genética. [13] Adicionalmente, la identificación de características como los niveles de lipoproteína anormal y fibrinólisis, ejerce un papel importante en el inicio y la progresión de la aterosclerosis. [14] Los factores de riesgo modifican a los mecanismos moleculares y celulares asociados a estrés oxidativo, inflamación y coagulación, principales vías patológicas precursoras de la enfermedad aterosclerótica. [15] Además, la interacción de factores intrínsecos (susceptibilidad individual) y extrínsecos (medio ambiente) determinan la aparición de la enfermedad y posibilitan la identificación de fenotipos de riesgo. [16] [17]

La enfermedad arterial coronaria representa un problema de salud pública y sin embargo, el conocimiento existente acerca de las causas o factores involucrados en su desarrollo es poco concluyente. Durante los últimos años se ha podido demostrar que los eventos tempranos de la enfermedad están asociados con una

disfunción del endotelio vascular, seguida por la formación de la estría grasa y la aparición posterior de procesos aterotrombóticos. [18]

Actualmente se plantean como vías precursoras de aterosclerosis: el estrés oxidativo asociado a disfunción endotelial, la inflamación asociada a la formación y progresión de la placa de ateroma y la coagulación relacionada con la aparición de eventos tromboticos cardiovasculares.

La función arterial es controlada por diferentes sustancias liberadas por el endotelio que controlan mecanismos de relajación y contracción vascular, trombogénesis y fibrinólisis, así como la activación e inhibición de mecanismos inflamatorios. [19] [20] Este fino equilibrio mantiene al tejido endotelial en un estado caracterizado por bajos niveles de radicales superóxido, de adhesión leucocitaria, y de permeabilidad, así como también por una significativa disponibilidad de vasodilatadores. [21]

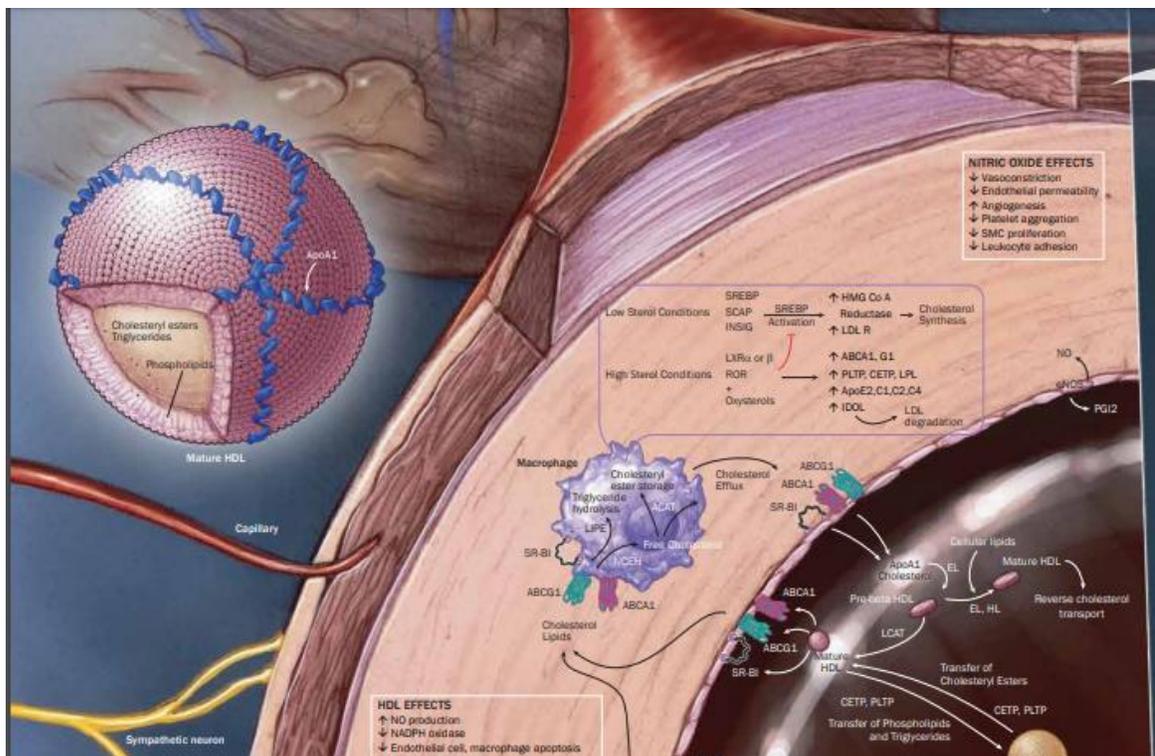


FIGURA 1. Arteria sana. Captación normal de lípidos. [22]

Cuando este control se afecta por cambios en el flujo sanguíneo y concentraciones altas de especies reactivas de oxígeno, se altera la función endotelial permitiendo la sobreproducción de radicales superóxido, la disminución en la disponibilidad de óxido nítrico y la expresión de mecanismos pro apoptóticos y pro trombóticos. [23] [24] Se reconoce al estrés oxidativo como un regulador clave de procesos fisiológicos y fisiopatológicos de las células vasculares como la oxidación de lípidos y proteínas en la pared de la arteria y por lo tanto se puede considerar un evento temprano en la aterogénesis. [25] [26] El estrés oxidativo promueve la reducción de óxido nítrico y la sobreexpresión de moléculas inflamatorias. [27] Por otra parte, la producción de radicales peróxido inducen la proliferación de células del músculo liso vascular mediado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). [28] Las especies reactivas de oxígeno son también muy importantes en la activación de las plaquetas en la respuesta temprana al daño vascular, representando mecanismos claves en el inicio de fenómenos aterotrombóticos. [29] Las especies reactivas de oxígeno tienen diversos efectos en la señalización, la modificación de moléculas y los daños a los sistemas biológicos, con base en su capacidad de interactuar con componentes celulares específicos. [30].

El óxido nítrico (NO) es el vasodilatador más importante producido por el endotelio arterial, se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) y la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). [31] [32]

El óxido nítrico, se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) y la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La disfunción endotelial comienza con la disminución en la producción

hidrocarburos aromáticos policíclicos y la nicotina, reducen la producción y disponibilidad del óxido nítrico. [35].

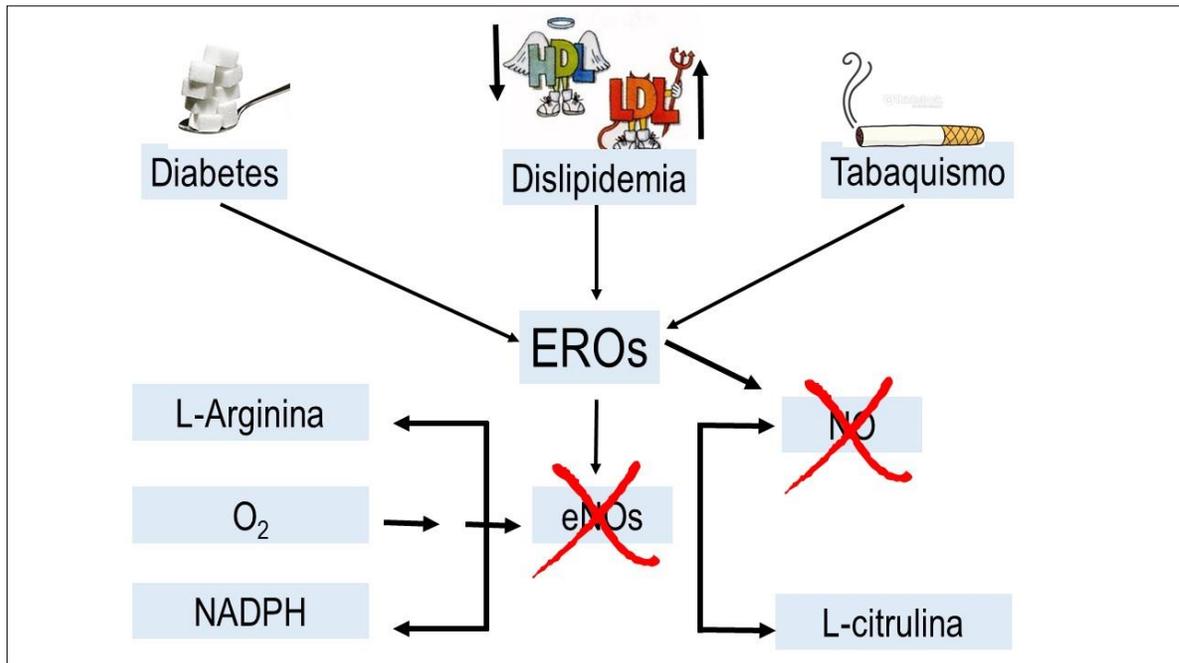


FIGURA 3. Factores de riesgo cardiovascular y la síntesis de óxido nítrico. EROs: Especies reactivas de oxígeno, eNOS: Óxido nítrico sintasa, NO: Óxido nítrico, NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

En pacientes con hiperhomocisteinemia, los niveles elevados de homocisteína afectan la biodisponibilidad del ON debido al agotamiento del vasodilatador ya constituido, a causa de su reacción con la homocisteína para formar S-nitrosohomocisteína. [36]

Por otra parte, las altas concentraciones de colesterol y triglicéridos, observados en pacientes dislipidémicos, influyen en la sobre-regulación de la enzima NADPH oxidasa y la producción de radicales O₂⁻. [37]

En pacientes diabéticos se ha observado la sobre-regulación de la inflamación y la sobreproducción de EROs que incrementan la peroxidación lipídica, inhibiendo la

acción de la eNOS y la producción de ON y reduciendo la respuesta en tejidos blanco. [33] La hiperglicemia promueve la sobreproducción de EROs, resultado de la glicación de lípidos y proteínas intra y extracelulares que lideran la generación de productos finales de glicación (AGEs) [30]

Los AGEs se unen a sus receptores RAGEs (receptor de productos finales de glicación) situados en macrófagos, monocitos y células del músculo liso vascular, amplificando la respuesta inflamatoria, el incremento de la permeabilidad vascular y el estrés oxidativo. [38] El descenso en la producción de ON observada en personas diabéticas se debe a la activación de la proteína quinasa C, cuya expresión disminuye la actividad de la eNOS y el incremento en la producción de vasoconstrictores como la endotelina-1. [39] De la misma forma, la proteína quinasa C mejora la expresión de moléculas de adhesión a la pared del vaso, mediando así procesos de activación del endotelio arterial. [40]

1.2.2 Inicio de la formación de la placa de ateroma: activación del endotelio

La activación del endotelio involucra la expresión de moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular endotelial-1 (VCAM-1) [41] facilitando el reclutamiento de células inflamatorias y la acumulación constante de lípidos en la capa íntima de la arteria. Además, la permeabilidad de la pared arterial controla la retención de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) químicamente modificadas. [42] Esta modificación química, que ocurre en el espacio subendotelial arterial, comprende principalmente procesos de acetilación y oxidación. [43] La oxidación de las LDL, se asocia con procesos aterogénicos que median el reclutamiento de monocitos a la íntima arterial; mejoran la tasa de captación de lipoproteínas y facilitan la

continuidad del proceso inflamatorio y la expresión de mecanismos protrombóticos. [44] [45] Además, la constante expresión de moléculas de adhesión y la oxidación de partículas de LDL, producen la expresión de citosinas, quimiocinas y selectinas, [46] [47] agudizando así la respuesta inmune y conformando el inicio de estrías grasas, que constituyen la primera lesión visible de la enfermedad arterial coronaria.

1.2.3 Formación de la placa: mecanismos inflamatorios

Los pasos de la adhesión leucocitaria tradicional incluyen la captura, el rodamiento, la activación, la adhesión y la migración transendotelial. [48] Estos pasos en la cascada de adhesión es mediado por moléculas de adhesión, las cuales se dividen en cuatro grandes familias: 1. Selectinas, 2. Ligandos de selectinas, 3. Inmunoglobulinas (ICAM-1 y VCAM-1) y 4. Integrinas. [49] La unión de selectinas (expresadas en la pared endotelial) y ligandos de selectinas (presentes en los leucocitos) median la atracción y el rodamiento de las células, mientras que las moléculas pertenecientes a las familia de las inmunoglobulinas y las integrinas están involucradas en la adhesión y migración leucocitaria al interior de la arteria. [50] [51] Los leucocitos migran en respuesta a la acción de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y los ligandos 5 y 2 de quimiocina y fractalquina. [43]. La diapédesis de leucocitos al interior de la pared arterial requiere un gradiente quimiotáctico de concentración de quimiocinas; igualmente, la expresión de las mismas modera las características adhesivas de las integrinas y el reclutamiento de leucocitos. [52] La presencia de monocitos en el interior del espacio subendotelial, genera la producción del factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF), quien estimula la conversión de monocitos en macrófagos. [53] Los monocitos también pueden diferenciarse en células dendríticas, pero depende

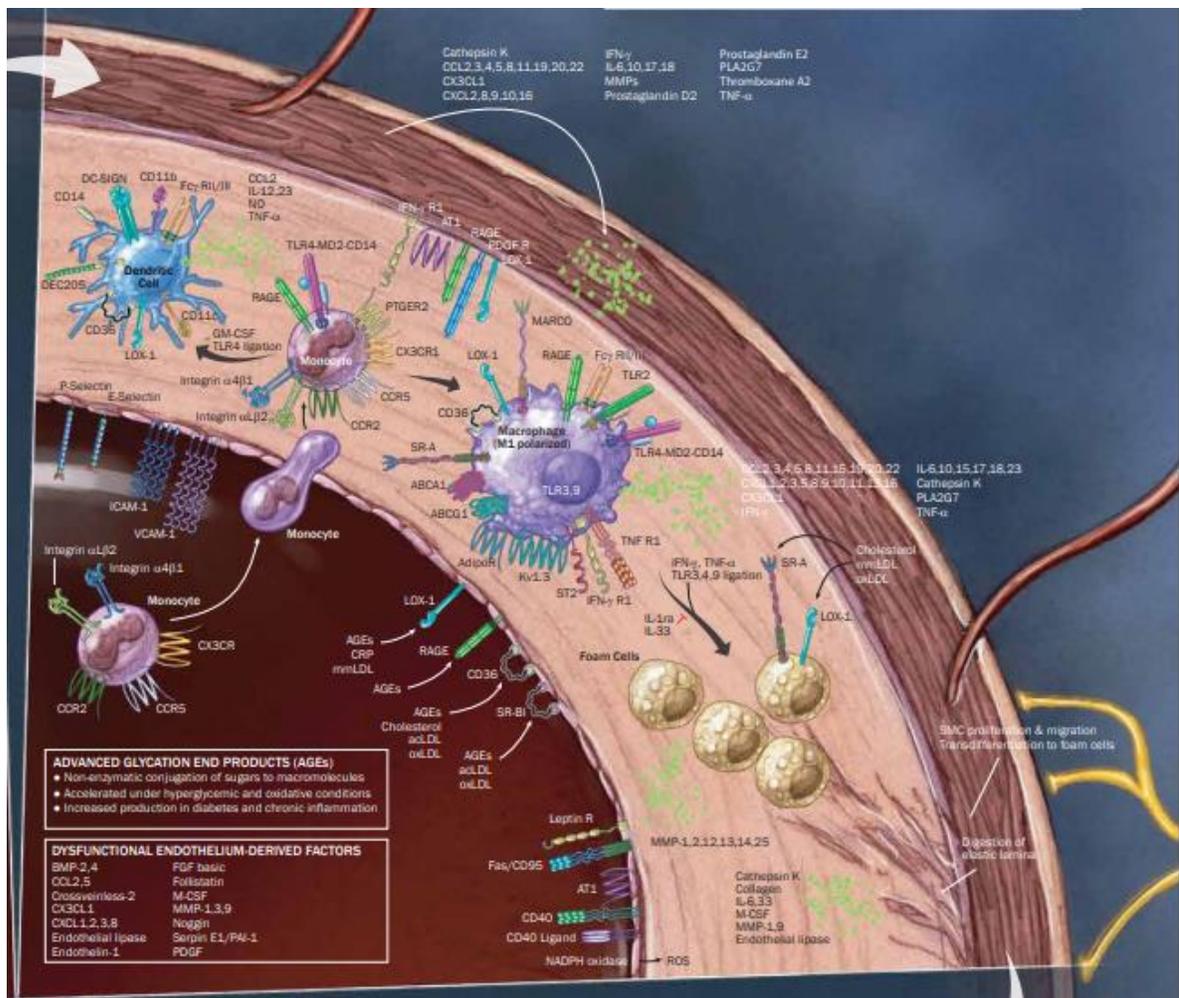


FIGURA 4. Daño endotelial. [22]

de las condiciones microambientales, así como del tipo de citoquinas presentes en la placa en formación. [54] También se observan algunos subconjuntos de monocitos (principalmente CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ y CD14⁺CD16⁺CX₃CR1⁺) dentro de la placa aterosclerótica y presentan diversos marcadores y comportamientos durante la inflamación. [55] [56] Recientemente se han asociado de manera significativa, las altas concentraciones del subconjunto monocitario CD14⁺CD16⁻CCR2⁺ con un espesor incrementado de la íntima-medial carotidea y con una alta vulnerabilidad a desarrollar placas ateroscleróticas coronarias. [57] También otras

células inflamatorias, como las células dendríticas y los linfocitos T, se distribuyen mayormente en áreas de neovascularización, la cual representa el crecimiento de la *vasa vasorum* dentro de la arteria, característico de placas susceptibles de ruptura. [54] [58]

1.2.4 Crecimiento de la placa: formación de células espumosas.

Los macrófagos expresan en su superficie, receptores específicos para oxLDL denominados receptores “scavenger” que incluyen a los receptores CD36, CD68 y el receptor 1 de la oxLDL. [59] Debido a que los fosfolípidos oxidados, principales componentes estructurales de las oxLDL, son ligandos de estos receptores, el colesterol es internalizado hacia los macrófagos, y las enzimas lipolíticas degradan el colesterol a ésteres de colesterol. [60] Estos ésteres son hidrolizados al interior de los macrófagos para liberar el colesterol no esterificado y se transfieren al colesterol de la lipoproteína de alta densidad por medio de la enzima ABCA1, mecanismo denominado transporte reverso de colesterol. [61] La continua internalización de oxLDL desencadena la formación de cuerpos apoptóticos y la interacción de AGEs con células inflamatorias, en el caso de las personas diabéticas agudizan la respuesta inflamatoria con la sobreexpresión del factor nuclear kappa-B (NF-kB), [62] el cual regula la producción y expresión de citoquinas proinflamatorias, principalmente factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [63] interferón γ e interleucinas 1, 6 y 18, que alteran la distribución de complejos caderina-catenina del endotelio vascular, al tiempo que reestructuran las uniones intercelulares, permeabilizan el tejido endotelial y facilitan el ingreso de mayor cantidad de partículas de LDL y la adhesión trans migración de leucocitos. [64] La destrucción de las células espumosas está acompañada por la acumulación de

lípidos y de oxLDL que pueden causar daño extenso en el ADN y perpetuar la muerte celular. [65]

La acción del NF-Kb también influye en la regulación genética del ciclo de las células del músculo liso vascular, promoviendo un fenotipo proliferativo y migratorio de la capa media de la arteria hacia la capa íntima, rodeando el núcleo lipídico necrótico y conformando el fibroateroma. [66] aunado a esto, la NF-Kb también estimula la expresión de la metaloproteinasa-1, la cual está implicada en la degradación de colágeno, principal componente de la matriz extracelular y le confiere una alta susceptibilidad de ruptura a una placa aterosclerótica inestable. [67]

1.2.5 Ruptura de la placa: mecanismos de coagulación y trombosis arterial.

La morfología de la placa es crucial en el desarrollo de la trombosis arterial y en la aparición de enfermedades cardiovasculares. [68] Las lesiones ateroscleróticas típicas se componen por un núcleo lipídico rodeado de una capa fibrosa compuesta principalmente por células del músculo liso vascular y colágeno, que le da resistencia e impide la ruptura de la placa y los posibles eventos trombóticos subsecuentes. [69] La vulnerabilidad de la placa a la ruptura, depende del tamaño y las placas inestables presentan más procesos relacionados con angiogénesis, mayor estrés oxidativo y apoptosis, así como tasas más altas de proteólisis e inflamación. [70] consistencia del núcleo ateromatoso, los niveles de colágeno reducidos y la capa fibrosa delgada, así como la inflamación al interior de la placa y la fatiga de la cubierta fibrosa.

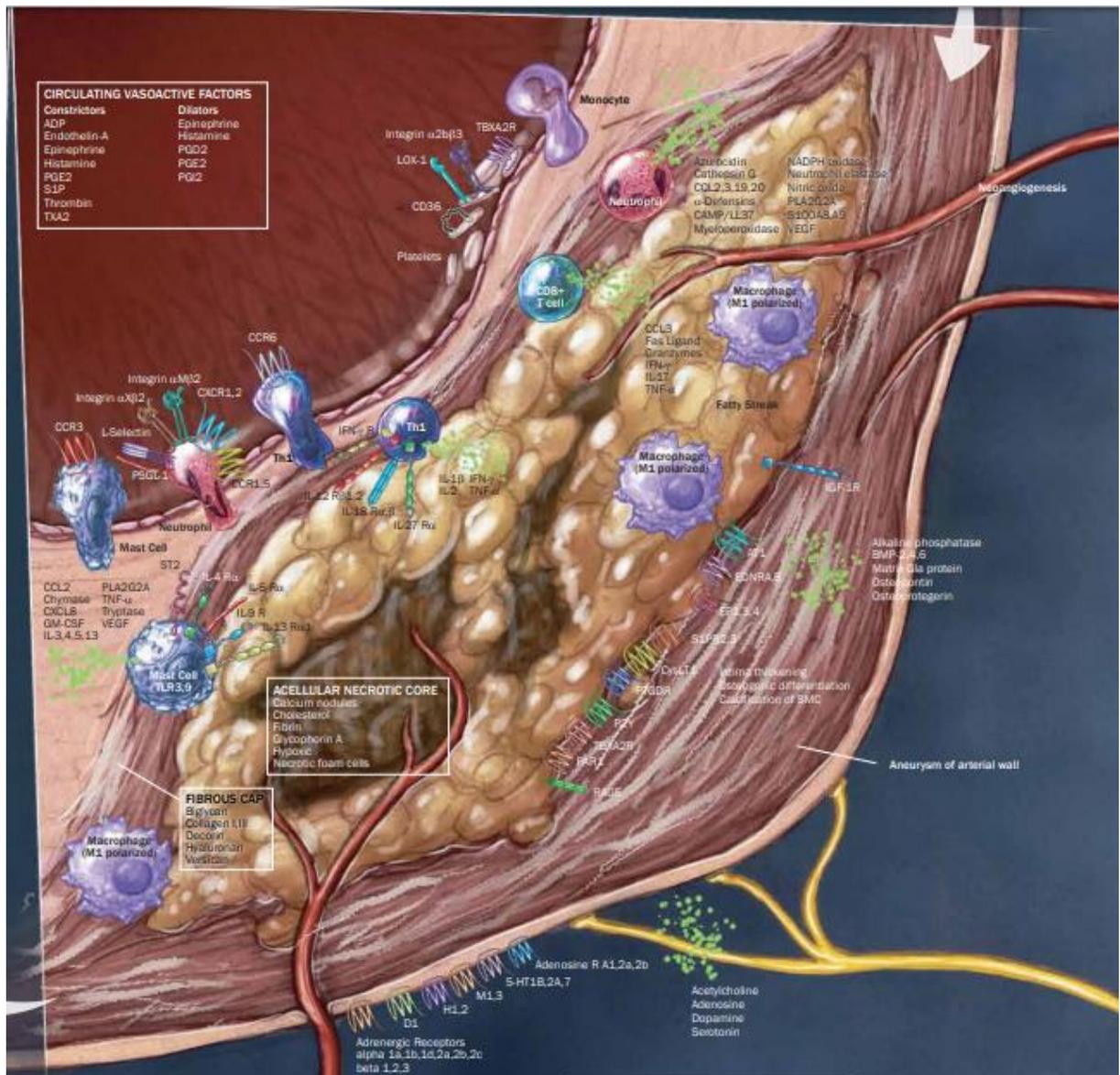


FIGURA 5. Progresión de la placa. [22]

Las placas estables se caracterizan por presentar mayor disfunción y permeabilidad endotelial, mayor activación plaquetaria y reclutamiento leucocitario y mejor remodelado vascular. La trombosis arterial es un proceso patológico dinámico, como resultado de una alteración en las funciones del endotelio arterial, el cual se comporta con un fenotipo vasoconstrictor, procoagulante, activador plaquetario e

inhibidor de procesos anti-fibrinolíticos. [71] Los procesos inflamatorios subsecuentes a la activación del endotelio aumentan la expresión de moléculas protrombóticas como el factor tisular, inhiben la actividad fibrinolítica y alteran sus propiedades antiagregantes y vasodilatadoras. La interacción molecular de vías patológicas de trombosis y fibrinólisis, media el inicio y la progresión de un evento agudo trombótico dentro de las lesiones aterotrombóticas. [72]

1.2.6 Hemostasia primaria y mecanismos protrombóticos

El sistema hemostático vascular se ejecuta a través de una red de procesos formado por el sistema plaquetario, coagulación y vías anticoagulantes y fibrinolíticas. [70]

La función de las plaquetas en el tejido endotelial vascular, está asociada a mecanismos inflamatorios, trombosis y enfermedades cardiovasculares a través de interacciones moleculares entre receptores del tejido endotelial, plaquetas y leucocitos. [73] Luego de la ruptura y el daño en la pared arterial, proteínas de la matriz extracelular altamente reactivas a plaquetas, incluyendo colágeno, factor von Willebrand (vWF), fibronectina y laminina, al ser expuestas al torrente sanguíneo, mejoran la expresión de receptores en la superficie plaquetaria. [74] [75]

El factor tisular es producido de forma dependiente de IL-6, angiotensina II, oxLDL y TNF- α , y representa un paso importante en la generación de trombina. [76] que actúa suprimiendo dos péptidos de bajo peso molecular del fibrinógeno, dando lugar a monómeros de fibrina que se aglomeran formando y estabilizando el retículo del trombo. [65] [77] Posteriormente, las citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-1 y TNF- α) y los neutrófilos activados afectan las vías anticoagulantes naturales (antitrombina, sistema de proteína C e inhibidor de la vía del factor tisular) [78].

Durante la activación plaquetaria, la trombina, es uno de los factores de coagulación más potentes a través de los receptores plaquetarios activados por proteasas, específicamente las clases 1 y 4 en plaquetas humanas [79], moléculas que participan también en la respuesta pro-inflamatoria observada en la artritis reumatoide y la estenosis. La acción de la trombina, también aumenta la expresión de IL-8, MCP-1 y E-selectina en células endoteliales que al unirse con receptores plaquetarios activados por proteasas clase 2, conllevan a una sobrerregulación de la respuesta inflamatoria, mayor producción de EROs, así como expresión de otras moléculas de adhesión celular. [80]

Los fenómenos de activación y agregación plaquetaria continúan con el proceso trombótico normal, pero uno de los factores relacionados con la susceptibilidad de presentar eventos cardiovasculares, es la disfunción plaquetaria relacionada con la hiperreactividad de las plaquetas, fenómeno observado en pacientes diabéticos [81], en los que la adhesión y la agregación plaquetaria ocurre más fácilmente que en personas no diabéticas, y los niveles de fibrinógeno son más elevados, de ahí que la diabetes se considere como un estado hipercoagulante. [82]

1.2.7 Activación, adhesión y agregación de las plaquetas

A la activación plaquetaria, le siguen por procesos de atracción, rodamiento y adhesión en la pared arterial dañada, donde, la interacción de la plaqueta con el colágeno de la matriz extracelular es mediada por la glucoproteína VI y la integrina $\alpha_2\beta_1$. [83] La adhesión específica de las plaquetas se regula por la interacción entre el receptor de la glucoproteína Ib/V/IX en la superficie plaquetaria y el vWF y entre la glucoproteína VI y el colágeno expresado en los sitios de la lesión del vaso. [84]

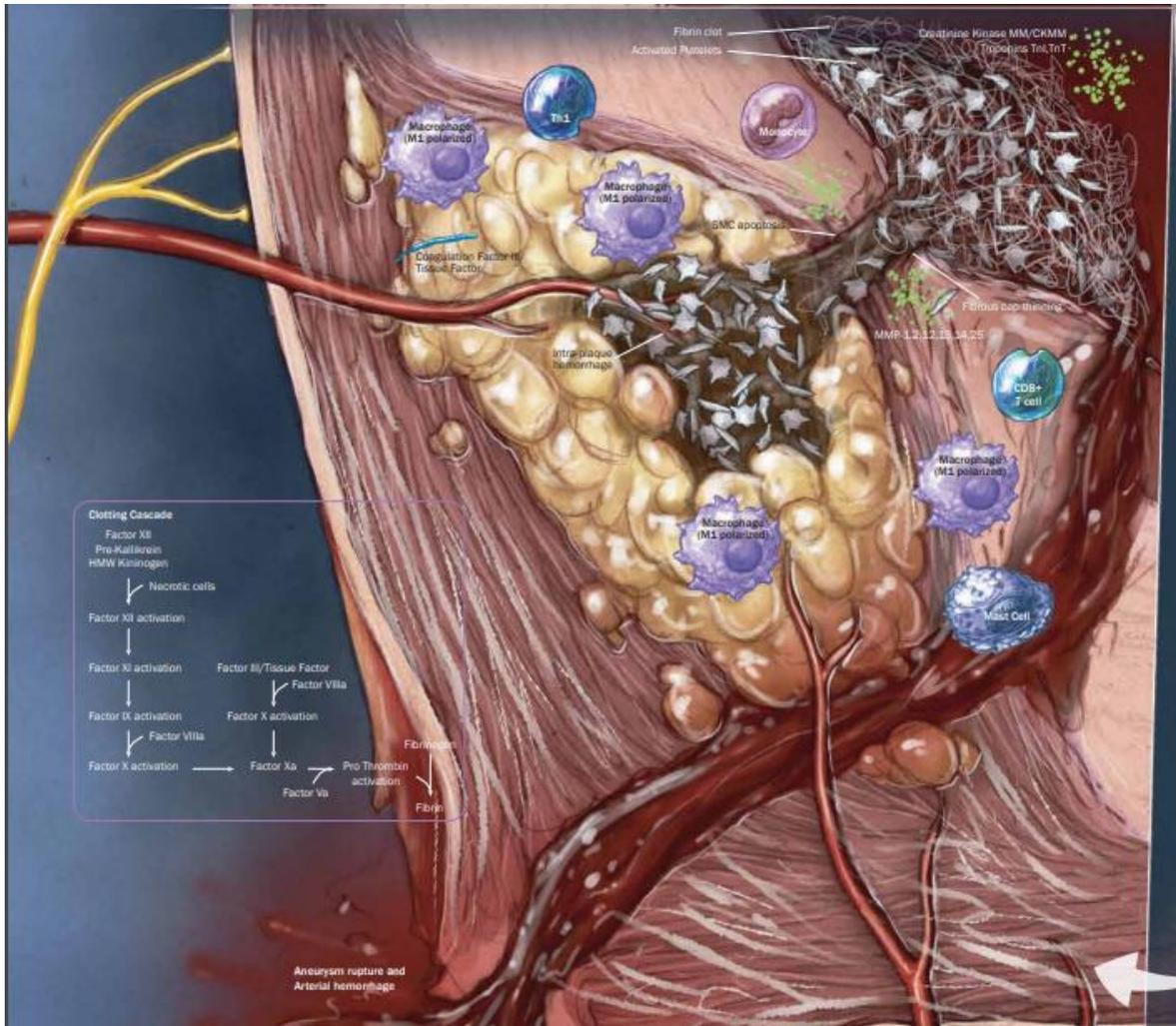


FIGURA 6. Ruptura de la placa. [22]

Las plaquetas, una vez adheridas, liberan el contenido de sus gránulos y sobre-regulan la función de ciertas moléculas adhesivas como la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, molécula que se une a múltiples ligandos entre ellos el vWF, el fibrinógeno, la fibrina y la fibronectina, [85] indispensables para la formación estable de agregados plaquetarios; además, secretan mediadores aterogénicos, como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas de coagulación y factores de la

coagulación, [70] mejorando la respuesta inflamatoria y protrombótica, característica de los fenómenos aterotrombóticos.

Actualmente, en el campo de la biología molecular, se están estudiando, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que se pueden encontrar asociados significativamente con la EAC. Estos polimorfismos genéticos, son variaciones presentes en un gen, que pueden o no, alterar la función de la proteína codificada, sin embargo, a pesar de esto, su frecuencia y su asociación con otros polimorfismos en el mismo cromosoma (haplotipos), pueden llegar a ser un factor de riesgo genético, cuando, aunado a esta carga genética, el organismo se enfrenta con los factores de riesgo cardiovasculares, descritos anteriormente, (tabaquismo, dislipidemia, etc.) aumentando así el riesgo de presentar la enfermedad a temprana edad (EAC prematura). En México, el Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez, desde el año 2012, ha venido analizando a la población mexicana, a través del proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerótica), cuyo principal objetivo es investigar los factores genéticos asociados con EAC prematura, aterosclerosis subclínica y otros factores de riesgo coronarios, entendiendo a la EAC prematura como aquella que se presenta antes de los 55 años en hombres y antes de los 65 años en mujeres.

1.3 Regulación génica

1.3.1 Estructura de los genes

Para poder entender como una variante puede afectar la expresión o la regulación génica, es indispensable hacer énfasis en la estructura de un gen eucarionte. Un gen está conformado por secuencias intrónicas y exónicas, así como dos regiones UTR (regiones que no se traducen, por sus siglas en inglés) en el extremo 3' y en el extremo 5' del gen.

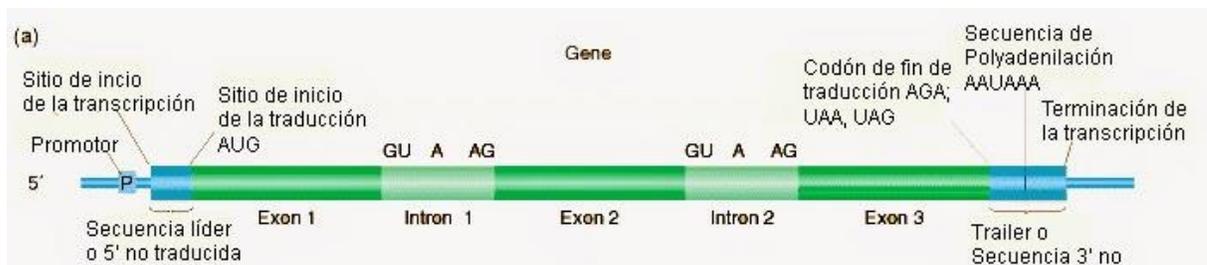


FIGURA 7. Representación de un gen eucarionte. [86]

Asimismo, la expresión del gen se encuentra dada por la región promotora, la cual se localiza corriente arriba del gen, en los genes eucariontes cada gen tiene su propio promotor (FIGURA 11). Debido a que cada región génica tiene una función específica, los polimorfismos o mutaciones localizadas en cada una de estas regiones, pueden tener un efecto diferente sobre la expresión génica y su producto, por lo que es indispensable conocer la región en la que se encuentran las variantes génicas, para determinar su efecto. [87]

1.3.2 Genética de la enfermedad arterial coronaria

La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) es una enfermedad compleja, con origen multifactorial. Desde 1964, Geoffrey Rose asoció la enfermedad cardiovascular con un componente hereditario. [88]

En la actualidad, el factor hereditario de la ECV y la EAC sigue siendo considerado como determinante para el desarrollo de este grupo de patologías. Es por esto que la Asociación Americana del Corazón, considera como un factor de riesgo independiente al desarrollo de EAC el antecedente de un familiar de primer grado con ECV prematura (menos de 55 años en hombres y menos de 65 años en mujeres). [89]

En relación con la EAC, la predisposición genética y los factores ambientales, como los son la malnutrición, el sedentarismo y la insuficiente cantidad de sueño, facilitan el depósito de colesterol y calcio a nivel subendotelial conllevando al desarrollo y crecimiento de la placa de ateroma. Asimismo, los factores genéticos que modifican el fenotipo, la expresión y el producto de la transcripción, guardan una estrecha relación con la disfunción endotelial, así como el estado proinflamatorio y protrombótico a nivel vascular, lo que facilita el crecimiento de la placa y eventualmente la pérdida de estabilidad de esta, culminando en su ruptura, la cual se manifiesta a nivel de la circulación coronaria clínicamente como SCA.

Aunque la mayoría de los casos de EAC son el resultado de la interacción de múltiples variables genómicas, existen casos de EAC prematura que se asocia a herencia mendeliana. Uno de los más importantes ejemplos son casos de hipercolesterolemia familiar, causada por mutaciones en el gen PCSK9 el cual regula el receptor de LDL, causando un defecto en el ligando de la apolipoproteína B (ApoB) secundaria a una mutación (Arg3500Gln). [90]

Los estudios de asociación genética han demostrado ser de gran utilidad para entender la relación que existe entre la genética y la ECV. En la actualidad, se han

identificado por lo menos 153 loci asociados con EAC, de los cuales 46 han sido validados en estudios de gran escala.

Al hablar de estudios de asociación genética, es importante destacar que tienen sus limitaciones debido a que requieren ser realizados en poblaciones específicas, requieren un tamaño de muestra bastante grande y son de carácter transversal. Asimismo, no comprueban la relación fisiopatológica entre genotipo y fenotipo. A pesar de esto, los estudios de asociación genética han demostrado ser de gran utilidad y la información que han provisto en el campo de la medicina cardiovascular, ha sido de utilidad para descifrar parcialmente la patogénesis de la EAC e infarto desde el punto de vista de la genética y biología molecular. [91]

La epigenética también desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la ECV, donde los cambios en la regulación de la expresión génica son generados sin modificar la secuencia de ADN. [92]

Por medio de la epigenética, los genes de una persona pueden ser alterados por medio de su medio ambiente, es decir, por sus hábitos alimenticios, la actividad física y la cantidad de sueño reparador. La nutrición juega aquí un papel muy importante al modificar la metilación de los genes hacia la producción o inhibición de ciertas proteínas, las cuales pueden desempeñarse como protectoras o riesgosas para la salud cardíaca. [93]

1.3.3 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es la rama de la genética enfocada en el estudio de la distribución de los genotipos en las poblaciones, así como el efecto de las frecuencias alélicas y los genotipos sobre las patologías o características biológicas. También, busca analizar los factores genéticos, ambientales, sociales y culturales,

los cuales conjuntamente determinan la frecuencia y distribución de las enfermedades genéticas y multifactoriales en las familias, en la comunidad y grupos étnicos.

El índice de heterocigocidad es relevante en la genética de poblaciones. En humanos este índice es de 0.0037 en el ADN genómico, esto indica que 1 de cada 270 nucleótidos varía entre dos individuos no relacionados. Esto se debe principalmente a múltiples variantes génicas entre las que se destacan los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), los cuales no necesariamente tienen efecto fenotípico, debido a que gran parte del genoma humano se encuentra conformado por regiones no codificantes. Asimismo, en ocasiones las variables genéticas que existen en un individuo pueden comportarse como factores de riesgo para presentar alguna enfermedad o ser el origen de la patología. (Guillen-Navarro, Ballesta-Martínez MJ, Lopez-Gonzalez V, 2011)

Es claro que la información derivada de estudios de asociación representa un gran avance en el entendimiento de las enfermedades complejas y multifactoriales, entre las que se encuentra la ECV. A pesar de esto en la actualidad esta información, representa un conocimiento que transformará la salud pública, debido a que permitirá generar perfiles de riesgos genéticos poblacionales e individuales. Esto se traducirá en políticas de salud pública con un enfoque distinto al que existe en la actualidad. Es indispensable considerar que esto generará un cambio positivo, a pesar de que en la actualidad interpretar toda la información existente representa un reto para la salud pública y otras múltiples ramas de la medicina. [94]

1.3.4 Equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), también conocido como ley o principio de Hardy-Weinberg, es un concepto relevante en la genética de poblaciones y es uno de los pilares en los cuales se basa esta rama del conocimiento. El EHW postula que las frecuencias genotípicas de dos alelos dentro de una población, permanece constantes de generación en generación después de una generación de apareamiento al azar, esto en una población indefinidamente grande y aislada, en ausencia de mutación y selección natural.

Para que exista el EHW algunos supuestos deben cumplirse:

- La población a analizar debe ser diploide.
- La población a analizar se debe reproducir sexualmente.
- La población a estudiar no contenga subgrupos y por consiguiente el emparejamiento sea aleatorio. Debido a que esto generaría en el subgrupo un efecto genético en el cual exista un incremento de la proporción de genotipos homocigotos a expensas del heterocigoto.
- La población a analizar no sea pequeña, de manera que los acontecimientos al azar no puedan alterar de manera radical una frecuencia alélica. En una población de tamaño reducido, efectos aleatorios como el aumento de fertilidad o la supervivencia de portadores de una mutación, pueden originar que la frecuencia alélica se modifique. También se puede reportar el efecto fundador donde unos pocos individuos migran hacia una zona previamente despoblada, lo que modificaría la frecuencia alélica de la nueva población.
- Exista inmigración o emigración de una población, lo que puede alterar las frecuencias alélicas de una población predeterminada.

- Selección natural, al existir selección natural los portadores de los alelos protectores para la enfermedad sobrevivirán y transmitirán estos a la siguiente generación, modificando las frecuencias alélicas. [95]

Desde el punto de vista de las matemáticas el EHW se expresa con la siguiente ecuación:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

p = Frecuencia de homocigotos para el alelo A

q = Frecuencia de homocigotos para el alelo a

$2pq$ = Frecuencia de heterocigotos aA

Considerando la ecuación anterior y teniendo en cuenta que los alelos a y A son los únicos reportados en el locus a analizar, por lo tanto, la suma de p y q debe ser 100% o 1.

$$p + q = 1$$

El EHW también es de utilidad al momento de estudiar las enfermedades de herencia mendeliana, debido a que mientras la población se encuentre en equilibrio y sea lo suficientemente grande, se conozca la frecuencia de homocigotos para algún alelo que genere alguna enfermedad de herencia recesiva, se puede calcular la frecuencia de portadores en la población general para el alelo de riesgo. También, se puede calcular el riesgo que existe para que los hijos de un portador de la enfermedad tengan un hijo con la patología al momento de procrear con un individuo de la población general. [96] [97]

1.3.5 Desequilibrio de ligamiento

El término desequilibrio de ligamiento (el cual se expresa como DL) se refiere a una asociación no aleatoria de los alelos en dos o más loci. Esto se debe a que durante

la meiosis existe un entrecruzamiento de ambos cromosomas, el cual es aleatorio, teniendo esto en cuenta, entre más próximos sean dos alelos, mayor será la posibilidad de que ambos sean heredados juntos, siendo de utilidad para determinar la tasa de recombinación de un locus en particular. Adicionalmente, el desequilibrio de ligamiento ha sido de utilidad para mapear el genoma humano y creación de marcadores genéticos. En la actualidad existen Modelos computarizados que determinan el desequilibrio de ligamiento, esto en ocasiones es expresado como porcentaje y es interpretado como la posibilidad de que dos alelos sean heredados juntos. [\[98\]](#) [\[99\]](#)

Dependiendo de la distancia que existe entre los alelos en el mismo cromosoma estos tienden a ser heredados en bloque como es el caso del Alelo a y Alelo b, a diferencia del alelo c y d los cuales al encontrarse a mayor distancia no tienden a ser heredados en conjunto. [\[100\]](#) [\[101\]](#) ver FIGURA 12

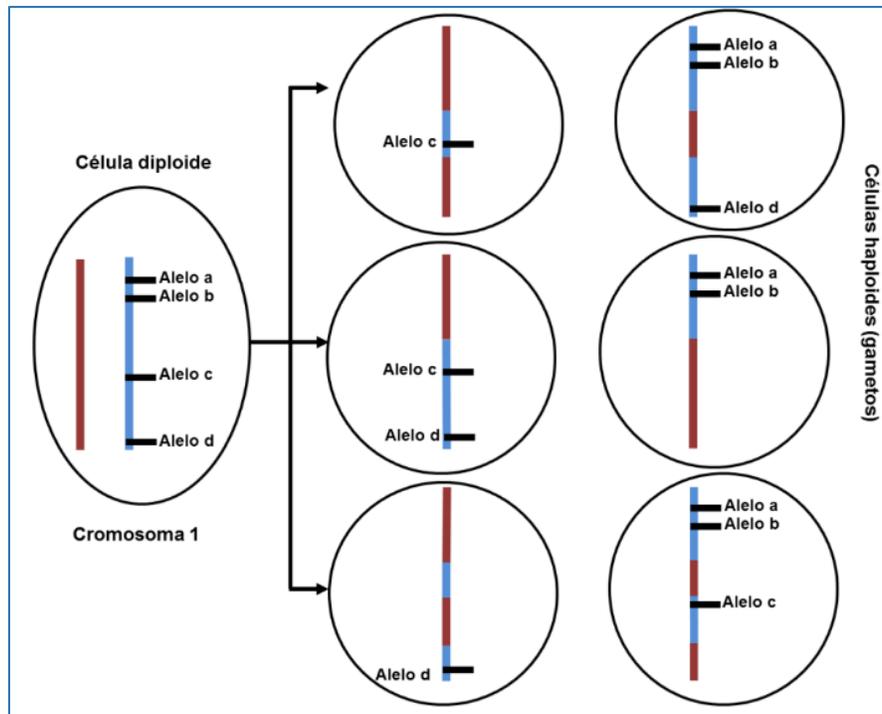


FIGURA 8. Desequilibrio de ligamiento

La asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci se debe al entrecruzamiento de los cromosomas, el cual es aleatorio, teniendo esto en cuenta, entre más próximos sean dos alelos, mayor será la posibilidad de que ambos sean heredados juntos, siendo de utilidad para determinar la tasa de recombinación de un locus en particular.

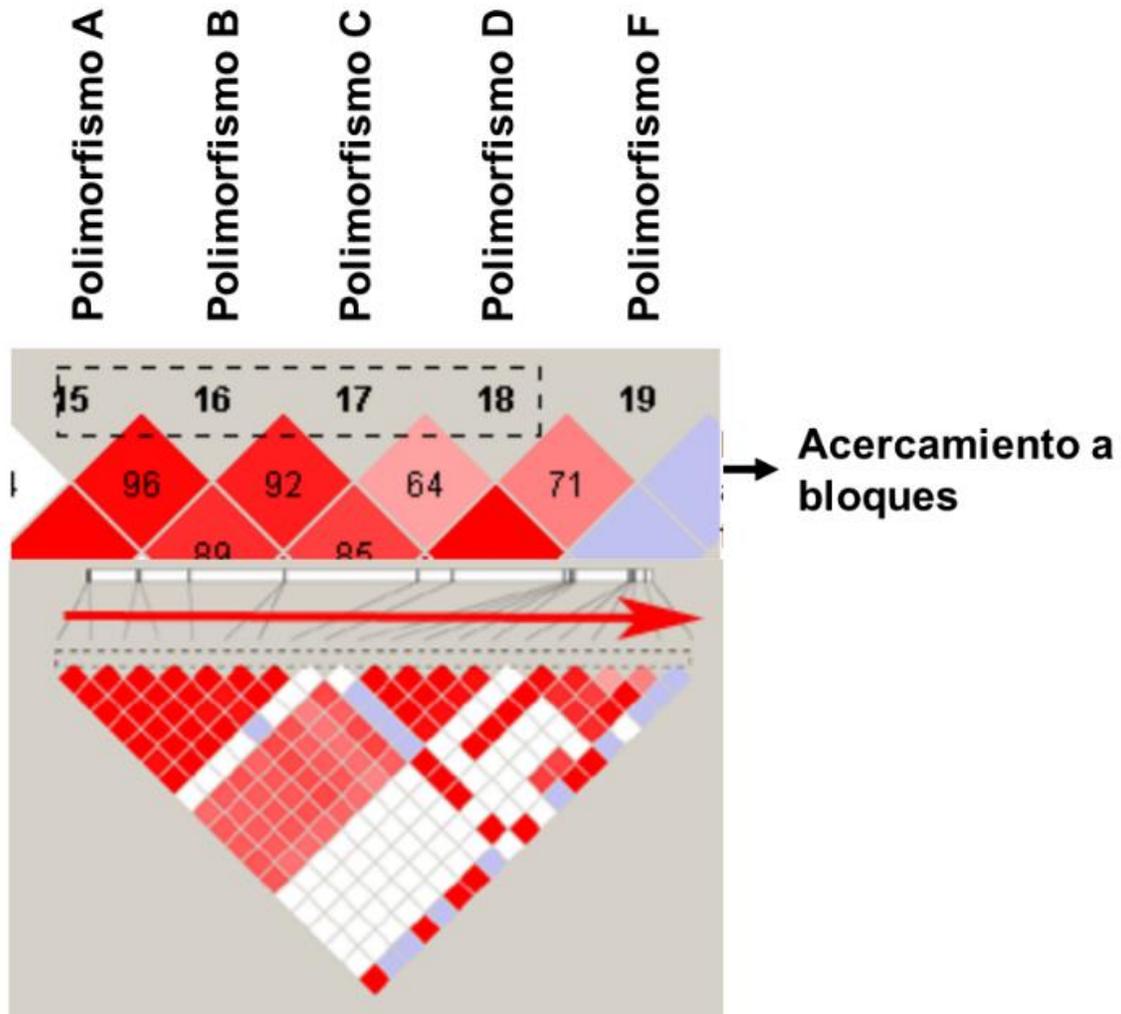


FIGURA 9. Modelo en bloques del desequilibrio de ligamiento.

En el Modelo de bloques del desequilibrio de ligamiento (LD) se observa cómo entre mayor es la tonalidad roja de los bloques, mayor es el desequilibrio de ligamiento (LD) de los polimorfismos. [102]. Es decir, la frecuencia de asociación de los alelos es diferente a la esperada (mayor o menor) como cuando los loci son heredados de manera aleatoria. Ver FIGURA 13.

1.4 Proyecto GEA: Genética de la Enfermedad Aterosclerótica

El proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerótica) es una iniciativa del Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, la cual tiene como objetivo caracterizar los factores de riesgo asociados a la genética de la ECV en la población mestizo-mexicana. El proyecto GEA ha estudiado la EAC a través de los fenómenos de aterosclerosis, trombosis, disfunción endotelial y EAC prematura, asimismo se ha generado una cohorte bien caracterizada de más de 1000 controles clínicamente sanos y más de 1000 pacientes con aterosclerosis subclínica, angina estable crónica y síndrome coronario agudo (SCA). El primer reporte derivado de este proyecto fue en el 2012 por Villarreal-Molina y col., donde se reportan las características iniciales de los pacientes a estudiados, los métodos de enrolamiento para los fines de este proyecto. [103]

Asimismo, en la actualidad se cuenta con más de 22 publicaciones en revistas nacionales e internacionales, así como múltiples tesis de licenciatura, maestría y doctorado, derivadas de esta iniciativa. Debido a la gran cantidad de participantes y al tiempo de seguimiento que han tenido los participantes, la gran mayoría de los estudios realizados son estudios de asociación genética, los cuales tienen una metodología transversal. A pesar de esto, en la actualidad, se ha planteado que en un futuro la metodología de los estudios publicados relacionados al proyecto GEA se modifique a longitudinal, con la intención de generar un grupo de seguimiento.

El protocolo presentado en esta tesis es un estudio anidado al proyecto GEA.

1.5 EL GEN PCSK9

PCSK9 (proteína convertasa subtilisina/kexina 9) es un gen compuesto por 12 exones, ubicado en el cromosoma 1p32.3 y codifica para la proteína del mismo nombre, que consta de 692 aminoácidos, siendo expresada principalmente en hígado, intestino y en menor grado riñones, piel y cerebro. [104] Esta proteína se encarga de regular la activación, inactivación y/o traducción intracelular de proteínas secretorias, tales como: factores de transcripción, factores de crecimiento, prohormonas, receptores de membrana, entre otras. [105] Este tipo de proteasas, son típicamente traducidas en el retículo endoplásmico como una proteína precursora que se somete a una escisión autocatalítica del prodominio N-terminal desde el dominio catalítico C-terminal. [106] El prodominio N-terminal permanece unido, no covalentemente, al dominio catalítico; inhibiendo la actividad proteolítica, hasta que ocurre un segundo evento de clivaje en el prodominio, que interrumpe esta interacción, permitiendo la actividad catalítica completa. Igual que otras proteasas de su clase, PCSK9 también requiere un proceso intramolecular para un plegamiento y tráfico correcto, por lo tanto, las mutaciones en los sitios activos resultan en retención de un zimógeno PCSK9, no procesado, en el retículo endoplásmico. [107] Sin embargo, a diferencia de otras proteasas subtilisina, no hay evidencia de que el prodominio siempre se disocie del dominio catalítico. Incluso después de su secreción, el prodominio se asocia con el dominio catalítico, como ya se evidenció por varios estudios que han caracterizado el complejo PCSK9 secretado. [108] Además, dos estructuras cristalinas, publicadas de PCSK9

secretada, verifican que el prodominio permanece unido no covalentemente, con la proteína madura y bloquea estéricamente la escisión del sitio activo. [109] [110]

A pesar de la aparente inhibición de la actividad catalítica por el prodominio, el complejo PCSK9 secretado, es funcional, ya que la proteína purificada o el medio acondicionado de células productoras de PCSK9, son capaces de disminuir los niveles de LDL-R celular y la captación de LDL-C. [111]

Esta enzima, también es conocida como NARC-1 (neural apoptosis-regulated convertase 1, por sus siglas en inglés) y fue descrita por primera vez en 2003, como el noveno miembro de la familia proproteína convertasa subtilisina/kexina. [112]

Estudios genéticos subsecuentes definieron a PCSK9, como el tercer gen en causar hipercolesterolemia autosómica dominante, (hipercolesterolemia familiar, HF) además de los genes LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad) y APOB (apolipoproteína B), debido a una serie de mutaciones con ganancia de función, identificadas en familias con HF. [113] En consistencia con los resultados de estos estudios, los sujetos portadores de las mutaciones de pérdida de función (Y142X y C679X) presentaron una reducción del 28% en los niveles plasmáticos de colesterol LDL (LDLC), así como una disminución del 88% del riesgo de EAC en una encuesta de seguimiento de 15 años. [114] Los resultados de los estudios en humanos, están en concordancia con las observaciones hechas en ratas, donde, los niveles plasmáticos de colesterol, se encuentran aproximadamente 50% más bajos, en ratas con el gen PCSK9 bloqueado (knock out), permitiendo la depuración de lipoproteínas del plasma. [115] Sin embargo, no se observaron anomalías

fisiológicas o de comportamiento aparentes en ratas o humanos, portadores heterocigotos, de mutaciones en el gen PCSK9, de pérdida de la función. [116]

1.5.1 Mecanismo de acción de PCSK9

PCSK9 interactúa con LDL-R en el metabolismo del colesterol, por lo que es importante mencionar, algunas características de este receptor: LDLR fue descrito por Goldstein y Brown en los años 70's, como una glucoproteína con 5 dominios:

1. Dominio de unión a ligando extracelular
2. Dominio precursor EGF extracelular
3. Dominio rico en azúcar extracelular
4. Dominio transmembrana
5. Dominio intracitoplásmico citosólico

Bajo condiciones fisiológicas, una partícula de LDL circulante que contiene un promedio de 1500 moléculas de colesterol esterificado, es identificada por el dominio de unión a ligando extracelular de LDLR, por una sola molécula de APOB-100. El complejo LDL-LDLR es incorporado a la célula por endocitosis. En el endosoma, este complejo es disociado y LDL se transfiere a los lisosomas donde sus componentes son hidrolizados, mientras que LDLR se recicla a la membrana celular. La vida media de un receptor LDLR es de 20 horas y el tiempo del ciclo membrana-endosoma-membrana es de 10 minutos; por lo que cada LDLR es capaz de transportar un promedio de 120 moléculas de colesterol LDL. [117] [118]

La concentración del colesterol intracelular, es lo que regula la expresión del factor de transcripción SREBP1, quien, en presencia de altas concentraciones de colesterol intracelular, es suprimida y a concentraciones bajas, se activa. La

supresión de SREBP1, interrumpe la síntesis intracelular de colesterol por inhibición de la síntesis y de la expresión de la enzima HMGCoAR, así como por el bloqueo de la captación de LDL, inhibiendo la síntesis y expresión de LDLR. Por el contrario, la activación de la expresión de SREBP1, inicia la síntesis intracelular de colesterol por la activación de HMGCoAR y de LDLR. En paralelo con la activación del factor de transcripción SREBP1, la baja concentración de colesterol intracelular, también activa la expresión del factor de transcripción SREBP2, el cual detona la síntesis de PCSK9. [119] La PCSK9 secretoria circulante tiene como ligando al dominio precursor EGF de LDLR. Una vez formado el complejo PCSK9-LDLR, ya sea en presencia o ausencia de LDL, este es endocitado e incapaz de disociarse, siendo transferido de los endosomas a los lisosomas para su proteólisis, evitando el reciclado de LDLR a la membrana celular. [107]

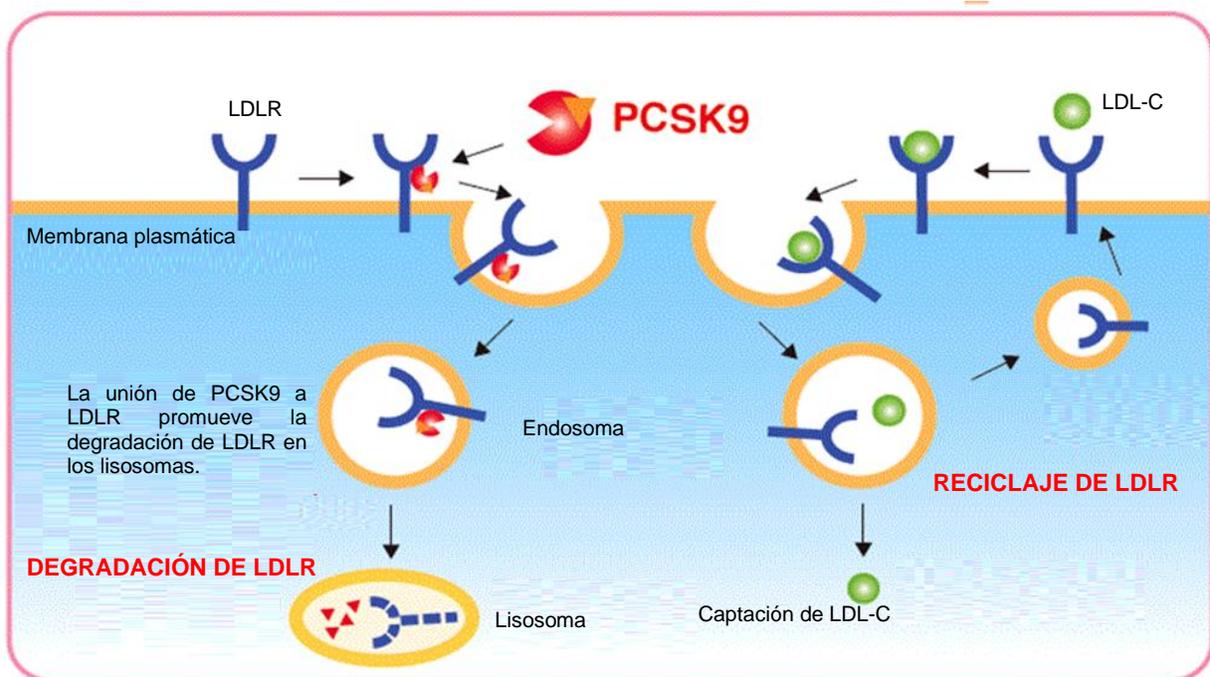


FIGURA 10. Mecanismo de acción de PCSK9. [120]

El objetivo de la síntesis paralela de dos moléculas con efectos biológicos opuestos es mantener constantes los niveles de colesterol intracelular. El mecanismo de mutua contrarregulación fue confirmado por Tavori et al, quien demostró que la regulación recíproca entre PCSK9 y LDLR es independiente de la función de LDLR de unirse a LDL. Se estableció que los niveles de LDLR son regulados por las concentraciones plasmáticas de PCSK9 y recíprocamente, PCSK9 es regulado por las concentraciones de LDLR, y que el sitio de unión a PCSK9, no es afectado en mutaciones funcionales de LDLR con un defecto en la captación de LDL. (FIGURA 7)

[121] [122]

1.6 Gen DNMT3

El gen de la ADN metiltransferasa 3 (DNMT3) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 2 en la posición 23.3 (2p23.3).

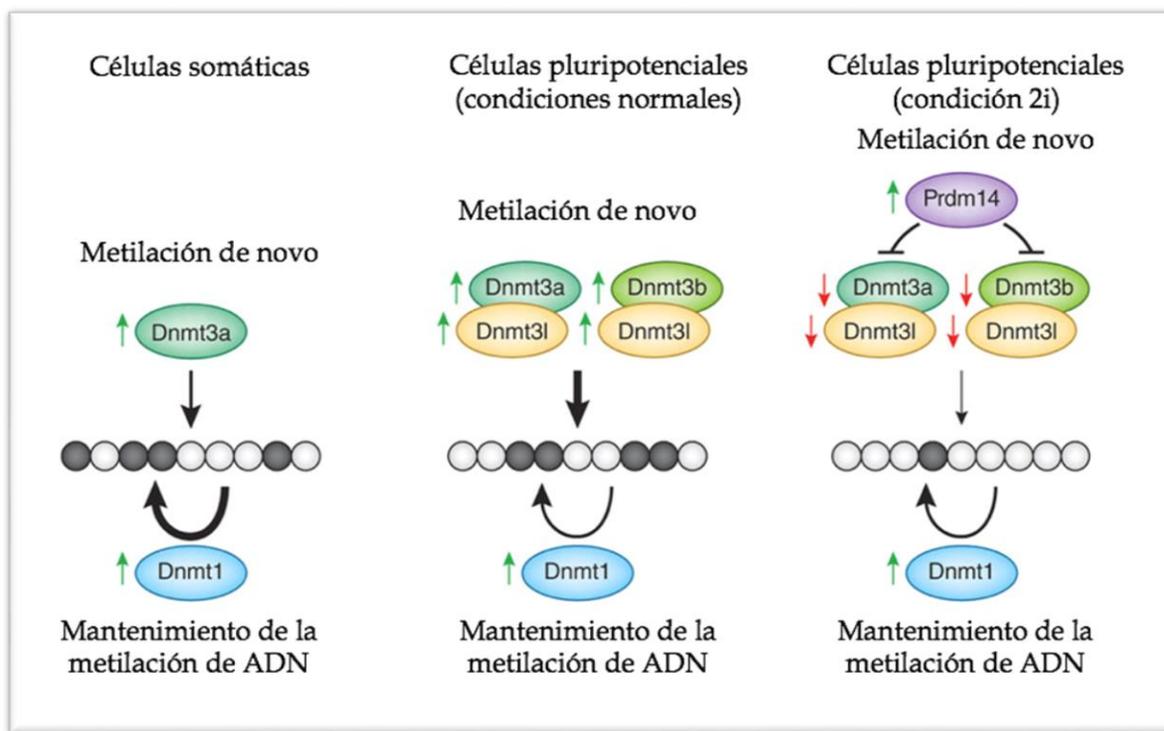


FIGURA 11. Mantenimiento de los patrones de metilación del ADN. [123]

Las ADN metiltransferasas pertenecen a una familia de enzimas formada principalmente por DNMT1, DNMT3A, y DNMT3B, se encargan de catalizar la transferencia de grupos metilo en el carbono 5 de la citosina en el ADN, este proceso se conoce como metilación de ADN. [124] DNMT1 es responsable del mantenimiento de la metilación, la cual asegura la fidelidad de la replicación de los patrones epigenéticos heredados, tiene preferencia por el ADN hemimetilado. [125] DNMT3A se encarga de la metilación del ADN de novo, este tipo de metilación modifica la información transmitida de los padres a su progenie, esto habilita modificaciones epigenéticas clave, que son esenciales para procesos como la diferenciación celular, desarrollo embrionario, regulación transcripcional, formación de la heterocromatina, inactivación del cromosoma X, imprinting y la estabilidad del genoma. [126] Se han asociado patrones de metilación aberrantes con cierto tipo de tumores y el desarrollo de anomalías. [127]

En el caso de DNMT1, ciertos polimorfismos de este gen han sido relacionados con diferentes enfermedades como la artritis gotosa (rs2228611), cáncer gástrico (rs16999593), enfermedad de Parkinson (rs2424913), neuropatía sensorial hereditaria, ataxia cerebelosa, sordera, y narcolepsia. [128] [129]

1.6.1 Epigenética

La epigenética se define como un rasgo fenotípico heredable resultante de los cambios en un cromosoma sin alteraciones en la secuencia de ADN. Estudia los factores no genéticos que contribuyen a la expresión génica. [130]

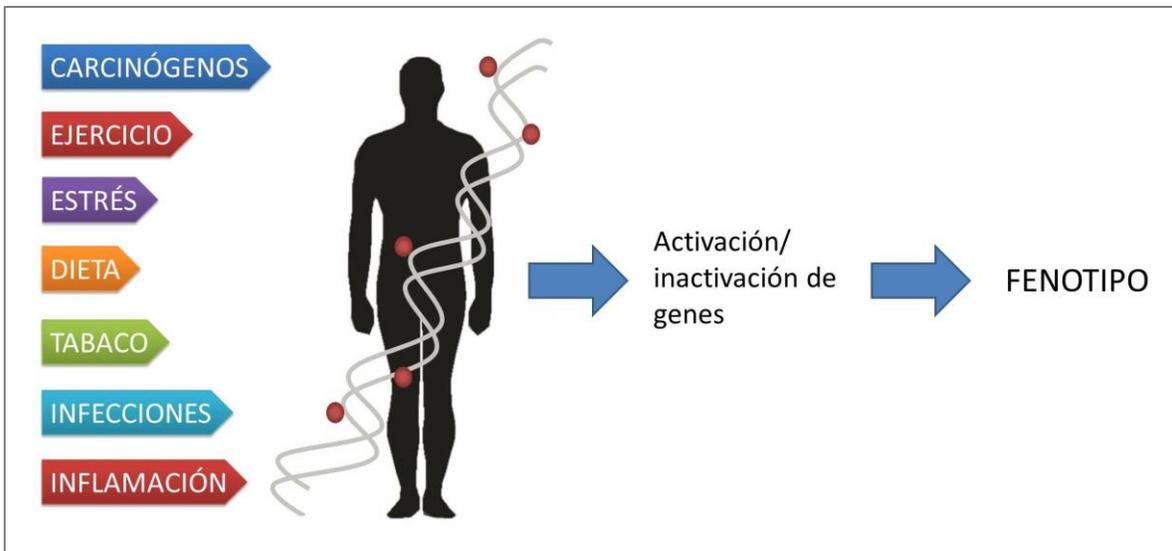


FIGURA 12. Representación de la influencia ambiental en el genoma humano. [131]

Una de las áreas más prometedoras para el estudio de diversas enfermedades, entre ellas la EAC es la epigenética, dado que diversos factores de tipo ambiental que son cruciales en la génesis, desarrollo y progreso de las enfermedades cardiovasculares, repercuten en la regulación de este mecanismo clave.

Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, modificación de las histonas, y las alteraciones de microRNA's, entre otros que en conjunto hacen posible que la célula responda rápidamente a los cambios ambientales. Una serie de factores de riesgo de EAC, como la nutrición, el tabaquismo, la contaminación, el estrés y el ritmo circadiano, se han asociado con la modificación de las marcas epigenéticas. Un examen más detallado de estos mecanismos puede conducir a la prevención temprana y el tratamiento novedoso para las enfermedades cardiovasculares. [132]

1.6.2 Metilación del ADN

La metilación del ADN es una de las modificaciones epigenéticas más importantes, desempeñando papeles clave en la regulación de la expresión génica, genómica, la inactivación del cromosoma X y la tumorigénesis (FIGURA 8). [133]

Para llevar a cabo este proceso de metilación del ADN, existen una serie de proteínas con actividad enzimática denominadas ADN metiltransferasas. (DNMT por sus siglas en inglés), las cuales, catalizan la transferencia de grupos metilo desde la S-adenosil metionina (SAM), que es un aminoácido donador de grupos metilo, hacia la posición 5 de la citocina del ADN, de los dinucleótidos CG, que se encuentran en regiones del genoma conocidas como islas CpG's, la cuales son abundantes en las regiones de los promotores de los genes. [134]

Se han identificado tres tipos de DNMT's en los mamíferos: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. [135]

Estas proteínas están altamente conservadas entre especies y tienen secuencias de aminoácidos similares. La región N-terminal contiene un dominio regulador que permite a las DNMT's anclar en el núcleo y reconocer ácidos nucleicos o nucleoproteínas, en tanto que el extremo C-terminal posee un dominio catalítico, que es responsable de la actividad enzimática. [136] [137]

La DNMT1, DNMT3A y DNMT3B participan todas en el proceso de metilación, pero en diferentes contextos: la DNMT1 es necesaria para el mantenimiento de la metilación constitutiva del genoma, en tanto que la DNMT3A y la DNMT3B se encargan de la metilación de novo. Las DNMT's se encuentran codificadas por los genes DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. (FIGURA 9) [138]

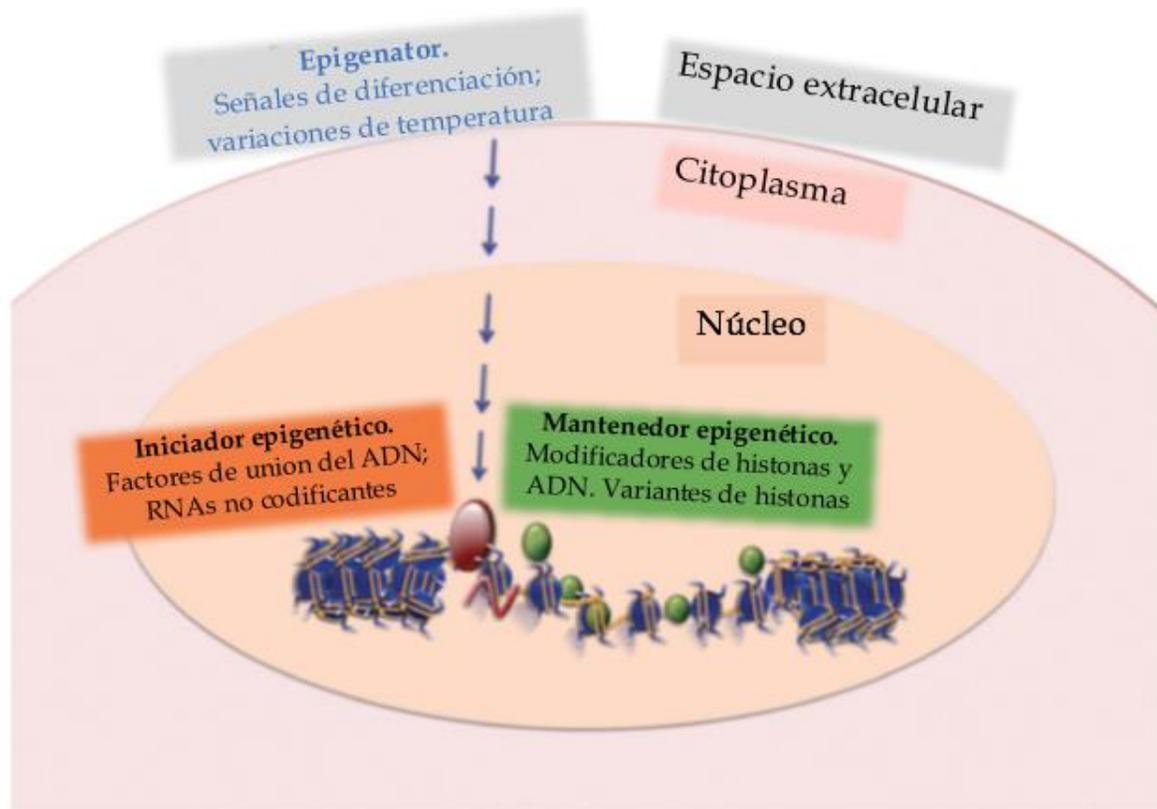


FIGURA 13. La vía epigenética.

Una señal externa "epigenator" proveniente del ambiente puede iniciar la vía epigenética. El iniciador epigenético recibe la señal del "epigenator" y es capaz de determinar la localización precisa de la cromatina (mostrada en azul). El "mantenedor epigenético" sostiene el ambiente de la cromatina por todas las generaciones. (Tomado de Berger, et al.)

2. Planteamiento del problema

Las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad arterial coronaria aparecen cuando la placa de ateroma ya se encuentra en etapas muy avanzadas y representa un alto riesgo de presentar infarto de miocardio o incluso la muerte. Tomando en cuenta que las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en el mundo, el abordaje de este problema desde el punto de vista molecular

representa la posibilidad de identificar nuevos blancos terapéuticos basados en genes de susceptibilidad, así como de disminuir el riesgo de desarrollar EAC.

Por lo anteriormente expuesto en este trabajo nos propusimos investigar en nuestra población a los polimorfismos de los genes PCSK9 y DNMT3A, toda vez que no existen reportes de la asociación de polimorfismos de estos genes y la EAC en población mexicana y los resultados de este trabajo, pueden sentar las bases para el diseño de estrategias preventivas, diagnósticas, y terapéuticas de la EAC.

3. Justificación

Las enfermedades complejas, tales como la EAC, son el resultado de la interacción de factores ambientales y genéticos, en estos últimos se incluyen mutaciones, polimorfismos, modificaciones epigenéticas, entre otros. Estos en conjunto generan modificaciones a nivel de transcripción, traducción y postraducción, los cuales influyen en vías metabólicas y moleculares, las cuales repercuten a nivel celular y extracelular, predisponiendo al desarrollo de patologías. Por dicha razón, en las últimas décadas ha existido un creciente interés en determinar los factores genéticos asociados al desarrollo de los diferentes componentes de la EAC y otras enfermedades complejas. [139]

Además, tan solo hasta el año 2016, en todo el mundo murieron 12,077,370 millones de personas al año por enfermedades del corazón, de las cuales 9,433,224 corresponden exclusivamente a enfermedad arterial coronaria (52.8% del total de muertes por causa cardiovascular). [4]

En México, la enfermedad arterial coronaria y la diabetes son dos de los más grandes problemas de la salud pública. La cardiopatía afecta sobre todo a los

hombres de mediana y avanzada edad y su mortalidad es 20% más alta en los hombres que en las mujeres. Representa un factor importante de muerte en todos los adultos, el mayor número de defunciones ocurre en personas de ambos géneros de 65 años o más, lo que subraya que la edad avanzada es un poderoso inductor de esta enfermedad. Este grupo de enfermedades es la primera causa de mortalidad y anualmente ocurren cerca de 70,000 defunciones y 26,000 por enfermedades cerebrovasculares. El proceso fisiopatológico, que origina los diferentes tipos de eventos cardiovasculares, y a la enfermedad arterial coronaria subclínica, es la aterosclerosis, la cual se considera una enfermedad multifactorial originada a partir de la interacción entre los factores de riesgo, que contribuyen a acelerar su aparición temprana, y la probabilidad de presentar eventos cardiovasculares de características isquémicas con diferente grado de morbimortalidad. Adicionalmente, la alteración de ciertos mecanismos moleculares y celulares promueve el desarrollo del proceso obstructivo en las arterias afectadas. Por lo que la estimación de la asociación, entre los factores de riesgo y las rutas celulares y moleculares que contribuyen al desarrollo de esta patología, puede mejorar el conocimiento del origen, el inicio y la progresión de la EAC. Esta información, puede generar nuevas estrategias de prevención, con base en una mejor estratificación de los factores de riesgo en la población, a través del monitoreo de biomarcadores y la elaboración de nuevos fármacos diseñados para modular, blancos moleculares, involucrados en el inicio, progreso o manifestaciones clínicas del proceso aterogénico. [\[140\]](#) [\[141\]](#)

Múltiples estudios han demostrado la importancia de los factores genéticos, la interacción entre múltiples genes y los factores de riesgo ambientales, por ejemplo; en 2015, un estudio multicéntrico, identificó 27 loci de riesgo aumentado de enfermedad arterial coronaria [142], por otra parte, durante 2017, otro estudio reveló 15 nuevos loci asociados con el desarrollo de Enfermedad arterial prematura. [143]

Aunque los resultados de estos estudios siguen siendo controversiales y sin consenso sobre sus implicaciones, la identificación de genes de susceptibilidad tiene el potencial de aportar información para el desarrollo de nuevos tratamientos y así, poder disminuir el riesgo de presentar EAC. [114]

Por lo que la estrategia, es analizar polimorfismos presentes en genes candidatos, que codifican proteínas importantes, en el sistema homeostático involucrado en la fisiología cardiovascular. Se han reportado muchos estudios en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas, sin embargo, hay pocos datos disponibles en población mexicana, y que, a causa de las diferencias raciales y étnicas con nuestra población, es primordial, construir una base de datos propia, de los polimorfismos relacionados con EAC.

4. Hipótesis

Las variaciones genéticas de los polimorfismos de PCSK9 (rs505151, rs2479409, rs615563, rs2149041) y DNMT3A (rs13420827, rs752208, rs1550117) se asocian como factores de riesgo en población mexicana con Enfermedad Arterial Coronaria prematura.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar si los polimorfismos de los genes de PCSK9 y DNMT3A estudiados en individuos con aterosclerosis subclínica (AS) se asocian a susceptibilidad o protección de la enfermedad al compararlos con individuos control.

5.2 Objetivos específicos

- Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes ubicadas en los sitios polimórficos de los genes que codifican para PCSK9 y DNMT3A en un grupo de individuos mexicanos con AS y en un grupo control sin antecedentes familiares, ni clínicos de EAC.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los pacientes y controles, para establecer si existen diferencias entre ellos con el fin de definir si algún SNP estudiado pudiera estar confiriendo susceptibilidad o protección para el desarrollo del padecimiento.
- Estudiar el desequilibrio de ligamiento en los diferentes polimorfismos y construir los distintos haplotipos.
- Analizar los haplotipos construidos para definir cuál de ellos está confiriendo susceptibilidad o protección genética a la EAC.

6. Materiales y métodos

6.1 Tipo de estudio

Es un estudio de casos y controles, de tipo transversal y analítico anidado al proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA) del Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”, diseñado

para estudiar las bases genéticas de la enfermedad arterial coronaria, y las relaciones de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales y emergentes con la aterosclerosis subclínica en adultos mexicanos. [103]

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez” (Número de registro INCICH: 15–915) y realizado de acuerdo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

6.2 Población de estudio:

6.2.1 Proyecto GEA

El proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerótica) es una iniciativa del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, la cual tiene como objetivo caracterizar los factores de riesgo asociados a la genética de la enfermedad cardiovascular en la población mestizo-mexicana. El proyecto GEA ha estudiado la EAC a través de los fenómenos de aterosclerosis, trombosis, disfunción endotelial y EAC prematura, asimismo se ha generado una cohorte bien caracterizada de más de 1500 controles clínicamente sanos y más de 1200 pacientes con aterosclerosis subclínica, angina estable crónica y síndrome coronario agudo (SCA). El primer reporte derivado de este proyecto se publicó en 2012 [103], donde se reportan las características iniciales de los pacientes estudiados, los métodos de enrolamiento para los fines de este proyecto. Asimismo, en la actualidad se cuenta con más de 30 publicaciones en revistas nacionales e internacionales, así como tesis de licenciatura, maestría y doctorado, derivadas de esta iniciativa.

Debido a la gran cantidad de participantes y al tiempo de seguimiento que han tenido los participantes, la gran mayoría de los estudios realizados son estudios de asociación genética, los cuales tienen una metodología transversal.

Los resultados que se presentan en esta tesis doctoral pertenecen a un estudio anidado al proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerótica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

En este trabajo se estudiaron 1496 participantes asintomáticos, aparentemente sanos y sin historia personal o familiar de EAC en familiares de primer grado. Todos los participantes se reclutaron del banco de sangre del instituto de la población que acude con fines de donación y para aumentar el reclutamiento de personas mayores, se solicitó a los participantes referir individuos menores de 60 años y de 65 años en mujeres al momento del estudio.

6.2.2 Estudio de ancestría

Tanto en el grupo de aterosclerosis subclínica (AS) como en el grupo control fue requisito que el sujeto de estudio y sus dos generaciones previas fueran mestizos y hayan nacido en México. [144] Para confirmar que la estratificación de la población no fuera un sesgo o un factor de confusión en este estudio, se corrieron previamente 265 paneles de marcadores de ancestría que distinguen entre amerindios, europeos y africanos. [145] Participaron únicamente los individuos que después de conocer las características del estudio aceptaron firmar la forma de consentimiento informado.

6.2.3 Grupos de estudio

Con la finalidad de identificar a los individuos con menor riesgo de eventos coronarios y para diagnosticar aterosclerosis subclínica, a todos los participantes del estudio se les determinó el calcio arterial coronario (CAC), por medio del método Agatston, en un tomógrafo multidetector, asignando al grupo control quienes presentaron CAC= 0, y al grupo de individuos con aterosclerosis subclínica (AS) a los participantes que presentaron CAC= > 0. [146]

6.2.3.1 Grupo control

De los participantes estudiados 1102 individuos que presentaron un registro de calcio arterial coronario de 0 se incluyeron en el grupo control.

6.2.3.2 Grupo aterosclerosis subclínica (AS)

Después de interpretar los resultados de la TAC, 394 participantes que presentaron un registro de calcio arterial coronario > 0, se integraron en el grupo de individuos con aterosclerosis subclínica (AS)

6.3 Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con aterosclerosis prematura, insuficiencia cardiaca congestiva, enfermedad hepática, renal u oncológica, distiroidismo no tratado y aquellos con tratamiento corticosteroide.

6.4 Mediciones clínicas y antropométricas

Después de un período de reposo de 10 min, la presión arterial se midió en posición sedente, con un esfigmógrafo digital Welch Allyn Series 5200 (Skaneateles Falls, N.Y., EE. UU.), y el promedio de las 2 últimas de 3 mediciones consecutivas fue utilizado para el análisis. La hipertensión arterial se definió con cifras de presión

arterial sistólica y diastólica $\geq 140/90$ mmHg y/o uso de medicamentos antihipertensivos.

Se midieron el peso y la talla utilizando una báscula calibrada y un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania), y se calculó el índice de masa corporal dividiendo el peso en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros. Se consideró la presencia de sobrepeso cuando el índice de masa corporal fue de 25 a 29.9 kg/m², y de obesidad, cuando fue ≥ 30 kg/m². La circunferencia de la cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre el borde inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La obesidad central fue considerada como cintura > 90 cm en hombres y > 80 cm en mujeres [147].

6.5 Mediciones bioquímicas

Se obtuvieron muestras de sangre venosa después de un período de 12 horas de ayuno. La glucosa plasmática, el colesterol total (CT), los triglicéridos (Tg), el colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL), la apolipoproteína B (ApoB) y la apolipoproteína A-I se cuantificaron utilizando procedimientos enzimáticos-colorimétricos (Roche/Hitachi, Alemania) en un autoanalizador Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio, Japón). La precisión y la reproducibilidad de las mediciones de lípidos en el laboratorio de endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología son evaluadas de forma periódica por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, GA (EE. UU.). El colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) fue estimado de acuerdo con la ecuación de DeLong et al. [148]. El colesterol no asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-no HDL) se obtuvo restando el colesterol de HDL al colesterol total.

Los fenotipos del colesterol LDL en los sueros de los participantes se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) de modo vertical. La técnica aplicada fue estandarizada cuidadosamente y cada muestra se procesó por duplicado. [149]

La proteína C reactiva de alta sensibilidad se determinó por medio de inmunonefelometría (BN ProSpec Nefelometer, Dade Behring, Marburgo, Alemania). El coeficiente de variación fue < 6% en todos los ensayos. La interleucina 15 se midió por LUMINEX (Bio-Rad Inc., Hercules, California, EE. UU.). La insulina, por radioinmunoanálisis (Millipore RIA Kit ST, St. Charles, Mo, EE. UU.), con coeficientes de variación intra e interensayo de 2.1 y 6.8%, respectivamente.

La hiperinsulinemia se definió como un valor ≥ 16.97 μ U/mL en mujeres y ≥ 15.20 μ U/mL en hombres. La resistencia a la insulina fue estimada por medio del Modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-RI), y se consideró presente cuando los valores se encontraron por arriba del percentil 75 (3.66 en mujeres y 3.38 en hombres). La concentración de adiponectina se determinó por inmunoanálisis (Quantikine ELISA, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE. UU.) Para la adiponectina baja, se tomaron como referencia los valores por debajo del percentil 25 (8.67 μ g/mL en mujeres y 5.3 μ g/mL en hombres). Estos valores fueron obtenidos de una submuestra del estudio GEA que incluyó 131 hombres y 185 mujeres sin obesidad, y con valores normales de presión arterial, glucosa y lípidos. La diabetes mellitus fue definida de acuerdo con los criterios de la Asociación Americana de Diabetes, [150] cuando los participantes manifestaron utilizar medicamentos para el control de la glucosa y en aquellos con diagnóstico previo de

diabetes realizado por un médico. Las dislipidemias se definieron de acuerdo con los siguientes puntos de corte: hipercolesterolemia si CT > 200 mg/dl o c-LDL > 130 mg/dL; hipertrigliceridemia si Tg > 150 mg/dL; c-HDL bajo si c-HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres; índice aterogénico si relación CT/c-HDL > 4.5.

6.6 Mediciones tomográficas

En todos los participantes se evaluó la CAC y se cuantificó la grasa abdominal visceral (GAV). Las mediciones se realizaron utilizando un tomógrafo multidetector de 64 (Somaton Sensation, Siemens, Malvern, PA, EE. UU.) o 256 cortes (Somaton Definition Flash, Siemens, Erlangen, Alemania) antes y después de febrero del 2009, respectivamente. El estudio se obtuvo con sincronización cardíaca mediante protocolo prospectivo con los siguientes parámetros: 120 kV, 120 mAs y grosor de corte de 3 mm. La CAC se cuantificó de acuerdo con el método de Agatston. Para la medición de la GAV se realizó un solo corte tomográfico a nivel del espacio intervertebral L4-L5. El área transversal total del tejido adiposo abdominal fue medida utilizando el rango de atenuación entre -190 y -30 unidades Hounsfield. El área de grasa abdominal visceral (GAV) fue separada mediante un trazo manual siguiendo la pared muscular abdominal y se cuantificó en centímetros cuadrados. Las imágenes fueron interpretadas por un radiólogo experto, en una estación de trabajo (Leonardo Workstation, Siemens, Forchheim, Alemania) provista de un programa dedicado para el análisis del índice de calcio (CaScoring, Siemens, Forchheim, Alemania). El test-retest para el puntaje de Agatston, utilizado para evaluar la fiabilidad intraobservador, mostró un coeficiente de correlación intraclase muy alto (0.99) [151].

6.7 Mediciones moleculares

6.7.1 Selección de los polimorfismos genéticos

Se realizó una revisión de la literatura para conocer el estado del arte sobre los polimorfismos de un solo nucleótido más recientemente asociados, ya sea con enfermedad cardiovascular o con otras enfermedades complejas como cáncer o alzheimer, lo anterior para seleccionar los polimorfismos más convenientes para nuestro estudio, que presentaron reportes de frecuencias de alelo menos común arriba de 10% por lo menos, como se muestra en la TABLA 3. La frecuencia del alelo menos común en un determinado locus puede estimarse a partir de los datos disponibles en el proyecto 1000 genomas, donde se presenta el alelo de menor frecuencia (A, T, C o G), la frecuencia expresada en porcentaje y por último la frecuencia observada de ese alelo en la población de estudio. [152]

TABLA 3. Polimorfismos analizados

<i>Gen</i>	<i>RefSeq</i>	<i>Alelos</i>	<i>Gobal MAF</i>	<i>Localización</i>
<i>PCSK9</i>	rs2479409	AG	G=0.3986/1996	Upstream 2KB
	rs615563	AG	A=0.3195/1600	Intrón
	rs13420827	CG	G=0.2093/1048	3'UTR
<i>DNMT3A</i>	rs752208	AG	A=0.1793/898	Variante downstream
	rs1550117	AG	A=0.1142/572	Promotor

RefSeq= Número de referencia del polimorfismo, MAF= Alelo de menor frecuencia

6.7.2 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de alta calidad fue extraído de leucocitos de muestras de sangre anticoagulada con EDTA por el método de expulsión salina modificada usando kits comerciales (QIAamp DNA Blood Mini kit, Qiagen, Germany). [153] y fue leído a diferentes densidades ópticas (230nm, 260nm y 280nm) para su cuantificación en el espectrofotómetro automatizado Nanodrop ND-1000 y para estimar su grado de

pureza, posteriormente se corrió una electroforesis en gel de agarosa para comprobar su integridad.

Por medio de diluciones se realizó el ajuste de la concentración para la obtención de alícuotas a 100 ng/μl de ADN, y de estas se prepararon otras a una concentración de 10 ng/uL.

6.7.3 Genotipificación

Para la identificación de los polimorfismos se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real, utilizando sondas de hidrólisis (sondas TaqMan), en el equipo termociclador de Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System, usando un software de discriminación alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y para validar la correcta asignación de los genotipos, 10% de las muestras para ambos grupos fueron determinados por duplicado y los resultados mostraron 100% de concordancia. (Ver TABLA 7)

6.8 Análisis Estadístico

La población se ajustó por edad, sexo, IMC, colesterol LDL, tabaquismo y diabetes. Los datos se expresan como media \pm desviación estándar, mediana (rango intercuartil) o porcentajes. Las comparaciones entre grupos se realizarán con la prueba t-Student o U de Mann-Whitney para variables numéricas y X² para las variables categóricas.

La variable CAC se utilizó como variable categórica (CAC > 0 o CAC = 0) y como variable continua utilizando el puntaje de Agatston. El análisis de correlación de Spearman se utilizó para conocer la asociación de los diferentes factores de riesgo coronario con el logaritmo $-\log_{10}$ del puntaje de Agatston. Mediante Modelos de

regresión logística binaria se evaluará la independencia de la asociación entre los factores de riesgo cardiovascular y la presencia de CAC. Para evaluar la independencia de la asociación de los factores de riesgo con la magnitud de la calcificación coronaria se construirá un Modelo de regresión lineal múltiple en el que se incluyeron las variables que muestren significado estadístico en el análisis univariado.

Para el análisis de asociación de los genotipos encontrados, con los diferentes grupos de estudio, se compararán variables cuantitativas entre grupos con la prueba de Kruskal-Wallis más comparación múltiple de Dunn o anova de una vía más prueba de Tukey y chi cuadrada para las variables categóricas.

El valor de $p < 0.05$ se considerará significativo. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

7. Resultados

7.1 Tamaño de muestra

N: 1496

Grupo de aterosclerosis subclínica 396 individuos (CAC>0)

Grupo control: 1102 personas sanas (CAC=0)

7.2 Estudios de ancestría

Los resultados de ancestría no mostraron diferencias significativas entre los grupos (55.8% vs. 54% ancestría amerindia, 34.3% vs. 35.8% caucásica y 9.8% vs 10.1% africana para pacientes y controles respectivamente, $P>0.05$), por lo que se considera a nuestra población mestiza mexicana.

7.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

7.3.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de PCSK9

A todos los polimorfismos estudiados se les realizó el cálculo para determinar si las frecuencias observadas de los genotipos eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg, en la TABLA 4 se muestran los resultados de las frecuencias observadas de rs2479409 y rs615563 del gen PCSK9 que presentaron frecuencias genotípicas observadas y esperadas consistentes con el equilibrio de Hardy Weinberg ($p > 0.05$).

Encontrando que ambos grupos de estudio se encontraban en equilibrio para todos los polimorfismos y desde el punto de vista de la distribución alélica, se determinó que la nuestra población estudiada se encuentra en Equilibrio de Hardy-Weinberg.

TABLA 4. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg de polimorfismos de PCSK9

SNP	#	WT	HET	VAR	MAF	Gpo	P	χ^2
		GG	AG	AA				
rs615563	Obs	1155	386	40	0.15	Control	0.54589	1.284054206
	Esp	1149.3	397.3	34.3				
	Obs	948	246	33	0.13	AS	0.751812	0.57176783
	Esp	934.8	272.3	19.8				
rs2479409	Obs	741	656	172	0.32	Control	0.14092	2.167882937
	Esp	728.3	681.3	159.3				
	Obs	599	517	114	0.87	AS	0.872317	0.025829626
	Esp	597.8	519.4	112.8				

Si $\chi^2 < 3.84$ y $P > 0.05$ = población en equilibrio de HW.

7.3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg de los polimorfismos de DNMT3A

A todos los polimorfismos estudiados se les realizó el cálculo para determinar si las frecuencias observadas de los genotipos eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg, en la TABLA 5 se muestran los resultados de las frecuencias observadas de los polimorfismos rs13420827, rs752208 y rs1550117 del gen

DNMT3A, los cuales presentaron frecuencias genotípicas observadas y esperadas consistentes con el equilibrio de Hardy Weinberg ($p > 0.05$).

TABLA 5. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg de polimorfismos de DNMT3A

SNP		WT	HET	VAR				
	#	CC	CG	GG	MAF	Grupo	P	χ^2
rs13420827	Obs	834.8	372.3	18.98	0.20	Control	0.54589	1.284054206
	Esp	741	656	172				
	Obs	728.3	681.3	159.3	0.21	Aterosclerosis subclínica		
	Esp	599	517	114				
rs752208	#	GG	AG	AA	MAF	Grupo	P	X2
	Obs	1155	386	40	0.12	Control	0.14092	2.167882937
	Esp	1149.3	397.3	34.3				
	Obs	948	246	33	0.17	Aterosclerosis subclínica		
Esp	934.8	272.3	19.8					
rs1550117	Obs	741	656	172	0.10	Control	0.751812	0.57176783
	Esp	728.3	681.3	159.3				
	Obs	599	517	114	0.11	Aterosclerosis subclínica		
	Esp	597.8	519.4	112.8				

Si $\chi^2 < 3.84$ y $P > 0.05$ = población en equilibrio de HW.

7.4 Edad y género

En el grupo control el promedio de edad fue 51 años a diferencia del grupo EAC el cual fue 54, mostrando una diferencia estadísticamente significativa. En relación con el género se determinó una diferencia entre ambos grupos, siendo el porcentaje de hombres en los controles de 41.6% y en el grupo de EAC 81%.

7.5 Parámetros metabólicos, clínicos y cardiovasculares

En nuestra población, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros clínicos y metabólicos entre el grupo control y los individuos con aterosclerosis subclínica (grupo AS) quienes mostraron valores más altos de presión sanguínea diastólica y sistólica, circunferencia de cintura, LDL, GLUCOSA, homa y GGT como se muestra en la TABLA 6.

7.6 Estimación de los factores de riesgo

Observamos que la prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, resistencia a la insulina y síndrome metabólico fue más alta en individuos con aterosclerosis subclínica en comparación con el grupo control, ver TABLA 7.

7.7 Mapas de discriminación alélica

La genotipificación de las muestras de ADN mediante la técnica de PCR en tiempo real con sondas Taqman permitió la construcción de los mapas de discriminación alélica para poder obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de la población estudiada, necesarias para realizar el análisis de asociación con la enfermedad arterial coronaria, como ejemplo, se presenta el mapa de genotipos correspondiente al polimorfismo rs2479409 del gen PCSK9. Ver FIGURA 14.

TABLA 6. Características clínicas y metabólicas de los grupos de estudio.

Características	Grupo Control (n=1102)	Grupo AS (n=394)	P
Edad (años)	51 ± 9	59 ± 8	<0.001
Genero (% hombres)	41	75.4	<0.001
Circunferencia de cintura (cm)	93.6 ± 11.2	97.2 ± 10.7	<0.001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27.9 [25.4-30.8]	28.1 [25.9-31.0]	0.080
Tensión arterial sistólica (mmHg)	112 [104-125]	122 [111-134]	<0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	71 [65-76]	75 [69-82]	<0.001
Colesterol LDL (mg/Dl)	115 [95-134]	124 [102-145]	<0.001
Glucosa (mg/Dl)	90 [84-97]	94 [86-105]	<0.001
Insulina (μUI/MI)	16.9 [12.4-23.1]	18 [12.7-24.5]	0.071
Modelo HOMA	3.8 [2.6-5.5]	4.4 [2.9-6.8]	<0.001
Resistencia a la insulina del tejido adiposo	9.3 [6.1-14.3]	10.3 [6.6-14.4]	0.090
Fosfatasa alcalina (IU/L)	81 [68-96]	77 [64-92]	0.005
Gamma-glutamiltanspeptidasa (IU/L)	26 [18-42]	30 [21-42]	<0.001
Interleucina 1b (pg/MI)	0.18 [0.09-0.29]	0.17 [0.11-0.29]	0.577
Interleucina-10 (pg/MI)	0.44 [0.24-0.99]	0.46 [0.24-1.07]	0.737

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartil] Prueba t de Student o Prueba U Mann Whitney.

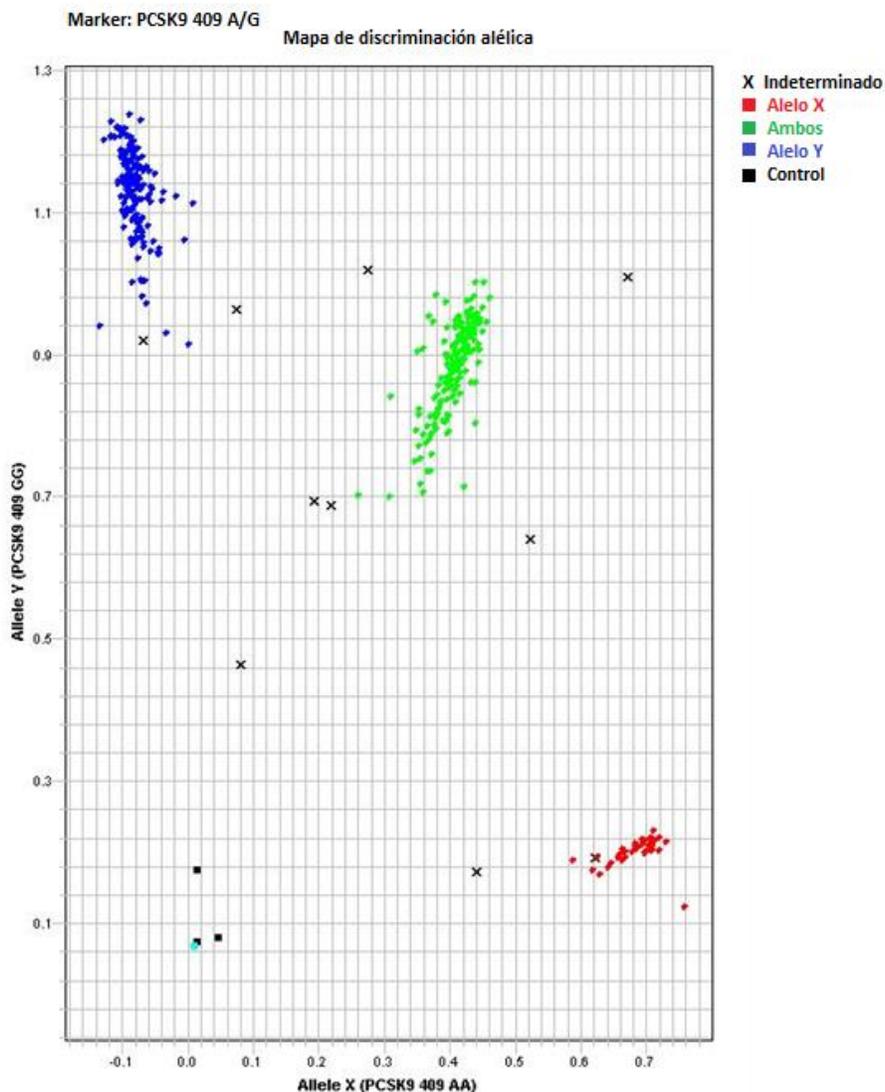


FIGURA 14 Mapa de discriminación alélica de rs2479409 del gen PCSK9

Considerando que el termociclador en tiempo real de Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System tiene una placa con capacidad para 380 pruebas por corrida, se realizaron 4 placas para identificar el genotipo de cada uno de los 5 polimorfismos analizados, haciendo un total de 20 placas corridas, que arrojaron los mapas de discriminación alélica correspondientes para las 8,228 determinaciones.

TABLA 7. Prevalencia de factores de riesgo en la población estudiada

Características	Grupo <i>Control</i> (n=1102)	Grupo AS (n=394)	*P
Obesidad abdominal (%)	81.2	83.2	0.403
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	9.7	22.3	<0.001
Hiperinsulinemia (%)	52.3	61.4	0.002
Resistencia a la insulina (%)	54.3	65.2	<0.001
Resistencia a la insulina del tejido adiposo (%)	47.7	57.0	0.002
Síndrome metabólico (%)	38.5	53.3	<0.001
Fosfatasa alcalina >p75 (%)	37.2	36.8	0.903
Gamma-glutamiltanspeptidasa >p75 (%)	41.1	44.4	0.284
Interleucina 1 α >p75 (%)	38.2	30.7	0.013
Interleucina-10 <p25 (%)	31.8	30.2	0.598
Tabaquismo actual (%)	22.6	21.3	0.622

Los datos se muestran en porcentajes. LDL= lipoproteínas de baja densidad, HDL= lipoproteínas de alta densidad. *Prueba de Chi cuadrada.

En la TABLA 8 se resume el trabajo de laboratorio realizado para la determinación de los genotipos de cada uno de los polimorfismos estudiados.

TABLA 8. Conteo de pruebas realizadas.

	Grupo control	Grupo AS	Global
N	1,102	394	1,496
Validación (10%)	110.2	39.4	149.6
Total	1,212.2	433.4	1645.6
Polimorfismos	5	5	5
PCRs	6,061	2,167	8,228

7.8 Asociación de los polimorfismos del gen PCSK9 con EAC prematura

Para el análisis de asociación, todos los modelos fueron ajustados por las variables involucradas en el proceso de calcificación arterial coronaria, por lo que se incluyeron edad, sexo, IMC, LDL-C, tabaquismo y diabetes, por considerarlas variables confusoras.

7.8.1 Análisis de polimorfismos de PCSK9 en el grupo control

Con respecto a las anomalías metabólicas en el *grupo control*, el polimorfismo *rs2479409* se asoció estadísticamente con una disminución del riesgo de síndrome metabólico (modelo dominante: OR= 0,768, IC 95%= 0,593-0,994, P= 0,045), bajo riesgo de tener un aumento de la fosfatasa alcalina > p75 (modelo aditivo: OR= 0,758, IC 95%= 0,625–0,919, P = 0,005; modelo dominante: OR= 0,703, IC 95%= 0,548–0,903, P = 0,006; modelo codominante 1: OR= 0,729, IC 95%= 0,560–0,950, P = 0,019 y modelo codominante 2: OR= 0,603, IC 95%= 0,386-0,943, P = 0,027) y bajo riesgo de aumento de gamma-glutamiltanspeptidasa (modelo heterocigoto: OR= 0,760, IC 95%= 0,588-0,982, P = 0,036; modelo codominante 1: OR= 0,751, IC 95%= 0,575 - 0,981, P = 0,036).

Mientras que el polimorfismo *rs615563* se asoció con un menor riesgo de hipertrigliceridemia (modelo recesivo: OR= 0,358, IC 95%= 0,149–0,862, P = 0,022 y modelo codominante 2: OR= 0,374, IC 95%= 0,155–0,903, P = 0,029) y bajo riesgo de tener un aumento de interleucina 1 β > p75 (modelo aditivo: OR= 0,767, IC 95%= 0,598–0,985, P = 0,037).

Estos hallazgos se muestran en las TABLAS 9 y 10. Todos los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC.

TABLA 9. Asociación entre rs2479409 con anomalías metabólicas en el grupo control

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	GG	GA	AA	MAF			
Síndrome metabólico							
No (n = 678)	0.445	0.441	0.014	0.334	Dominante	0.768 [0.593–0.994]	0.045
Si (n = 424)	0.531	0.382	0.087	0.278			
Gama-glutamyl transpeptidasa > p75							
No (n = 649)	0.445	0.450	0.105	0.330	Heterocigoto	0.760 [0.588–0.982]	0.036
Si (n = 453)	0.525	0.373	0.102	0.288	Codominante 1	0.751 [0.575–0.981]	0.036
Fosfatasa alcalina > p75							
No (n = 692)	0.443	0.440	0.118	0.338	Aditivo	0.758 [0.625–0.919]	0.005
Si (n = 410)	0.538	0.381	0.081	0.271	Dominante	0.703 [0.548–0.903]	0.006
					Codominante 1	0.729 [0.560–0.950]	0.019
					Codominante 2	0.603 [0.386–0.943]	0.027

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

TABLA 10. Asociación entre rs615563 con anomalías metabólicas en el grupo control

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	GG	GA	AA	MAF			
Hipertrigliceridemia							
No (n = 580)	0.722	0.238	0.040	0.160	Recesivo	0.358 [0.149–0.862]	0.022
Si (n = 522)	0.728	0.259	0.013	0.143	Codominante 2	0.374 [0.155–0.903]	0.029
Interleucina 1β > p75							
No (n = 681)	0.700	0.265	0.036	0.167	Aditivo	0.767 [0.598–0.985]	0.037
Si (n = 421)	0.752	0.231	0.018	0.134			

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

7.8.2 Análisis de polimorfismos de PCSK9 en participantes del grupo AS

En el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica y analizado bajo diferentes modelos de herencia el polimorfismo rs615563 de PCSK9 se asoció significativamente con una disminución del riesgo de obesidad central (modelo recesivo: OR= 0,093, IC 95%= 0,010-0,839, P= 0,034), síndrome metabólico (modelo aditivo: OR= 0,593, IC 95%= 0,388-0,907, P= 0,016), hiperinsulinemia (modelo aditivo: OR= 0,556, IC 95%= 0,363-0,881, P= 0,012; y modelo codominante 1: OR= 0,509, IC 95%= 0,300 a 0,863, P = 0.012), resistencia a la insulina (modelo codominante 1: OR= 0.486, IC 95%= 0.286–0.829, P= 0.012), insulina resistencia del tejido adiposo (modelo codominante 1: OR= 0,453, IC 95%= 0,453–0,754, P= 0,002), bajo riesgo de aumento de la fosfatasa alcalina > p75 (modelo dominante: OR= 0,636, IC 95%= 0,421–0,962, P= 0,032) y bajo riesgo de tener una disminución de la interleucina 10 <p25 (modelo codominante 1: OR= 0,487, IC 95%= 0,264–0,896, P = 0,021). Estos datos están representados en la TABLA 11.

El polimorfismo rs2479409 se asoció con un bajo riesgo de insulina resistencia del tejido adiposo (modelo codominante 1: OR= 0,426, IC 95%= 0,218-0,829, P= 0,012), y un riesgo bajo de aumento de interleucina 1β > p75 (modelo recesivo: OR= 0,397, IC 95%= 0,176-0,893, P= 0,026). Ver TABLA 12

TABLA 11. Asociación entre rs615563 con anomalías metabólicas en el grupo AS (aterosclerosis subclínica)

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	* p
	GG	GA	AA	MAF			
Obesidad central							
No (n = 66)	0.697	0.227	0.076	0.189	Recesivo	0.093 [0.010–0.839]	0.034
Si (n = 328)	0.744	0.241	0.015	0.136			
Síndrome metabólico							
No (n = 184)	0.679	0.283	0.038	0.179	Aditivo	0.593 [0.388–0.907]	0.016
Si (n = 210)	0.786	0.200	0.014	0.114			
Hiperinsulinemia							
No (n = 152)	0.664	0.296	0.039	0.188	Aditivo	0.556 [0.363–0.881]	0.012
Si (n = 242)	0.781	0.202	0.017	0.118	Codominante 1	0.509 [0.300–0.863]	0.012
Resistencia a la insulina							
No (n = 137)	0.657	0.299	0.044	0.193	Codominante 1	0.486 [0.286–0.829]	0.012
Si (n = 257)	0.778	0.206	0.016	0.119			
Insulino resistencia del tejido adiposo							
No (n = 169)	0.660	0.309	0.031	0.183	Codominante 1	0.453 [0.453–0.754]	0.002
Si (n = 225)	0.786	0.191	0.023	0.113			
Fosfatasa alcalina > p75							
No (n = 249)	0.418	0.438	0.145	0.363	Dominante	0.636 [0.421–0.962]	0.032
Si (n = 145)	0.531	0.366	0.103	0.286			
Interleucina 10 < p25							
No (n = 275)	0.716	0.260	0.024	0.154	Codominante 1	0.487 [0.264–0.896]	0.021
Si (n = 119)	0.824	0.148	0.028	0.100			

Los Modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC. > p75:> percentil 75; <p25: <percentil 25.

TABLA 12. Asociación entre rs2479409 con anomalías metabólicas en el grupo AS (aterosclerosis subclínica)

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	* p
	GG	GA	AA	MAF			
Insulino resistencia del tejido adiposo							
No (n = 169)	0.389	0.438	0.173	0.391	Codominante 1	0.426 [0.218–0.829]	0.012
Si (n = 225)	0.507	0.395	0.098	0.296			
Interleucina 1β > p75							
No (n = 273)	0.452	0.395	0.153	0.352	Recesivo	0.397 [0.176–0.893]	0.026
Si (n = 121)	0.491	0.436	0.073	0.293			

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC. > p75:> percentil 75; <p25: <percentil 25.

7.8.3 Asociación de polimorfismos de PCSK9 con colesterol-LDL y triglicéridos.

Se determinaron las concentraciones de LDL-C y triglicéridos (TG) en toda la población (individuos con AS y controles). Los valores obtenidos se analizaron estratificando los diferentes genotipos de ambos polimorfismos en la población de estudio, los resultados fueron similares para rs615563. Ver TABLA 13. Sin embargo, en rs2479409 se observaron diferentes concentraciones de triglicéridos en el grupo control ($p = 0.016$) Ver TABLA 14.

TABLA 13. Asociación entre el polimorfismo rs615563 con LDL-C y triglicéridos.

Genotipos	GG	GA	AA	* p
Toda la población				
n:1496	1089	367	40	
LDL-C (mg/dL)	118 [96–138]	118 [97–136]	112 [102–141]	0.837
Triglicéridos (mg/dL)	149 [112–204]	146 [110–203]	124 [101–163]	0.113
Grupo control				
n:1102	799	273	30	
LDL-C (mg/dL)	116 [95–135]	114 [93–132]	110 [103–134]	0.663
Triglicéridos (mg/dL)	146 [108–202]	147 [107–205]	121 [100–147]	0.197
Grupo AS				
n: 394	290	94	10	
LDL-C (mg/dL)	124 [102–145]	125 [106–146]	128 [100–148]	0.928
Triglicéridos (mg/dL)	160 [121–211]	146 [116–195]	147 [113–193]	0.115

Los datos se muestran como la mediana [rango intercuartil]. * Prueba de Kruskal–Wallis.

TABLA 13. Asociación entre el polimorfismo rs2479409 con LDL-C y triglicéridos.

Genotipos	GG	GA	AA	* p
Toda la población n:1496	708	623	165	
LDL-C (mg/dL)	118 [99–137]	118 [95–138]	117 [94–137]	0.467
Triglicéridos (mg/dL)	154 [114–208]	142 [107–201]	147 [106–186]	0.063
Grupo control n:1102	527	461	114	
LDL-C (mg/dL)	116 [96–135]	115 [93–133]	113 [92–131]	0.461
Triglicéridos (mg/dL)	153 [114–209]	137 [101–193]	140 [106–186]	0.016
Grupo AS n: 394	181	162	51	
LDL-C (mg/dL)	125 [106–145]	124 [102–146]	121 [94–146]	0.622
Triglicéridos (mg/dL)	158 [116–205]	154 [120–209]	157 [115–193]	0.677

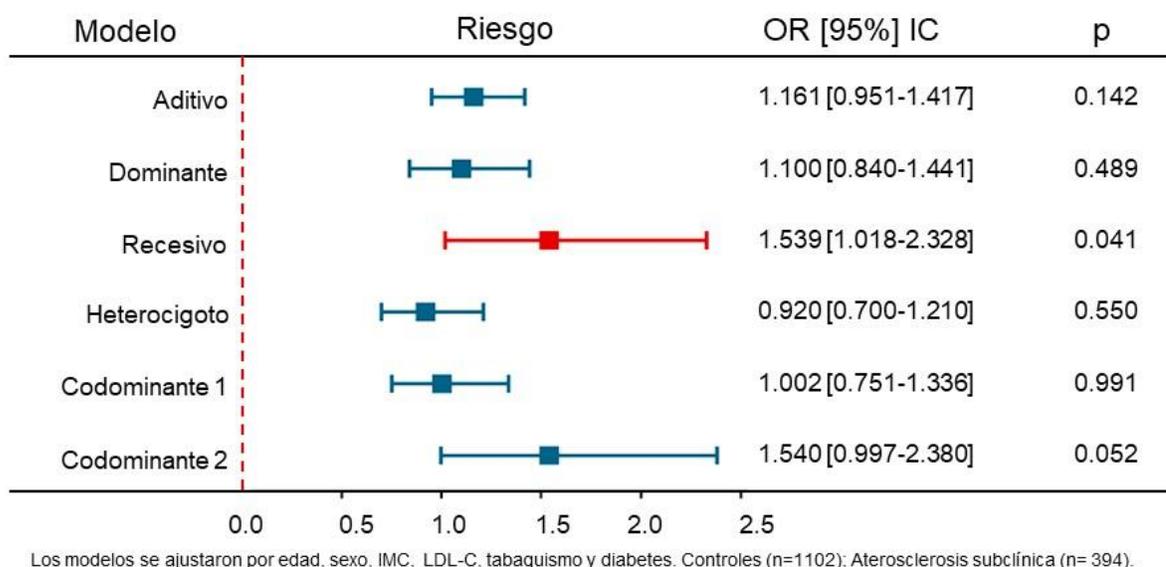
Los datos se muestran como la mediana [rango intercuartil]. * Prueba de Kruskal–Wallis

7.8.4 Asociación de polimorfismos del gen PCSK9 con aterosclerosis

subclínica

La distribución del polimorfismo rs615563 fue similar en individuos con aterosclerosis subclínica (AS) y en los del grupo control. Sin embargo, en el Modelo recesivo ajustado por edad, sexo, IMC, LDL-C, tabaquismo y diabetes, el alelo A del polimorfismo rs2479409 se asoció con un riesgo mayor de aterosclerosis subclínica (OR= 1.539, 95% CI = 1.018–2.328, P = 0.041) Ver FIGURA 15

FIGURA 15. Asociación del polimorfismo *rs2479409* del gen *PCSK9* con aterosclerosis subclínica



Además de este hallazgo, también se encontró que ninguno de los polimorfismos mostró evidencias de desequilibrio de ligamento ($D' = 0.57$) y ninguno de los cuatro bloques de haplotipos construidos se asociaron con aterosclerosis subclínica. Estos datos se describen en la TABLA 15.

TABLA 14. Frecuencia de haplotipos en individuos con y sin aterosclerosis subclínica

Haplotipos	Aterosclerosis subclínica		OR [95% IC]	p
	Si	No		
H1 GG	0.627	0.642	0.935 [0.790–1.107]	0.4351
H2 AG	0.228	0.207	1.138 [0.936–1.384]	0.2028
H3 AA	0.107	0.106	1.004 [0.771–1.308]	0.9733
H8 GA	0.038	0.045	0.841 [0.555–1.277]	0.3918

OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza. El orden de los polimorfismos en el haplotipo es de acuerdo con la posición en el cromosoma. (rs2479409 and rs615563).

7.9 Asociación de los polimorfismos del gen DNMT3A con EAC prematura

Para el análisis de asociación de los polimorfismos del gen DNMT3A con EAC prematura, todos los modelos fueron ajustados por las variables involucradas en el proceso de calcificación arterial coronaria, por lo que se incluyeron edad, sexo, IMC, LDL-C, tabaquismo y diabetes, por considerarlas variables confusoras.

7.9.1 Análisis de polimorfismos de DNMT3A en el grupo control

En el grupo control analizado bajo diferentes modelos de herencia el polimorfismo rs13420827 de DNMT3A se asoció significativamente con un mayor riesgo de aumento de Apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL (modelo heterocigoto: OR= 1.513, IC 95%= 1.145-2.000, P= 0,004 y modelo codominante 1: OR= 1.484, IC 95%= 1.081-2.036, P= 0,015); mayor riesgo de aumento de Alanin-aminotransferasa $>p75$ (modelo heterocigoto: OR= 1.374, IC 95%= 1.059-1.781, P= 0.017 y modelo codominante 1: OR= 1.402, IC 95%= 1.045-1.881, P= 0.024) y mayor riesgo de aumento de proteína C reactiva ultrasensible >3 mg/L (modelo dominante: OR= 0.712, IC 95%= 0.520-0.975, P= 0.034; modelo heterocigoto: OR= 0.728, IC 95%= 0.537-0.987, P= 0.041 y modelo codominante 1: OR= 0.672 , IC 95%= 0.478-0.944, P= 0.022). Estos datos están representados en la TABLA 16.

También analizado bajo diferentes modelos de herencia el polimorfismo rs752208 de DNMT3A se asoció significativamente con menor riesgo de presentar el fenotipo B del colesterol LDL (modelo aditivo: OR= 0.744, IC 95%= 0.563-0.984, P= 0.038) como se muestra en la TABLA 17.

TABLA 15. Asociación entre rs13420827 con anomalías metabólicas en el grupo control

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	CC	CG	GG	MAF			
Apolipoproteína B							
≥ 110 mg/dL							
No (n =728)	0.354	0.440	0.206	0.426	Heterocigoto	1.513 [1.145-2.000]	0.004
Si (n =287)	0.294	0.538	0.168	0.437	Codominante 1	1.484 [1.081-2.036]	0.015
Alanin-amino transferasa >p75							
No (n =548)	0.363	0.441	0.196	0.416	Heterocigoto	1.374 [1.059-1.781]	0.017
Si (n =467)	0.303	0.500	0.197	0.446	Codominante 1	1.402 [1.045-1.881]	0.024
Proteína C reactiva ultrasensible >3 mg/L							
No (n =749)	0.323	0.489	0.188	0.433	Dominante	0.712 [0.520-0.975]	0.034
Si (n =266)	0.374	0.408	0.219	0.423	Heterocigoto Codominante 1	0.728 [0.537-0.987] 0.672 [0.478-0.944]	0.041 0.022

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

TABLA 16. Asociación entre rs752208 con anomalías metabólicas en el grupo control

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	GG	GA	AA	MAF			
LDL fenotipo B							
No (n=533)	0.764	0.213	0.023	0.129	Aditivo	0.744 [0.563-0.984]	0.038
Si (n=482)	0.810	0.180	0.010	0.101			

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

En la TABLA 18 se presentan los datos del polimorfismo rs1550117 que cuando se analizó bajo distintos modelos de herencia se asoció significativamente con una disminución del riesgo de obesidad central (modelo aditivo: OR= 0.688, IC 95%=

0.472-0.946, P= 0.023; modelo recesivo: OR= 0.391 , IC 95%= 0.199-0.768, P= 0.006 y modelo codominante 2: OR= 0.369, IC 95%= 0.178-0.763, P= 0.007), con

TABLA 17. Asociación entre rs1550117 con anomalías metabólicas en el grupo control

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	GG	GA	AA	MAF			
Obesidad central							
No (n=183)	0.372	0.470	0.158	0.393	Aditivo	0.688 [0.472-0.946]	0.023
Si (n=832)	0.413	0.452	0.135	0.360	Recesivo	0.391 [0.199-0.768]	0.006
					Codominante 2	0.369 [0.178-0.763]	0.007
Aspartatoamino transferasa >p75							
No (n=646)	0.411	0.470	0.118	0.353	Recesivo	1.560 [1.084-2.244]	0.017
Si (n=369)	0.394	0.429	0.177	0.390	Codominante 2	1.528 [1.031-2.263]	0.035
Proteína C reactiva ultrasensible >3 mg/L							
No (n=749)	0.384	0.483	0.133	0.374	Dominante	0.631 [0.465-0.856]	0.003
Si (n=266)	0.479	0.366	0.155	0.336	Heterocigoto	0.590 [0.433-0.804]	0.001
					Codominante 1	0.567 [0.408-0.789]	0.001
Interleucina-15 > p75							
No (n=650)	0.432	0.438	0.130	0.348	Dominante	1.370 [1.042-1.802]	0.024
Si (n=365)	0.355	0.497	0.147	0.396	Codominante 1	1.380 [1.034-1.842]	0.029
Interleucina-10 < p25							
No (n=692)	0.377	0.483	0.140	0.382	Aditivo	0.809 [0.661-0.990]	0.040
Si (n=323)	0.464	0.408	0.127	0.331	Dominante	0.705 [0.534-0.929]	0.013
					Heterocigoto	0.747 [0.567-0.985]	0.038
					Codominante 1	0.694 [0.517-0.932]	0.015

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

mayor riesgo de aumento de Aspartatoaminotransferasa $>p75$ (modelo recesivo: OR= 1.560, IC 95%= 1.084-2.244, P= 0.017 y modelo codominante 2: OR= 1.528, IC 95%= 1.031-2.263, P= 0.035), con bajo riesgo de tener un aumento de Proteína C reactiva ultrasensible >3 mg/L (modelo dominante: OR= 0.631, IC 95%= 0.465-0.856, P= 0.003, modelo heterocigoto: OR= 0.590, IC 95%= 0.433-0.804, P= 0.001 y modelo codominante 1: OR= 0.567, IC 95%= 0.408-0.789, P= 0.001), con mayor riesgo de aumento de Interleucina-15 $> p75$ (modelo dominante: OR= 1.370, IC 95%= 1.042-1.802, P= 0.024 y modelo codominante 1: OR= 1.380, IC 95%= 1.034-1.842, P= 0.029) y con bajo riesgo de tener una disminución de la interleucina 10 $<p25$ (modelo aditivo: OR= 0.809, IC 95%= 0.661-0.990, P= 0.040, modelo dominante: OR= 0.705, IC 95%= 0.534-0.929, P= 0.013, modelo heterocigoto: OR= 0.747, IC 95%= 0.567-0.985, P= 0.038 y modelo codominante 1: OR= 0.694, IC 95%= 0.517-0.932, P= 0.015).

7.9.2 Análisis de polimorfismos de DNMT3A en participantes del grupo AS

En el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica y analizado bajo diferentes modelos de herencia el polimorfismo rs13420827 de DNMT3A se asoció significativamente con una disminución del riesgo de hipertensión (modelo aditivo: OR= 0,651, IC 95%= 0,470-0,904, P= 0,010); modelo recesivo: OR= 0.421, IC 95%= 0.219-0.809, P= 0.009 y

¿modelo codominante 2: OR= 0.372, IC 95%= 0.183-0.757, P= 0.757)?

con mayor riesgo de aumento de apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL (modelo dominante: OR= 1.842, IC 95%= 1.152-2.944, P= 0.011; modelo heterocigoto: OR= 1.845, IC

95%= 1.198-2.843, P= 0.005 y modelo codominante 1: OR= 2.051, IC 95%= 1.253-3.358, P= 0.004), mayor riesgo de aumento de alanin-aminotransferasa >p75 (modelo dominante: OR=1.684, IC 95%= 1.036-2.739, P= 0.036 y modelo codominante 1: OR= 1.802, IC 95%= 1.078-3.012, P=0.025), mayor riesgo de presentar el fenotipo B del colesterol LDL (modelo aditivo: OR= 1.917, IC 95%= 1.404-2.616, P= 4.1 x 10⁻⁵; modelo dominante: OR= 2.710, IC 95%= 1.714-4.286, P= 2.0 x 10⁻⁵; modelo recesivo: OR= 1.896, IC 95%= 1.089-3.301, P= 0.024; modelo heterocigoto: OR= 1.659, IC 95%= 1.093-2.518, P= 0.018; modelo codominante 1: OR= 2.526, IC 95%= 1.559-4.095, P= 1.7 x 10⁻⁴; y modelo codominante 2: OR= 3.306, IC 95%= 1.755-6.227, P= 2.1 x 10⁻⁴). Estos datos están representados en la TABLA 19. En cuanto a la asociación entre rs1550117 con anomalías metabólicas en el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica (AS) se encontró una disminución del riesgo de hipertensión (modelo aditivo: OR= 0.642, IC 95%= 0.465-0.887, P= 0.007; modelo dominante: OR=0.635, IC 95%=0.404-0.999,

TABLA 18. Asociación entre rs13420827 con anomalías metabólicas en el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica (AS)

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	CC	CG	GG	MAF			
Hipertensión							
No (n=221)	0.308	0.471	0.222	0.457	Aditivo	0.651 [0.470-0.904]	0.010
Si (n=144)	0.410	0.486	0.104	0.347	Recesivo	0.421 [0.219-0.809]	0.009
					Codominante 2	0.372 [0.183-0.757]	0.757
Apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL							
No (n=232)	0.398	0.420	0.182	0.392	Dominante	1.842 [1.152-2.944]	0.011
Si (n=133)	0.263	0.571	0.165	0.451	Heterocigoto	1.845 [1.198-2.843]	0.005
					Codominante 1	2.051 [1.253-3.358]	0.004

Alanin-amino transferasa >p75							
No (n =224)	0.384	0.438	0.179	0.397	Dominante	1.684 [1.036-2.739]	0.036
Si (n =141)	0.291	0.539	0.170	0.440	Codominante 1	1.802 [1.078-3.012]	0.025
LDL fenotipo B							
No (n=192)	0.448	0.417	0.135	0.344	Aditivo	1.917 [1.404-2.616]	4.1 x 10 ⁻⁵
Si (n=173)	0.238	0.541	0.221	0.491	Dominante	2.710 [1.714-4.286]	2.0 x 10 ⁻⁵
					Recesivo	1.896 [1.089-3.301]	0.024
					Heterocigoto	1.659 [1.093-2.518]	0.018
					Codominante 1	2.526 [1.559-4.095]	1.7 x 10 ⁻⁴
					Codominante 2	3.306 [1.755-6.227]	2.1 x 10 ⁻⁴

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

P= 0.049; modelo recesivo: OR= 0.408, IC_{95%}= 0.207-0.802, P= 0.009 y modelo codominante 2: OR= 0.359, IC_{95%}= 0.175-0.736, P= 0.005); mayor riesgo de aumento de apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL (modelo aditivo: OR= 1.390, IC_{95%}= 1.031-1.874, P= 0.031; modelo recesivo: OR= 1.935, IC_{95%}= 1.097-3.412, P= 0.023 y modelo codominante 2: OR= 2.089, IC_{95%}= 1.128-3.869, P=0.019), mayor riesgo

TABLA 20. Asociación entre rs1550117 con anomalías metabólicas en el grupo de participantes con aterosclerosis subclínica (AS)

	Frecuencia de genotipos				Modelo	OR [IC 95%]	p
	GG	GA	AA	MAF			
Hipertensión							
No (n=221)	0.385	0.416	0.199	0.407	Aditivo	0.642 [0.465-0.887]	0.007
Si (n=144)	0.493	0.410	0.097	0.302	Dominante	0.635 [0.404-0.999]	0.049
					Recesivo	0.408 [0.207-0.802]	0.009
					Codominante 2	0.359 [0.175-0.736]	0.005
Apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL							
No (n=232)	0.455	0.420	0.126	0.334	Aditivo	1.390 [1.031-1.874]	0.031

Si (n=133)	0.376	0.406	0.218	0.211	Recesivo	1.935	0.023
					Codominante 2	[1.097-3.412]	0.019
LDL fenotipo B							
No (n=192)	0.484	0.375	0.141	0.328	Aditivo	1.398	0.025
						[1.043-1.874]	
Si (n=173)	0.360	0.459	0.180	0.410	Dominante	1.710	0.014
					Codominante 1	[1.117-2.618]	0.026
						1.687	
						[1.066-2.669]	
Grasa visceral abdominal >p75							
No (n=105)	0.514	0.362	0.124	0.305	Aditivo	1.814	0.003
						[1.218-2.701]	
Si (n=260)	0.392	0.435	0.173	0.390	Dominante	2.319	0.003
					Codominante 1	[1.334-4.033]	0.012
						2.144	
						[1.186-3.874]	
					Codominante 2	2.909	0.013
						[1.252-6.759]	

Los modelos de herencia se ajustaron por edad, sexo e IMC > p75

de aumento del fenotipo B del colesterol LDL (modelo aditivo: OR= 1.398, IC 95%= 1.043-1.874, P= 0.025; modelo dominante: OR= 1.710, IC 95%= 1.117-2.618, P= 0.014 y modelo codominante 1: OR= 1.687, IC 95%= 1.066-2.669, P= 0.026), así como con un mayor riesgo de aumento de la grasa visceral abdominal >p75 (modelo aditivo: OR= 1.814, IC 95%= 1.218-2.701, P= 0.003; modelo dominante: OR= 2.319, IC 95%= 1.334-4.033, P= 0.003; modelo codominante 1: OR= 2.144, IC 95%= 1.186-3.874, P= 0.012 y modelo codominante 2: OR= 2.909, IC 95%= 1.252-6.759, P= 0.013), como se puede apreciar en la tabla 20.

8. Discusión

En este trabajo de investigación se analizaron polimorfismos de los genes *PCSK9* y de *DNMT3A* en individuos sin antecedentes familiares, ni personales de enfermedad cardiovascular, formando dos grupos de estudio, el grupo control con calcio arterial coronario = 0 y el grupo de aterosclerosis subclínica con calcio arterial coronario = >0.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas con las variantes rs2479409, y rs615563 entre los grupos de estudio con relación a la asociación de con EAC.

Recientemente, el estudio del componente genético en la aterosclerosis subclínica ha tomado relevancia clínica en la salud pública en todo el mundo. La detección de genes de riesgo asociados con AS podría mejorar la comprensión de su fisiopatogenia. Por lo tanto, en el presente estudio, se analizaron dos polimorfismos (rs2479409 y rs615563) del gen *PCSK9*, y tres (rs13420827, rs752208 y rs1550117) de *DNMT3A* en 1102 controles y 394 personas con AS, con el objetivo de determinar un posible riesgo de desarrollar AS en una población mexicana.

Gen *PCSK9*

En el gen *PCSK9*, investigamos la asociación de los polimorfismos con factores de riesgo cardiometabólico, donde se observó una distribución diferente de rs2479409 en individuos con AS cuando se comparó con controles. Una mayor presencia del alelo A en AS sugiere que podría ser un marcador de riesgo para individuos mexicanos con AS. Por otro lado, los niveles séricos elevados de *PCSK9* se han asociado con diferentes enfermedades vasculares como vasculitis, aterosclerosis,

calcificación arterial, enfermedades cerebrovasculares y aórticas. [157] Además, varios informes han relacionado a PCSK9 con lupus eritematoso sistémico [158, 159], artritis reumatoide [160] [161], psoriasis [162] [163], esclerosis sistémica [164] y síndrome nefrótico. [165]

Mostaza y col. analizaron la asociación del polimorfismo rs11591147 con los niveles de lípidos y enfermedad vascular subclínica en 1188 individuos sin enfermedad cardiovascular. En este estudio se encontró una asociación significativa con AS; sin embargo, no se encontró asociación con los niveles de lípidos. [166]. Recientemente, Qiu et al. realizó un metaanálisis de los polimorfismos de PCSK9 rs505151 y rs11591147 y encontró una asociación de estos polimorfismos con riesgo cardiovascular y niveles elevados de lípidos. [167] Por otro lado, Reddy et al. reportó una asociación del polimorfismo rs505151 con EAC en pacientes del norte de la India. [168] Aunque las asociaciones fueron con diferentes polimorfismos, si consideramos que es el mismo gen, entonces estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos. Además, diferentes polimorfismos del gen PCSK9 influyen sobre los niveles circulantes de moléculas relacionadas con el metabolismo lipídico que conducen a un riesgo de dislipidemias y enfermedades cardiovasculares. Se sabe que el polimorfismo rs2479409 se ha asociado con LDL-C y el polimorfismo rs615563 está implicado. con niveles circulantes de triglicéridos (TG). En nuestro estudio, al analizar la asociación entre ambos polimorfismos y las concentraciones de LDL-C y TG, el polimorfismo rs2479409 mostró asociación con los niveles de TG en el grupo control.

Sin embargo, actualmente existe controversia en resultados con asociación positiva y negativa. Luo y col. observaron una asociación de rs2479409 con riesgo para colesterol total (CT) en población china. [169] Kulminski et al. encontraron que el polimorfismo rs2479409 mostró un papel protector con los niveles de CT. [170] Small y col. informaron una asociación de rs2479409 con niveles disminuidos de LDL-C en pacientes con EAC y accidente cerebrovascular isquémico. [171] Harrison y col. no encontraron asociación de rs2479409 con los niveles circulantes de LDL-C. [172] Guo y col. observaron en el polimorfismo rs615563 una asociación con los niveles circulantes de TG y CT en población china. [173] [174]

Por otro lado, el polimorfismo rs615563 en el grupo control se asoció con bajo riesgo de desarrollar hipertrigliceridemia. Estas diferencias entre estos estudios y el nuestro podría deberse a los criterios de inclusión utilizados en cada estudio.

Luo y col. y Guo y col. evaluaron pacientes con dislipidemia; Kulminski y col. reanalizaron asociaciones previas en un metaanálisis GWAS; Small y col. incluyeron pacientes coronarios; Harrison y col. pacientes seleccionados con aneurisma aórtico abdominal; Guo y col. estudiaron individuos sanos en dos poblaciones diferentes de China, mientras que en nuestro estudio solo se incluyeron individuos con AS, considerando un puntaje CAC > 0. Además, todos Los individuos que incluimos eran asintomáticos y no tenían antecedentes familiares ni personales de EAC. Por lo tanto, los participantes de nuestro estudio eran diferentes de los estudiados por los autores mencionados anteriormente.

Además, los estudios en poblaciones han identificado diferentes mutaciones en el gen PCSK9 que están implicadas en cambios en los niveles circulantes de colesterol

LDL. Las mutaciones con ganancia de función (MGF) reducen los niveles de LDLR en el hígado, lo que resulta en un aumento en los niveles circulantes de LDL-C, lo que lleva a un alto riesgo de desarrollar EAC; mientras que las mutaciones con pérdida de función (MPF) aumentan los niveles de LDLR, disminuyendo los niveles circulantes de LDL-C y, por lo tanto, tiene un efecto protector contra EAC. [175], [111], [176], [177], [178], [179]

Por lo tanto, la evidencia anterior sugiere la complejidad involucrada en la regulación de los niveles circulantes de moléculas implicadas en el metabolismo de los lípidos por la actividad del gen PCSK9.

A continuación, exploramos la asociación de los polimorfismos rs2479409 y rs615563 con anomalías metabólicas comparando controles sanos con individuos con aterosclerosis subclínica. En el grupo de control, el rs2479409 se asoció con un menor riesgo de síndrome metabólico, un bajo riesgo de tener un aumento de la fosfatasa alcalina >p75, y un bajo riesgo de aumento de la gamma-glutamyltranspeptidasa. Varios informes han demostrado que el síndrome metabólico aumenta el riesgo de eventos cardiovasculares. [180], [181], [182]

Estudios recientes han sugerido que el aumento de la fosfatasa alcalina sérica es un predictor de enfermedad cardiovascular y calcificación vascular. [183], [184]

Del mismo modo, algunos estudios han asociado niveles séricos elevados de gamma-glutamyltranspeptidasa con una alta prevalencia de EAC y factores de riesgo cardiovascular. [185], [186], [187]

El polimorfismo rs615563 se asoció con una disminución del riesgo de hipertrigliceridemia y un bajo riesgo de tener altos niveles de interleucina 1B > p75.

Es bien sabido que el aumento de los niveles séricos de triglicéridos es un factor de riesgo cardiovascular importante, y también se ha asociado con aterosclerosis. [188], [189], [190] Finalmente, altos niveles de interleucina 1 están implicados en la inflamación y aterogénesis. [191], [192]

También observamos que, en el grupo de individuos con AS, el polimorfismo rs2479409 se asoció con un bajo riesgo de tener resistencia a la insulina del tejido adiposo y un bajo riesgo de aumento de interleucina 1B > p75. El polimorfismo rs615563, por otro lado, se asoció con menor riesgo de tener obesidad central, síndrome metabólico, hiperinsulinemia, insulina resistencia, resistencia a la insulina del tejido adiposo, bajo riesgo de aumento de la fosfatasa alcalina >p75, y bajo riesgo de tener una disminución de la interleucina 10 <p25.

Es importante caracterizar genéticamente a los individuos con AS para establecer una detección temprana y oportuna y para prevenir enfermedades cardiovasculares. [193] En nuestro estudio, ninguno de los haplotipos de PCSK9 se asoció con AS. Hasta ahora, no hay evidencia de haplotipos asociados con AS; por lo tanto, se requieren estudios adicionales para comprender el verdadero papel de los polimorfismos del gen PCSK9 en AS.

El análisis bioinformático mostró que los cambios en el polimorfismo rs2479409 produjo sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, YY1 y HOXA9, todos ellos relacionado con enfermedad vascular. AP-1 es una conocida familia de complejos diméricos implicados en diferentes procesos celulares como diferenciación, proliferación celular, supervivencia y muerte, y ha estado involucrado en diferentes enfermedades, en particular las de etiología inflamatoria. [194], [195]

En patologías multifactoriales, han sido reportadas modificaciones de los sitios de unión AP-1, y esos sitios están relacionados con la regulación epigenética y el riesgo genético de enfermedad de las arterias coronarias. [196]

YY1 es un núcleo de dedos de zinc que puede activar o reprimir e iniciar la transcripción. según la estructura y condiciones ambientales. En las enfermedades vasculares, YY1 puede actuar como represor de varios promotores de genes implicados en la aterogénesis, tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Santiago y col. demostraron que YY1 se expresa diferencialmente en arterias humanas sanas y dañadas. [197] HOXA9 es un factor de transcripción con importantes implicaciones en la expresión de varios genes relacionados con la biología endotelial, incluyendo VE-cadherina, VEGFR-2, ENOs. [198] Es bien sabido que la disfunción endotelial representa el paso inicial para la progresión a enfermedad cardiovascular. [199]

Gen DNMT3A

El gen DNMT3A codifica a la enzima ADN metiltransferasa alfa 3, un miembro de las metiltransferasas involucradas en varios procesos del desarrollo humano al establecer patrones de metilación del ADN durante el desarrollo, específicamente en proteínas histonas e islas CpG dentro del genoma, desempeñando un papel importante en los procesos paternos y maternos de imprinting. [200]

Trabajo de otros autores

La proteína DNMT3A tiene tres dominios funcionales principales: El dominio PWWD, que es básicamente un núcleo de Pro-Trp-Trp-Pro y que está presente en proteínas que funcionan como factores transcripcionales que regulan el proceso de

desarrollo. Tatton-Brown y cols detectaron siete variantes en este dominio, [201] el dominio de tipo dedos de zinc FYVE/PHD que participa en las interacciones de unión proteína-proteína y proteína-ADN, donde Tenorio y cols Identificaron tres mutaciones, una variante de paro, una variante de splicing y una variante missense. y, por último, el dominio de citosina metiltransferasa C-5 dependiente de SAM es esencial para llevar a cabo la actividad que regula predominantemente los patrones de metilación en los sitios CpG en muchas regiones impresas. [202]

Por otra parte, ciertas variantes de DNMT3A causan patrones de metilación de ADN específicos de la transcripción que afectan la hematopoyesis, DNMT3A juega un papel fundamental en la diferenciación hematopoyética. Bozic y cols., demostraron que el empalme alternativo de DNMT3A tiene secuelas epigenéticas y funcionales características debido a que las transcripciones específicas de DNMT3A se regularon negativamente o se sobreexpresaron y esto dio como resultado cambios en la expresión génica y metilación del ADN. [203]

Por lo tanto, es posible que los defectos en la función de DNMT3A, causada por las variantes identificadas, puedan producir alteraciones de las vías metabólicas que finalmente podrían conducir a defectos en las moléculas involucradas en la génesis de la enfermedad arterial coronaria y el fenotipo de aterosclerosis subclínica.

Estudios previos observaron la presencia de mutaciones DNMT3A principalmente en casos de cáncer, donde las mutaciones en DNMT3A son muy recurrentes en pacientes con leucemia mieloide aguda, en aproximadamente un 20%. [204] En el caso del cáncer gástrico, las conclusiones no fueron siempre consistentes, en un estudio llevado a cabo por Li y cols., en 2016, no se encontró asociación, al evaluar

el efecto de los polimorfismos rs1550117 y rs13420827 de DNMT3A con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. [138]

Sin embargo, en un estudio realizado por Zhou y cols., con el objetivo de determinar si las variaciones genéticas en DNMT3A podrían estar asociadas con el riesgo de cáncer gástrico, encontraron que tres variaciones genéticas de interés en DNMT3A no están asociadas con la presencia de cáncer gástrico, pero que rs13420827 puede contribuir al riesgo de cáncer gástrico para los individuos más jóvenes.[205]

Nuestro trabajo

En nuestro estudio, encontramos que el grupo control analizado bajo diferentes modelos de herencia el polimorfismo rs13420827 de DNMT3A se asoció significativamente con un mayor riesgo de aumento de Apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL, alaninaminotransferasa $>p75$ y de la proteína C reactiva ultrasensible >3 mg/L. Contradictoriamente, los resultados obtenidos en el grupo de aterosclerosis subclínica (AS) de nuestro estudio, la variante rs13420827 se asoció con una disminución del riesgo de hipertensión; pero también con mayor riesgo de aumento de apolipoproteína B ≥ 110 mg/dL, alanin-aminotransferasa $>p75$ y con un mayor riesgo de presentar el fenotipo B del colesterol LDL.

Se ha informado que la metilación del ADN es un importante regulador de la estabilidad de la estructura genómica, para demostrar esto, Ding y cols., realizaron un análisis de asociación en pacientes con enfermedad de Machado-Joseph (MJD) encontrando que rs13420827 contribuye a modular la edad de inicio de la enfermedad. [206]

La enfermedad arterial coronaria representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, se han identificado diferentes factores de riesgo para establecer estrategias que busquen prevenir el padecimiento. En el presente estudio se evaluó el aporte de la Genética como un factor de riesgo adicional, mediante el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP).

Es importante señalar que los SNPs solo han explicado aproximadamente una décima parte del riesgo de la enfermedad cardiovascular porque no son afectados por las interacciones gen-ambiente.

Evidencias sugieren que las modificaciones epigenéticas están remodelando activamente procesos patológicos (por ejemplo, desdiferenciación de células de músculo liso, acumulación de células senescentes) en la enfermedad cardiovascular. La senescencia de las células vasculares en las arterias envejecidas no sólo contrarresta los procesos regenerativos, sino que también exacerba la aterogénesis.

Las modificaciones del epigenoma incluyen cambios en la metilación del ADN, el código de histona y la expresión de ARN no codificantes. La metilación del ADN es un importante regulador epigenético que modula la expresión génica específica del tipo de célula. [154]

En mamíferos, el patrón de metilación del ADN es establecido y mantenido por tres enzimas de ADN metiltransferasa (DNMT): DNMT3A y DNMT3B son esenciales para la metilación de ADN de novo durante desarrollo. [155], mientras que DNMT1 es necesaria para mantener patrones de metilación durante la división celular [156]

Debido a que los polimorfismos estudiados se encuentran en regiones no codificantes del gen DNMT3A, es posible que se afecte un sitio de regulación al codificar una proteína diferente de la establecida, causando una mutación no sinónima. En caso de ser así, se podrían generar opciones terapéuticas en el futuro para modificar la mutación y eliminar el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias. [210]

El presente estudio tiene fortalezas importantes: incluimos una gran cohorte de individuos mexicanos étnicamente homogéneos para asegurar que la estratificación de la población no fuera tendenciosa. De igual forma, en todos los participantes fue posible obtener información sobre parámetros clínicos, demográficos, tomográficos y bioquímicos. No obstante, también deben reconocerse algunas limitaciones: nuestros resultados deben interpretarse con cautela, considerando que los participantes no fueron seleccionados al azar. Además, nuestros resultados se generaron a partir de individuos pertenecientes a la fase basal del estudio mexicano GEA con un diseño transversal.

9. Conclusiones

Los polimorfismos estudiados del gen PCSK9 en individuos con aterosclerosis subclínica se asocian con un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria prematura.

Tomando en consideración a la EAC como una enfermedad multifactorial compleja y dada la implicación de PCSK9 en la alteración de los patrones normales de procesamiento del receptor LDL, no se descarta que estos polimorfismos se hallen en desequilibrio de ligamento con otros polimorfismos funcionales en los que también resida la relación causa-efecto con la enfermedad arterial coronaria.

Serán necesarios estudios con otras variantes genéticas relacionadas con riesgo de enfermedad cardiovascular para reforzar los resultados.

En el análisis de polimorfismos del gen PCSK9, se demostró la asociación del polimorfismo rs505151, como un posible marcador de riesgo para la enfermedad arterial coronaria prematura en la población mestiza mexicana, así como de rs615563 como factor protector en nuestra población.

Por otro lado, la medición del calcio arterial coronario nos permitió excluir a aquellos individuos sanos que presentaron $CAC > 1$, de acuerdo con la escala de Agatston, para poder analizar mejor al grupo control.

10. Perspectivas

La utilidad de los estudios de asociación centrados en genes candidatos seleccionados por su posible significancia clínica muestra ciertas limitaciones, ya que a pesar de que innumerables polimorfismos han sido estudiados y asociados con EAC, frecuentemente han presentado resultados inconsistentes o negativos.

Es importante que en el futuro la investigación de factores de riesgo genéticos predictivos y biomarcadores de EAC se basen en la integración de enfoques alternativos en los estudios de genes individuales (SNP, variaciones de número de copia, expresión de gen-proteína, regulación epigenética), así como en el análisis de todo el genoma.

A pesar de contar con una cohorte de tamaño considerable; un aspecto importante para modificar en futuros proyectos de investigación sobre la genética de la enfermedad aterosclerosa es aumentar el tamaño de muestra para mejorar el poder estadístico y comprobar si se repiten las tendencias descritas tras dividir la muestra en subgrupos de aterosclerosis subclínica.

Referencias

1. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. 407(6801): p. 233-41.
2. Lusis, A.J., R. Mar, and P. Pajukanta, *Genetics of atherosclerosis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2004. 5: p. 189-218.
3. Villa-Colinayo, V., et al., *Genetics of atherosclerosis: the search for genes acting at the level of the vessel wall*. Curr Atheroscler Rep, 2000. 2(5): p. 380-9.
4. WHO, *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region 2000-2016*. 2018, World Health Organization: Geneva.
5. Vargas Alarcon, G., *[Genetic polymorphisms in cardiovascular diseases. The experience in the National Institute of Cardiology "Ignacio Chavez"]*. Arch Cardiol Mex, 2007. 77 Suppl 4: p. S4-88-93.
6. Martínez Ríos, M., *Tratado de cardiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez*. 1st ed. 2012, México D.F.
7. WHO. *The top 10 causes of death*.
2020 9 December 2020; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
8. Soto-Estrada, G., Moreno-Altamirano, Laura, & Pahua Díaz, Daniel, *Panorama epidemiológico de México, principales causas de morbilidad y mortalidad*. Revista de la Facultad de Medicina, 2016. 59(6): p. 8-225.
9. Ramsey, S.A., E.S. Gold, and A. Aderem, *A systems biology approach to understanding atherosclerosis*. EMBO Mol Med, 2010. 2(3): p. 79-89.
10. Grover-Paez, F. and A.B. Zavalza-Gomez, *Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors*. Diabetes Res Clin Pract, 2009. 84(1): p. 1-10.
11. Toth, P.P., *Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it*. Int J Clin Pract, 2008. 62(8): p. 1246-54.
12. Dutta, P., et al., *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis*. Nature, 2012. 487(7407): p. 325-9.
13. Ghazalpour, A., et al., *Thematic review series: The pathogenesis of atherosclerosis. Toward a biological network for atherosclerosis*. J Lipid Res, 2004. 45(10): p. 1793-805.
14. Roy, H., S. Bhardwaj, and S. Yla-Herttuala, *Molecular genetics of atherosclerosis*. Hum Genet, 2009. 125(5-6): p. 467-91.
15. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. 1(3): p. 183-98.
16. Flowers, E., E.S. Froelicher, and B.E. Aouizerat, *Gene-environment interactions in cardiovascular disease*. Eur J Cardiovasc Nurs, 2012. 11(4): p. 472-8.
17. Elder, S.J., et al., *Genetic and environmental influences on factors associated with cardiovascular disease and the metabolic syndrome*. J Lipid Res, 2009. 50(9): p. 1917-26.
18. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
19. Libby, P., M. DiCarli, and R. Weissleder, *The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets*. J Nucl Med, 2010. 51 Suppl 1: p. 33S-37S.
20. Aird, W.C., *Endothelial cell heterogeneity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(1): p. a006429.

21. Badimon, L., R.F. Storey, and G. Vilahur, *Update on lipids, inflammation and atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2011. 105 Suppl 1: p. S34-42.
22. R&D Systems, I., *Atherosclerosis disease progression*. 2019, R&D Systems, Inc.
23. Kaneto, H., et al., *Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis*. Mediators Inflamm, 2010. 2010: p. 453892.
24. Lubos, E., D.E. Handy, and J. Loscalzo, *Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis*. Front Biosci, 2008. 13: p. 5323-44.
25. Sitia, S., et al., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis*. Autoimmun Rev, 2010. 9(12): p. 830-4.
26. Shao, B. and J.W. Heinecke, *HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis*. J Lipid Res, 2009. 50(4): p. 599-601.
27. Muller, G., C. Goettsch, and H. Morawietz, *Oxidative stress and endothelial dysfunction*. Hamostaseologie, 2007. 27(1): p. 5-12.
28. Lonn, M.E., J.M. Dennis, and R. Stocker, *Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis*. Free Radic Biol Med, 2012. 53(4): p. 863-84.
29. Versari, D., et al., *Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease*. Diabetes Care, 2009. 32 Suppl 2: p. S314-21.
30. Hulsmans, M., E. Van Dooren, and P. Holvoet, *Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2012. 14(3): p. 264-76.
31. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. 109(23 Suppl 1): p. III27-32.
32. Tousoulis, D., et al., *The role of nitric oxide on endothelial function*. Curr Vasc Pharmacol, 2012. 10(1): p. 4-18.
33. Tabit, C.E., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. 11(1): p. 61-74.
34. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. 115(10): p. 1285-95.
35. Ambrose, J.A. and R.S. Barua, *The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update*. J Am Coll Cardiol, 2004. 43(10): p. 1731-7.
36. McCully, K.S., *Chemical pathology of homocysteine. IV. Excitotoxicity, oxidative stress, endothelial dysfunction, and inflammation*. Ann Clin Lab Sci, 2009. 39(3): p. 219-32.
37. Sawamura, T., *LOX-1, a lectin-like oxidized LDL receptor identified from endothelial cells, in endothelial dysfunction*. Int Congr Ser, 2004. 1262: p. 531-534.
38. Soldatos, G., M.E. Cooper, and K.A. Jandeleit-Dahm, *Advanced-glycation end products in insulin-resistant states*. Curr Hypertens Rep, 2005. 7(2): p. 96-102.
39. Mudau, M., et al., *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis*. Cardiovasc J Afr, 2012. 23(4): p. 222-31.
40. Avogaro, A., S.V. de Kreutzenberg, and G. Fadini, *Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. 82 Suppl 2: p. S94-S101.
41. Corrado, E., et al., *An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2010. 17(1): p. 1-11.
42. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. 54(23): p. 2129-38.
43. Hansson, G.K., *Inflammatory mechanisms in atherosclerosis*. J Thromb Haemost, 2009. 7 Suppl 1: p. 328-31.
44. Birukov, K.G., *Oxidized lipids: the two faces of vascular inflammation*. Curr Atheroscler Rep, 2006. 8(3): p. 223-31.

45. Samson, S., L. Mundkur, and V.V. Kakkar, *Immune response to lipoproteins in atherosclerosis*. Cholesterol, 2012. 2012: p. 571846.
46. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice*. Circ J, 2010. 74(2): p. 213-20.
47. Yang, H., A.S. Mohamed, and S.H. Zhou, *Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis*. Lipids Health Dis, 2012. 11: p. 85.
48. Ley, K., Y.I. Miller, and C.C. Hedrick, *Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. 31(7): p. 1506-16.
49. Galkina, E. and K. Ley, *Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*)*. Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 165-97.
50. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. Clin Chem, 2008. 54(1): p. 24-38.
51. Keaney, J.F., Jr., *Immune modulation of atherosclerosis*. Circulation, 2011. 124(22): p. e559-60.
52. Zernecke, A. and C. Weber, *Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2010. 86(2): p. 192-201.
53. Johnson, J.L. and A.C. Newby, *Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques*. Curr Opin Lipidol, 2009. 20(5): p. 370-8.
54. Bobryshev, Y.V., *Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis*. Micron, 2006. 37(3): p. 208-22.
55. Poledne, R., et al., *Proinflammatory status, genetics and atherosclerosis*. Physiol Res, 2009. 58 Suppl 2: p. S111-8.
56. Hristov, M. and C. Weber, *Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. 106(5): p. 757-62.
57. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. 7(2): p. 77-86.
58. Semple, J.W. and J. Freedman, *Platelets and innate immunity*. Cell Mol Life Sci, 2010. 67(4): p. 499-511.
59. Boullier, A., et al., *Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 947: p. 214-22; discussion 222-3.
60. Yuan, Y., P. Li, and J. Ye, *Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis*. Protein Cell, 2012. 3(3): p. 173-81.
61. Ouimet, M. and Y.L. Marcel, *Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. 32(3): p. 575-81.
62. Maiti, R. and N.K. Agrawal, *Atherosclerosis in diabetes mellitus: role of inflammation*. Indian J Med Sci, 2007. 61(5): p. 292-306.
63. Libby, P., *Inflammation and cardiovascular disease mechanisms*. Am J Clin Nutr, 2006. 83(2): p. 456S-460S.
64. Ait-Oufella, H., et al., *Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. 31(5): p. 969-79.
65. Douglas, G., & Channon, K. M., *The pathogenesis of atherosclerosis*. Medicine, 2010. 38(8): p. 397-402.
66. Gerthoffer, W.T., *Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration*. Circ Res, 2007. 100(5): p. 607-21.
67. Raffetto, J.D. and R.A. Khalil, *Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2008. 75(2): p. 346-59.
68. Dhawan, S.S., et al., *Shear stress and plaque development*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2010. 8(4): p. 545-56.

69. Franco, M., et al., *Challenges and opportunities for cardiovascular disease prevention*. Am J Med, 2011. 124(2): p. 95-102.
70. Borissoff, J.I., H.M. Spronk, and H. ten Cate, *The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis*. N Engl J Med, 2011. 364(18): p. 1746-60.
71. Abbate, R., et al., *Thrombosis and acute coronary syndrome*. Thromb Res, 2012. 129(3): p. 235-40.
72. Aksu, K., A. Donmez, and G. Keser, *Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management*. Curr Pharm Des, 2012. 18(11): p. 1478-93.
73. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. 17(11): p. 1410-22.
74. Halvorsen, B., et al., *Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque?* Prog Cardiovasc Dis, 2008. 51(3): p. 183-94.
75. Badimon, L., T. Padro, and G. Vilahur, *Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2012. 1(1): p. 60-74.
76. Borensztajn, K.S., J.H. von der Thusen, and C.A. Spek, *The role of coagulation in chronic inflammatory disorders: a jack of all trades*. Curr Pharm Des, 2011. 17(1): p. 9-16.
77. de Moerloose, P., F. Boehlen, and M. Neerman-Arbez, *Fibrinogen and the risk of thrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2010. 36(1): p. 7-17.
78. Breitenstein, A., F.C. Tanner, and T.F. Luscher, *Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis?* Circ J, 2010. 74(1): p. 3-12.
79. Kaplan, Z.S. and S.P. Jackson, *The role of platelets in atherothrombosis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011. 2011: p. 51-61.
80. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. Br J Haematol, 2005. 131(4): p. 417-30.
81. Vinik, A.I., et al., *Platelet dysfunction in type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2001. 24(8): p. 1476-85.
82. Carr, M.E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J Diabetes Complications, 2001. 15(1): p. 44-54.
83. Jennings, L.K., *Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2009. 102(2): p. 248-57.
84. Maguire, J.M., et al., *Polymorphisms in platelet glycoprotein 1balpha and factor VII and risk of ischemic stroke: a meta-analysis*. Stroke, 2008. 39(6): p. 1710-6.
85. Kleinegris, M.C., A.J. Ten Cate-Hoek, and H. Ten Cate, *Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis*. Pol Arch Med Wewn, 2012. 122(11): p. 557-66.
86. cneyoysiari2046, *Transcripción en eucariotas*. 2014, <http://blogspot.com>.
87. Ramirez-Bello, J., et al., *[Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]*. Gac Med Mex, 2013. 149(2): p. 220-8.
88. Rose, G., *Familial Patterns in Ischaemic Heart Disease*. Br J Prev Soc Med, 1964. 18: p. 75-80.
89. Goff, D.C., Jr., et al., *2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. 63(25 Pt B): p. 2935-2959.
90. Soutar, A.K. and R.P. Naoumova, *Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007. 4(4): p. 214-25.

91. Bjorkegren, J.L.M., et al., *Genome-wide significant loci: how important are they? Systems genetics to understand heritability of coronary artery disease and other common complex disorders*. J Am Coll Cardiol, 2015. 65(8): p. 830-845.
92. Papait, R., et al., *It's Time for An Epigenomics Roadmap of Heart Failure*. Curr Genomics, 2015. 16(4): p. 237-44.
93. Stover, P.J. and M.A. Caudill, *Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions*. J Am Diet Assoc, 2008. 108(9): p. 1480-7.
94. Burton, H., C. Jackson, and I. Abubakar, *The impact of genomics on public health practice*. Br Med Bull, 2014. 112(1): p. 37-46.
95. Mayo, O., *A century of Hardy-Weinberg equilibrium*. Twin Res Hum Genet, 2008. 11(3): p. 249-56.
96. Rodriguez, S., T.R. Gaunt, and I.N. Day, *Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies*. Am J Epidemiol, 2009. 169(4): p. 505-14.
97. Shan, G., *A note on exact conditional and unconditional tests for Hardy-Weinberg equilibrium*. Hum Hered, 2013. 76(1): p. 10-7.
98. Slatkin, M., *Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future*. Nat Rev Genet, 2008. 9(6): p. 477-85.
99. Vilhjalmsson, B.J., et al., *Modeling Linkage Disequilibrium Increases Accuracy of Polygenic Risk Scores*. Am J Hum Genet, 2015. 97(4): p. 576-92.
100. Collins, A., *Allelic association: linkage disequilibrium structure and gene mapping*. Mol Biotechnol, 2009. 41(1): p. 83-9.
101. Wall, J.D. and J.K. Pritchard, *Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome*. Nat Rev Genet, 2003. 4(8): p. 587-97.
102. institute, B., *Haploview*. 2021.
103. Villarreal-Molina, T., et al., *The ABCA1 gene R230C variant is associated with decreased risk of premature coronary artery disease: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e49285.
104. Horton, J.D., J.C. Cohen, and H.H. Hobbs, *Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism*. Trends Biochem Sci, 2007. 32(2): p. 71-7.
105. Lopez, D., *PCSK9: an enigmatic protease*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1781(4): p. 184-91.
106. Seidah, N.G. and A. Prat, *The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia*. J Mol Med (Berl), 2007. 85(7): p. 685-96.
107. Park, S.W., Y.A. Moon, and J.D. Horton, *Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver*. J Biol Chem, 2004. 279(48): p. 50630-8.
108. Benjannet, S., et al., *NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol*. J Biol Chem, 2004. 279(47): p. 48865-75.
109. Cunningham, D., et al., *Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia*. Nat Struct Mol Biol, 2007. 14(5): p. 413-9.
110. Piper, D.E., et al., *The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol*. Structure, 2007. 15(5): p. 545-52.
111. Cameron, J., et al., *Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors*. Hum Mol Genet, 2006. 15(9): p. 1551-8.
112. Seidah, N.G., et al., *The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(3): p. 928-33.

113. Abifadel, M., et al., *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia*. Nat Genet, 2003. 34(2): p. 154-6.
114. Cohen, J.C., et al., *Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease*. N Engl J Med, 2006. 354(12): p. 1264-72.
115. Rashid, S., et al., *Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(15): p. 5374-9.
116. Zhao, Z., et al., *Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote*. Am J Hum Genet, 2006. 79(3): p. 514-23.
117. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. 29(4): p. 431-8.
118. Brown, M.S., R.G. Anderson, and J.L. Goldstein, *Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins*. Cell, 1983. 32(3): p. 663-7.
119. Zhang, D.W., et al., *Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation*. J Biol Chem, 2007. 282(25): p. 18602-12.
120. MBL. *PCSK9 Pathway Graphic*. 2021; Available from: http://info.mblintl.com/hubfs/PCSK9_Pathway_Graphic.gif.
121. Tavori, H., et al., *Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and cell surface low-density lipoprotein receptor: evidence for a reciprocal regulation*. Circulation, 2013. 127(24): p. 2403-13.
122. Morales-Villegas, E., *PCSK9 and LDLR The Yin-Yang in the Cellular Uptake of Cholesterol*. Curr Hypertens Rev, 2014.
123. Rodriguez-Dorantes, M., et al., *[DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]*. Rev Invest Clin, 2004. 56(1): p. 56-71.
124. Yen, R.W., et al., *Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase*. Nucleic Acids Res, 1992. 20(9): p. 2287-91.
125. Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch, *The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites*. J Biol Chem, 2004. 279(46): p. 48350-9.
126. Jia, Y., et al., *Negative regulation of DNMT3A de novo DNA methylation by frequently overexpressed UHRF family proteins as a mechanism for widespread DNA hypomethylation in cancer*. Cell Discov, 2016. 2: p. 16007.
127. Klein, C.J., et al., *Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss*. Nat Genet, 2011. 43(6): p. 595-600.
128. Zhong, X., et al., *Association of DNA methyltransferase polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis*. Biomed Rep, 2016. 5(4): p. 467-472.
129. Pezzi, J.C., et al., *Association between DNA methyltransferase gene polymorphism and Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2017. 639: p. 146-150.
130. Berger, S.L., et al., *An operational definition of epigenetics*. Genes Dev, 2009. 23(7): p. 781-3.
131. Prim, N., *La epigenética en la actualidad*, L.y. Aceros, Editor. 2020, Láminas y Aceros.
132. Ordovas, J.M. and C.E. Smith, *Epigenetics and cardiovascular disease*. Nat Rev Cardiol, 2010. 7(9): p. 510-9.
133. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *Epigenetic Determinants of Cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016. 8(9).
134. Illingworth, R.S., et al., *Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome*. PLoS Genet, 2010. 6(9): p. e1001134.

135. Zhang, W. and J. Xu, *DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis*. *Biomark Res*, 2017. 5: p. 1.
136. Hamidi, T., A.K. Singh, and T. Chen, *Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases*. *Epigenomics*, 2015. 7(2): p. 247-65.
137. Chen, T. and E. Li, *Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases*. *Curr Top Dev Biol*, 2004. 60: p. 55-89.
138. Li, H., et al., *DNMT1, DNMT3A and DNMT3B Polymorphisms Associated With Gastric Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis*. *EBioMedicine*, 2016. 13: p. 125-131.
139. Kathiresan, S. and D. Srivastava, *Genetics of human cardiovascular disease*. *Cell*, 2012. 148(6): p. 1242-57.
140. Balagopal, P.B., et al., *Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*, 2011. 123(23): p. 2749-69.
141. Briasoulis, A., et al., *Endothelial dysfunction and atherosclerosis: focus on novel therapeutic approaches*. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2012. 7(1): p. 21-32.
142. Mega, J.L., et al., *Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: an analysis of primary and secondary prevention trials*. *Lancet*, 2015. 385(9984): p. 2264-2271.
143. Verweij, N., et al., *Identification of 15 novel risk loci for coronary artery disease and genetic risk of recurrent events, atrial fibrillation and heart failure*. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 2761.
144. Lisker, R., et al., *Racial admixture in a Mestizo population from Mexico City*. *Am J Hum Biol*, 1995. 7(2): p. 213-216.
145. Posadas-Sanchez, R., et al., *Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study*. *Oncotarget*, 2017. 8(38): p. 64459-64470.
146. Mautner, G.C., et al., *Coronary artery calcification: assessment with electron beam CT and histomorphometric correlation*. *Radiology*, 1994. 192(3): p. 619-23.
147. Sanchez-Castillo, C.P., et al., *Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Health Survey 2000*. *Obes Res*, 2003. 11(3): p. 442-51.
148. DeLong, D.M., et al., *A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study*. *JAMA*, 1986. 256(17): p. 2372-7.
149. Meeusen, J.W., *Is Small Dense LDL a Highly Atherogenic Lipid or a Biomarker of Pro-Atherogenic Phenotype?* *Clin Chem*, 2021.
150. ADA, *Standards of medical care in diabetes--2009*. *Diabetes Care*, 2009. 32 Suppl 1: p. S13-61.
151. Posadas-Romero, C., et al., *[Prevalence and extent of coronary artery calcification in an asymptomatic cardiovascular Mexican population: Genetics of Atherosclerotic Disease study]*. *Arch Cardiol Mex*, 2017. 87(4): p. 292-301.
152. Siva, N., *1000 Genomes project*. *Nat Biotechnol*, 2008. 26(3): p. 256.
153. Lahiri, D.K. and B. Schnabel, *DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality*. *Biochem Genet*, 1993. 31(7-8): p. 321-8.
154. Aavik, E., M. Babu, and S. Yla-Herttuala, *DNA methylation processes in atherosclerotic plaque*. *Atherosclerosis*, 2019. 281: p. 168-179.

155. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. 99(3): p. 247-57.
156. Pagiatakis, C., et al., *Epigenetics of aging and disease: a brief overview*. Aging Clin Exp Res, 2019.
157. Guo, Y., et al., *Physiology and role of PCSK9 in vascular disease: Potential impact of localized PCSK9 in vascular wall*. J Cell Physiol, 2021. 236(4): p. 2333-2351.
158. Liu, A., et al., *Proprotein convertase subtilisin kexin 9 is associated with disease activity and is implicated in immune activation in systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2020. 29(8): p. 825-835.
159. Fang, C., T. Luo, and L. Lin, *Elevation of serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) concentrations and its possible atherogenic role in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Transl Med, 2018. 6(23): p. 452.
160. Brown, M. and S. Ahmed, *Emerging role of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 (PCSK-9) in inflammation and diseases*. Toxicol Appl Pharmacol, 2019. 370: p. 170-177.
161. Ferraz-Amaro, I., et al., *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2016. 34(6): p. 1013-1019.
162. Luan, C., et al., *Potential of Psoriasis-Like Inflammation by PCSK9*. J Invest Dermatol, 2019. 139(4): p. 859-867.
163. Garshick, M.S., et al., *Characterization of PCSK9 in the Blood and Skin of Psoriasis*. J Invest Dermatol, 2021. 141(2): p. 308-315.
164. Ferraz-Amaro, I., et al., *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in patients with systemic sclerosis*. Clin Exp Rheumatol, 2020. 38 Suppl 125(3): p. 18-24.
165. Shen, H., et al., *Correlation between plasma proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and blood lipids in patients with newly diagnosed primary nephrotic syndrome*. Ren Fail, 2020. 42(1): p. 405-412.
166. Mostaza, J.M., et al., *R46L polymorphism in the PCSK9 gene: Relationship to lipid levels, subclinical vascular disease, and erectile dysfunction*. J Clin Lipidol, 2018. 12(4): p. 1039-1046 e3.
167. Qiu, C., et al., *What is the impact of PCSK9 rs505151 and rs11591147 polymorphisms on serum lipids level and cardiovascular risk: a meta-analysis*. Lipids Health Dis, 2017. 16(1): p. 111.
168. Reddy, S., N. Kaur, and J. Singh, *A novel study to examine the association of PCSK9 rs505151 polymorphism and coronary artery disease in north Indian population*. J Genet, 2018. 97(5): p. 1371-1378.
169. Luo, H., et al., *Genetic variants influencing lipid levels and risk of dyslipidemia in Chinese population*. J Genet, 2017. 96(6): p. 985-992.
170. Kulminski, A.M., et al., *Birth Cohort, Age, and Sex Strongly Modulate Effects of Lipid Risk Alleles Identified in Genome-Wide Association Studies*. PLoS One, 2015. 10(8): p. e0136319.
171. Small, A.M., et al., *PCSK9 loss of function is protective against extra-coronary atherosclerotic cardiovascular disease in a large multi-ethnic cohort*. PLoS One, 2020. 15(11): p. e0239752.
172. Harrison, S.C., et al., *Genetic Association of Lipids and Lipid Drug Targets With Abdominal Aortic Aneurysm: A Meta-analysis*. JAMA Cardiol, 2018. 3(1): p. 26-33.
173. Guo, T., et al., *Association of the variants and haplotypes in the DOCK7, PCSK9 and GALNT2 genes and the risk of hyperlipidaemia*. J Cell Mol Med, 2016. 20(2): p. 243-65.
174. Guo, T., et al., *Association between the DOCK7, PCSK9 and GALNT2 Gene Polymorphisms and Serum Lipid levels*. Sci Rep, 2016. 6: p. 19079.

175. Berge, K.E., L. Ose, and T.P. Leren, *Missense mutations in the PCSK9 gene are associated with hypocholesterolemia and possibly increased response to statin therapy*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(5): p. 1094-100.
176. Kotowski, I.K., et al., *A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol*. *Am J Hum Genet*, 2006. 78(3): p. 410-22.
177. Wu, N.Q. and J.J. Li, *PCSK9 gene mutations and low-density lipoprotein cholesterol*. *Clin Chim Acta*, 2014. 431: p. 148-53.
178. De Castro-Oros, I., et al., *Genetic Variants of LDLR and PCSK9 Associated with Variations in Response to Antihypercholesterolemic Effects of Armolipid Plus with Berberine*. *PLoS One*, 2016. 11(3): p. e0150785.
179. Dron, J.S. and R.A. Hegele, *Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin-kexin type 9 variants*. *Curr Opin Lipidol*, 2017. 28(2): p. 161-169.
180. Oguz, A., et al., *Risk of cardiovascular events in patients with metabolic syndrome: Results of a population-based prospective cohort study (PURE Turkey)*. *Anatol J Cardiol*, 2020. 24(3): p. 192-200.
181. Bai, X.S., et al., *Impact of metabolic syndrome on short-term outcome of carotid revascularization: a large sample size study in Chinese population*. *Chin Med J (Engl)*, 2020. 133(22): p. 2688-2695.
182. Longo, A., et al., *Prevalence of metabolic syndrome and its association with risk factors in patients with established atherosclerosis disease*. *An Acad Bras Cienc*, 2020. 92(1): p. e20180563.
183. Panh, L., et al., *Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients*. *Atherosclerosis*, 2017. 260: p. 81-86.
184. Sahin, I., et al., *Correlation between the serum alkaline phosphatase level and the severity of coronary artery disease*. *Coron Artery Dis*, 2014. 25(4): p. 349-52.
185. Han, K., et al., *Correlations of degree of coronary artery stenosis with blood lipid, CRP, Hcy, GGT, SCD36 and fibrinogen levels in elderly patients with coronary heart disease*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019. 23(21): p. 9582-9589.
186. Arasteh, S., et al., *Serum level of gamma-glutamyl transferase as a biomarker for predicting stenosis severity in patients with coronary artery disease*. *Indian Heart J*, 2018. 70(6): p. 788-792.
187. Li, D.D., et al., *Serum Gamma-Glutamyltransferase Levels are Associated with Cardiovascular Risk Factors in China: A Nationwide Population-Based Study*. *Sci Rep*, 2018. 8(1): p. 16533.
188. Poledne, R. and J. Kovar, *Hypertriglyceridemia and atherosclerosis risk*. *Vnitr Lek*, 2020. 65(12): p. 783-787.
189. Toth, P.P., et al., *Risk of cardiovascular events in patients with hypertriglyceridaemia: A review of real-world evidence*. *Diabetes Obes Metab*, 2020. 22(3): p. 279-289.
190. Tenenbaum, A., R. Klempfner, and E.Z. Fisman, *Hypertriglyceridemia: a too long unfairly neglected major cardiovascular risk factor*. *Cardiovasc Diabetol*, 2014. 13: p. 159.
191. Viana-Huete, V. and J.J. Fuster, *Potential Therapeutic Value of Interleukin 1b-targeted Strategies in Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2019. 72(9): p. 760-766.
192. Grebe, A., F. Hoss, and E. Latz, *NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2018. 122(12): p. 1722-1740.

193. Alizargar, J. and C.H. Bai, *Value of the arterial stiffness index and ankle brachial index in subclinical atherosclerosis screening in healthy community-dwelling individuals*. BMC Public Health, 2019. 19(1): p. 65.
194. Bejjani, F., et al., *The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command?* Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019. 1872(1): p. 11-23.
195. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat Cell Biol, 2002. 4(5): p. E131-6.
196. Zhao, Q., et al., *TCF21 and AP-1 interact through epigenetic modifications to regulate coronary artery disease gene expression*. Genome Med, 2019. 11(1): p. 23.
197. Santiago, F.S., et al., *Induction of the transcriptional repressor Yin Yang-1 by vascular cell injury. Autocrine/paracrine role of endogenous fibroblast growth factor-2*. J Biol Chem, 2001. 276(44): p. 41143-9.
198. Bruderer, M., M. Alini, and M.J. Stoddart, *Role of HOXA9 and VEZF1 in endothelial biology*. J Vasc Res, 2013. 50(4): p. 265-78.
199. Godo, S. and H. Shimokawa, *Endothelial Functions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. 37(9): p. e108-e114.
200. Soellner, L., et al., *Recent Advances in Imprinting Disorders*. Clin Genet, 2017. 91(1): p. 3-13.
201. Tatton-Brown, K., et al., *The Tatton-Brown-Rahman Syndrome: A clinical study of 55 individuals with de novo constitutive DNMT3A variants*. Wellcome Open Res, 2018. 3: p. 46.
202. Tenorio, J., et al., *Further delineation of neuropsychiatric findings in Tatton-Brown-Rahman syndrome due to disease-causing variants in DNMT3A: seven new patients*. Eur J Hum Genet, 2020. 28(4): p. 469-479.
203. Bozic, T., et al., *Variants of DNMT3A cause transcript-specific DNA methylation patterns and affect hematopoiesis*. Life Sci Alliance, 2018. 1(6): p. e201800153.
204. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010. 363(25): p. 2424-33.
205. Zhou, J., et al., *Association of five genetic variations in DNMT1 and DNMT3A with gastric cancer in a Chinese population*. Future Oncol, 2018. 14(17): p. 1731-1739.
206. Ding, D., et al., *Polymorphisms in DNA methylation-related genes are linked to the phenotype of Machado-Joseph disease*. Neurobiol Aging, 2019. 75: p. 225 e1-225 e8.
207. Zhang, W., et al., *Genetic Polymorphism of DNA Methyltransferase 3A rs1550117 A>G and Risk of Cancer: A Meta-analysis*. J Invest Surg, 2015. 28(6): p. 346-53.
208. Wang, J., et al., *The rs1550117 A>G variant in DNMT3A gene promoter significantly increases non-small cell lung cancer susceptibility in a Han Chinese population*. Oncotarget, 2017. 8(14): p. 23470-23478.
209. Fan, H., et al., *A functional polymorphism in the DNA methyltransferase-3A promoter modifies the susceptibility in gastric cancer but not in esophageal carcinoma*. BMC Med, 2010. 8: p. 12.
210. Rodriguez-Perez, J.M., et al., *Possible role of intronic polymorphisms in the PHACTR1 gene on the development of cardiovascular disease*. Med Hypotheses, 2016. 97: p. 64-70.