



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Polimorfismos involucrados en la oxidación de lípidos, el  
hábito de fumar y su asociación con la aterotrombosis”.**

**TESIS**

**Que presenta**

**L. N. NADIA QUIROZ JIMÉNEZ**

**Para obtener el grado de**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA**

**Directora de Tesis:**

**Dra. María del Rocío Gómez Ortega**

**Comité Académico:**

**Dra. Emma S. Calderón Aranda**

**Dra. Luisa Torres Sánchez**

**Ciudad de México**

**Octubre de 2018**

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 14 del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Politécnico Nacional (CINVESTAV), bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Gómez Ortega. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto de FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACION EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL FOSISS No 261268.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Rocío Gómez Ortega, por permitirme ser parte de su laboratorio a lo largo de este tiempo. Gracias por confiar en mí y compartir sus valiosos conocimientos, por apoyarme y ser mi guía en este camino en Cinvestav.

A la Dra. Emma Calderón por las observaciones realizadas al presente proyecto, a la Dra. Luisa Torres, por su valioso apoyo en la realización de los análisis estadísticos. Gracias a ambas por el tiempo dedicado a la lectura de este escrito.

A mis padres, Reyna y Memo, quienes son mi mayor inspiración en la vida. Gracias por ayudarme a abrir mis alas e iniciar mi camino lejos de casa. Sin ustedes, nada de esto hubiera sido posible. Los amo.

A mis hermanos, Arturo y Jesús, quienes con su experiencia me guiaron en este camino. Gracias por compartir conmigo esta etapa. Gracias por estar siempre presentes. Los quiero y admiro mucho.

A mi familia de Pachuca. A mi abuelo, tías y tíos, quienes con sus abrazos en fines de semana me ayudaban a reiniciarme. A mi abuela, que desde lejos me escuchaba por las noches.

A mis amigos, Carla y Andrés, por la bella amistad que me brindan. Porque me demostraron que la distancia no es obstáculo para vernos crecer y estar presentes en los momentos importantes.

A Nicole, gracias por haber iniciado esta aventura conmigo. Por apoyarme en cada momento.

A Laura y Esme, gracias por cada aventura y cada día compartido en estos años. Gracias por las tardes de risas y regaños, las llevo en mi corazón.

A mis amigos de la generación anterior, Gustavo, Ari, Mari, Vane y Felipe, por darme una bella amistad y hacerme sentir como en casa.

A Arturo, por ser mi compañero de ciudad. A todos mis compañeros de generación, quienes me compartieron sus conocimientos.

A mi "ma", Alhelí, por ser una excelente guía y amiga. Por su paciencia y las enseñanzas compartidas.

A mi familia de laboratorio, Alhelí, Rafa, Aida, Lirio, Esme y Lulú por su apoyo y confianza.

A Víctor, quien se incorporó en mi camino y me ha brindado su apoyo desde entonces.

## Contenido

Lista de tablas .....	i
Lista de figuras .....	ii
Abreviaturas .....	iii
<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular .....	1
1.2 Bases Moleculares de la aterotrombosis .....	2
1.2.1 Mecanismos de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad... ..	3
1.2.2 Disrupción de la placa: manifestaciones clínicas de la aterotrombosis... ..	10
1.3 Factores de Riesgo .....	11
1.3.1 Consumo de cigarro .....	14
1.4 Factores genéticos .....	16
<b>2. Justificación .....</b>	<b>20</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>20</b>
4.1 Objetivo general .....	20
4.2 Objetivos particulares .....	21
<b>5. Método .....</b>	<b>22</b>
<b>5.1 Diseño del estudio .....</b>	<b>22</b>
5.1.1 Definición de los grupos de estudio .....	22
5.1.2 Entrevista realizada a los participantes del estudio .....	23
5.1.3 Descripción de las variables .....	24
5.1.4 Descripción operacional de las variables .....	24
<b>5.2 Estrategia experimental .....</b>	<b>27</b>
5.2.1 Análisis molecular .....	27
5.2.1.1 Procedimiento .....	27
<b>5.3 Análisis de datos .....</b>	<b>30</b>
5.3.1 Análisis genético: parámetros genéticos poblacionales .....	30
5.3.2 Análisis estadístico .....	30
5.3.3 Comparaciones con otras poblaciones .....	31
<b>5.4 Consideraciones éticas .....</b>	<b>32</b>
<b>6. Resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>63</b>
<b>9. Perspectivas .....</b>	<b>64</b>
<b>10. Bibliografías .....</b>	<b>65</b>



## **Lista de tablas**

Tabla 1. Polimorfismos asociados a la oxidación de lípidos.

Tabla 2. Características generales de los marcadores tipo SNP analizados.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la realización de qPCR por sondas *TaqMan*.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la genotipificación de los polimorfismos estudiados.

Tabla 5: Comparación con otras poblaciones del mundo.

Tabla 6. Características generales de los grupos de estudio.

Tabla 7. Características asociadas con el desarrollo de Aterotrombosis en la población de estudio y de acuerdo al sexo.

Tabla 8. Asociación entre índice tabáquico y la presencia de evento aterotrombótico, de acuerdo al antecedente familiar de enfermedad cardiovascular.

Tabla 9. Frecuencias genéticas y estadística poblacional descriptiva.

Tabla 10. Polimorfismo P22phox asociado a la presencia de AT.

Tabla 11. Análisis de diferenciación poblacional con el marcador P22phox.

## Lista de figuras

Figura 1. Oxidación de fosfolípidos de ácidos grasos poliinsaturados.

Figura 2. Oxidación enzimática de lipoproteínas.

Figura 3. Fisiopatología de la aterosclerosis: participación de las ox-LDL.

Figura 4. a) Características de la placa aterosclerótica estable. b) Ruptura de la placa y formación del trombo.

Figura 5. Análisis de escalamiento multidimensional entre los grupos de estudio.

Figura 6. Análisis de escalamiento multidimensional empleando los *loci* *APOA4*-rs5104 y *P22phox*-rs4673 con los grupos de estudio y otras poblaciones del mundo obtenidas del proyecto 1000 genomas.

Figura 7. Gráfica de barras mostrando la estratificación poblacional obtenida con los marcadores de *APOA4*-rs5104 y *P22phox*-rs4673.

Figura 8. Gráfica de número de subpoblaciones con respecto al valor de Delta k, realizada con el programa *Harvester*.

Figura 9. Árbol filogenético obtenido a partir del análisis bayesiano para determinar la estratificación poblacional.

## Abreviaturas

**15-LO:** 15 lipoxigenasa

**ACV:** accidente cerebrovascular

**ALOX5AP:** proteína activadora de la araquidonato 5 lipoxigenasa

**APOA4:** apolipoproteína 4

**APOA5:** apolipoproteína 5

**AT:** aterotrombosis

**ATP:** trifosfato de adenosina

**CG:** control genómico

**CT:** colesterol total

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EAC:** enfermedad arterial coronaria

**EAG:** estudios de asociación genética

**EAP:** enfermedad arterial periférica

**EAS:** asiáticos del este

**ECVs:** enfermedades cardiovasculares

**EPOC:** enfermedad obstructiva crónica

**GWAS:** estudios de escaneo del genoma completo

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**HWE:** Equilibrio de Hardy-Weinberg

**IAM:** infarto agudo al miocardio

**IMC:** índice de masa corporal

**INDELS:** inserciones y deleciones

**iNOS:** óxido nítrico inducible

**LD:** desequilibrio de ligamiento

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**LO:** lipooxigenasas

**LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**MDA:** malondialdehído

**MDS:** análisis de escalamiento multidimensional

**MMPs:** metaloproteinasas de matriz

**MPO:** mieloperoxidasas

**mRNA:** RNA mensajero

**NADPH:** Nicotinamida Adenina dinucleótido fosfato

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear  $\kappa$ B

**Nox 2:** NADPH oxidasa 2

**Nox:** NADPH oxidasa

**OCDE:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

**OH $\cdot$ :** radicales hidroxilo

**ON:** óxido nítrico

**Ox-LDL:** lípidos oxidados/lipoproteínas de baja densidad oxidadas

**PA:** placa aterosclerótica

**PAHs:** hidrocarburos aromáticos policíclicos

**PCR:** proteína C reactiva

**PON1:** paraoxonasa 1



**PUFA:** ácidos grasos polinsaturados

**RNS:** especies reactivas de nitrógeno

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RR:** riesgo relativo

**RM:** razón de momios

**SNP:** polimorfismos de un solo nucleótido

**SOD:** superóxido dismutasa

**STREGA:** *STrengthening the REporting of Genetic Association studies*

**TG:** triglicéridos

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

**TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial

**VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad

## Resumen

La aterotrombosis es una enfermedad multifactorial y poligénica producto de la desestabilización de la placa aterosclerótica. Esta condición, es la responsable de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares, que en nuestro país contribuyen a más del 77% del total de las muertes en adultos. Factores ambientales como el humo del cigarro, favorecen la oxidación de lípidos, un proceso clave para la formación de la placa aterosclerótica. Por su parte, el componente genético contribuye potencialmente con el desarrollo de la placa. En el presente proyecto, se evaluó la asociación entre el consumo de cigarro de acuerdo a la condición de fumador y el índice tabáquico. Además, se determinó la asociación de siete polimorfismos de un solo nucleótido (*SOD*-rs4880, *APOA4*-rs5104, *APOA5*-rs662799, *LOX-1*-rs1050283, *ALOX5AP*-rs4769874, y *P22phox*-rs4673, *TOMM40*-rs2075650) relacionados con la oxidación de lípidos y la presencia de aterotrombosis. Para esto se incluyó a 204 individuos con diagnóstico de aterotrombosis y 204 individuos sanos pertenecientes a la etnia mestiza mexicana no relacionados entre sí. Con el fin de evitar falsas asociaciones debidas a la compleja arquitectura genética de la población mexicana se incluyó también un control genómico. La discriminación alélica se realizó mediante q-PCR. La presencia de aterotrombosis se asoció positivamente con hipercolesterolemia (RM = 2.91, IC<sub>95%</sub> = 1.42-5.99); el antecedente familiar de enfermedad cardiovascular (RM = 3.15, IC<sub>95%</sub> = 1.97-5.02), así como con la historia de tabaquismo. En comparación con los no fumadores, los exfumadores (RM = 2.69, IC<sub>95%</sub> = 1.59-4.56) y un consumo mayor a dos paquetes/año (RM = 2.64, IC<sub>95%</sub> = 1.46-4.77) mostraron asociación con la presencia de aterotrombosis. Con respecto a la contribución genética, sólo se observaron diferencias en las frecuencias del polimorfismo *P22phox*-rs4673 entre los sujetos con y sin aterotrombosis. Los portadores del genotipo AA así como el análisis bajo el modelo recesivo (GG+AG vs AA) mostraron una asociación de dos veces más con la presencia de aterotrombosis. (RM = 2.56; IC<sub>95%</sub> = 0.99-6.62,  $p=0.05$ ). Esto fue soportado por el desequilibrio de *Hardy-Weinberg* ( $F_{IS} = 0.130$ ,  $p=0.04$ ). Nuestros datos sugieren que tanto la condición de exfumador como el genotipo AA del polimorfismo *P22phox*-rs4673 podrían contribuir con el desarrollo de la aterotrombosis. Nuestros hallazgos resaltan la importancia del estudio de la contribución del componente genético y ambiental en la aterotrombosis en una población compleja como lo es la mestiza mexicana.

## Abstract

Atherothrombosis, a multifactorial and polygenic disease, is the keystone of the majority of cardiovascular diseases, contributing to more than 77% of the total deaths in the Mexican adults. Both environmental (i.e., cigarette smoke) as the genetic factors have been related with the lipids oxidation, exhibiting a critical role in the atherosclerotic plaque formation. Despite, the contribution of the environmental and genetic factors have been studied separately, the study of the contribution of both factors is scanty. Herein, the tobacco consumption was evaluated through smoking status and smoking index. The genetic contribution of seven single nucleotide polymorphisms (*SOD*-rs4880, *APOA4*-rs5104, *APOA5*-rs662799, *LOX-1*-rs1050283, *ALOX5AP*-rs4769874, *P22phox*-rs4673, *TOMM40*-rs2075650) related to lipids oxidation were investigated. We included 408 unrelated mestizos (204 individuals with atherothrombosis and 204 healthy individuals). A genomic control was also characterised to avoid false associations related to the complex genetic architecture of the Mexican population. Allele discrimination was determined by real-time PCR. Our findings suggest that the hypercholesterolemia (OR = 2.91, CI<sub>95%</sub> = 1.42-5.99), family history of cardiovascular disease (OR = 3.15, CI<sub>95%</sub> = 1.97 - 5.02), ex-smoker status (OR = 2.69, CI<sub>95%</sub> = 1.59-4.56), and cigarette consumption greater than two packages per year (OR = 2.64, CI<sub>95%</sub> = 1.46-4.77), were associated with the presence of atherothrombosis. The homozygous state of the A allele in *P22phox*-rs4673 exhibited frequency differences in the case group *versus* the controls (healthy and genomic). The recessive model analysis (GG+AG vs AA) showed an association of two times with the presence of atherothrombosis (RM = 2.56; CI<sub>95%</sub> = 0.99 - 6.62,  $p = 0.05$ ). These differences were supported both Hardy-Weinberg disequilibrium ( $F_{IS} = 0.130$ ,  $p = 0.04$ ), as well as the odds ratio (OR = 2.25; CI<sub>95%</sub> = 0.86 - 5.90,  $p = 0.08$ ). In summary, those carriers of the AA-*P22phox*-rs4673 genotype and ex-smoker status present twice risk to atherothrombosis development in comparison with the healthy controls. These findings highlight the genetic and environmental approaches in the study of the complex diseases.

## 1. Introducción

La aterotrombosis (AT), es el término utilizado para describir la formación de trombos que ocurre posterior a la ruptura de la placa aterosclerótica (PA) (Badimón et al., 2009). Estos trombos obstruyen el paso del flujo sanguíneo hacia diferentes órganos desencadenando algunas patologías como el infarto agudo al miocardio (IAM), al accidente cerebrovascular (ACV), la enfermedad arterial coronaria (EAC) y la enfermedad arterial periférica (EAP), condiciones que son incluidas en las enfermedades cardiovasculares (ECVs) (Wang & Peter, 2017). Las ECV son un grupo de desórdenes del corazón y los vasos sanguíneos cuyas manifestaciones clínicas (*v.gr.*, EAC y el ACV) son de las principales causas de muerte en adultos a nivel mundial (Högström, 2017; OMS, 2015). La AT es una condición que se relaciona con anormalidades hemostáticas como la hipercoagulabilidad, la hipofibrinólisis, alteraciones en el metabolismo de lípidos y con procesos inflamatorios y oxidantes que afectan a los vasos sanguíneos de la mayoría de los territorios corporales (Spronk et al., 2018). A su vez esta enfermedad tiene como condición primaria subyacente a la aterosclerosis, un desorden crónico y progresivo de las arterias relacionado con la acumulación de colesterol y con procesos inflamatorios crónicos (Badimón et al., 2009). Ambas enfermedades son condiciones complejas, inflamatorias y degenerativas de etiología multifactorial que tienen un gran impacto en la vida de las poblaciones mundiales (Badimon et al., 2012; Díaz-Castro et al., 2005).

### 1.1 Epidemiología de la enfermedad cardiovascular

En las últimas décadas, el estudio de las ECVs se ha visto motivado por el gran incremento que estas enfermedades han mostrado a lo largo del tiempo. Tan solo en el año 2015, se estimaron 17.7 millones de muertes por ECV lo que representó más del 30% de las muertes totales a nivel mundial (World Heart Federation, 2016). En ese mismo año, se estimaron 42.7 millones de casos prevalentes de ECV, siendo la cardiopatía isquémica y el ACV las principales causas de muerte en el mundo, incluso por encima de las infecciones respiratorias, la enfermedad obstructiva crónica (EPOC) y los cánceres de pulmón, tráquea y bronquios (OMS, 2015; Roth et al., 2017).

Los estadísticos regionales señalan que en Europa el 45% del total de las muertes registradas se deben a alguna ECV mientras que, en América, países como Estados Unidos reportan cifras de hasta 800,000 muertes al año, representando una de cada tres muertes en ese país (European heart network, 2017). Otros países como Colombia y Chile reportan cifras cercanas al 28% de las muertes anuales, mientras que en los países en vías de desarrollo estas enfermedades aportan cerca del 62% del total de muertes a nivel mundial (Gómez, 2011; Ministerio de Salud, 2015).

México es uno de los países con mayor incidencia de ECV, en donde la mortalidad estimada es de 292 personas por cada 100,000 habitantes, representando el 77% del total de las muertes en adultos (OCDE, 2015). Además de la mortalidad, hoy en día se utilizan otros indicadores para medir el impacto de las ECVs. En este sentido, los años de vida potencialmente perdidos (AVPP), son un indicador que ilustra la pérdida que sufre la sociedad como consecuencia de las muertes prematuras, basándose en el supuesto de que cuánto más temprana es la muerte, mayor es el número de años de vida potencialmente perdidos (Ministerio de Salud, 2015). Los AVPP para nuestro país son de aproximadamente 728 años por cada 100,000 habitantes, 25% más alta que el promedio de los países pertenecientes a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE; 521 años/100 mil habitantes). Este dato sugiere que, en México, las ECV ocurren a edades cada vez más tempranas, lo que resulta en la disminución en la calidad de vida de las personas que las padecen, así como en su rendimiento productivo (OCDE, 2015).

## **1.2 Bases Moleculares de la aterotrombosis**

El estudio de los procesos fisiopatológicos que suceden en el desarrollo de la AT es complejo, ya que al ser una enfermedad en la cual convergen múltiples factores de riesgo, las bases moleculares no están totalmente dilucidadas. Entre los mecanismos con mayor contribución a la formación de placa se encuentran: la oxidación de lipoproteínas, el estrés oxidante, la inflamación y los estados de hipercoagulación, los que son señalados como las principales vías patológicas precursoras de la enfermedad aterosclerótica (Chang et al., 2017).

Bajo condiciones normales existen diferentes mediadores del balance homeostático del endotelio vascular. El óxido nítrico (ON) es uno de los más importantes, cuya función principal es mantener el tejido endotelial en un estado quiescente que se caracteriza por una baja adhesión leucocitaria, una óptima biodisponibilidad de vasodilatadores y una baja permeabilidad (Badimón et al., 2009; Portilla et al., 2013; Seidman et al., 2014). Sin embargo, por diversos mecanismos, estas características pueden modificarse resultando en el desarrollo de la AT incluso a edades más tempranas.

### **1.2.1 Mecanismos de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad**

La AT inicia silenciosamente en las etapas tempranas de la vida cuando se empiezan a formar las PA como consecuencia del depósito subendotelial de lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés, *low density lipoproteins*) (Badimón et al., 2009). Estas lipoproteínas están conformadas por una capa exterior compuesta por fosfolípidos con cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés, *Poli unsaturated fatty acid*). Los PUFA son altamente vulnerables a la oxidación por radicales libres (*v.gr.*: radicales hidroxilo,  $\text{OH}^\cdot$ ), cuyos productos secundarios más importantes para la aterogénesis son los lípidos oxidados (ox-LDL, por sus siglas en Inglés, *Oxidized Low Density Lipoprotein*) y los aldehídos lipídicos reactivos, los cuales ejercen sus efectos modificando estructuralmente a proteínas y otras macromoléculas (Figura 1) (Linton et al., 2015).

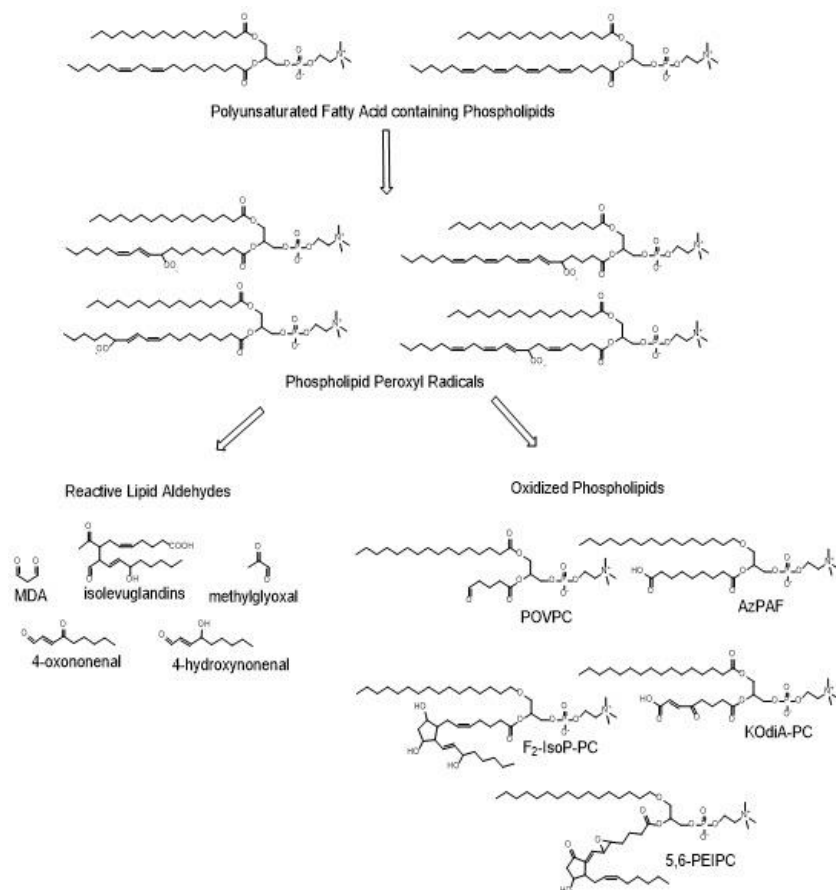


Figura1. Oxidación de fosfolípidos de ácidos grasos poliinsaturados MDA: malondialdehído; POVPC: 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina; AzPAF: 1-O-alkil-2-azelaoil-sn-glicero-3-fosforilcolina; F<sub>2</sub>-Iso-PC: 1-palmitoil-2-F<sub>2</sub>-isoprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina; KOdiA-PC: 1- (palmitoil) -2 Fosfatidilcolina; 5,6-PEIPC: 1-palmitoil-2- (5-ceto- 5,6) - epoxiisoprostano E2 - sn - glicero - 3 -fosforilcolina. (Tomada de Linton et al., 2015).

Las LDL al ser altamente sensibles al daño oxidante y al unirse al colesterol proveniente de la circulación sanguínea, se infiltran en la pared arterial desencadenando la formación de la PA (Tsimikas & Miller, 2011). Así, un punto primordial en la fisiopatología del proceso aterosclerótico es la oxidación de los lípidos, los que pueden ser modificados por diferentes procesos bioquímicos que se dividen para su estudio en dos principales vías (Yoshida & Kisugi, 2010):

1. Vía no enzimática. Está mediada por metales como el cobre y cationes bivalentes como el Fe<sup>2+</sup>, que catalizan modificaciones oxidativas de las LDL, generando ox-LDL. Estas ox-LDL son un ligando para el receptor acetil LDL en la superficie de los macrófagos lo que conlleva a la formación de las células espumosas (Ayala et al., 2014).
2. Vía enzimática. Participan diferentes tipos celulares residentes de las lesiones ateroscleróticas como: las células endoteliales, los

monocitos/macrófagos, los neutrófilos y fibroblastos, los que aceleran el proceso oxidativo. Esta vía está orquestada por una serie de enzimas como las lipooxigenasas (LO, por sus siglas en inglés, *Lipoxygenase*) y las mieloperoxidasas (MPO, por sus siglas en inglés, *myeloperoxidase*) derivadas de macrófagos, así como por la Nicotinamida Adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidasa y el óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés, *Inducible nitric oxide synthase*), que contribuyen a la oxidación de las LDL (Tsimikas, 2006).

La lipooxigenasa es una enzima intracelular que cataliza la oxidación de los ácidos grasos libres y de las cadenas de los PUFAS, dando como resultado diferentes tipos de hidroperóxidos como los hidroperóxidos de ácidos grasos libres (FFA-OOH, por sus siglas en inglés, *free fatty acid hydroperoxide*), los hidroperóxidos de fosfolípidos (PL-OOH, por sus siglas en inglés, *phospholipid hydroperoxides*) e hidroperóxido de éster de colesterol (CE-OOH, por sus siglas en inglés, *cholesteryl ester hydroperoxide*) (Hoff & O'neil, 1991; Tsimikas & Miller, 2011). Estudios *in vitro* han encontrado que los niveles proteicos y de RNA mensajero (mRNA) de la 15-LO se encuentran elevados en el tejido aterosclerótico lo cual sugiere que la lipooxigenasa está involucrada en la oxidación de las LDL y por ende en el proceso de aterogénesis (Linton et al., 2015; Tsimikas & Miller, 2011).

La MPO, por su parte, es una enzima secretada por los neutrófilos, monocitos y macrófagos generando una serie de agentes oxidantes como el ácido hipocloroso (HClO) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), los cuales pueden iniciar la oxidación de lípidos y proteínas, con la consecuente producción de LDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés *High Density Lipoprotein*) cloradas y nitradas (Tsimikas, 2006). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés, *reactive nitrogen species*) convierten a las LDL en un ligando de alta afinidad para el receptor CD36, que media su captación por los macrófagos, favoreciendo la formación de las células espumosas en el endotelio vascular (Tsimikas & Miller, 2011).



En un estado de inflamación, la sobreexpresión de iNOS provoca el incremento de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) por la NADPH oxidasa (Nox) de los fagocitos. Además de su papel en la oxidación de lipoproteínas, muchos estudios sugieren que las enzimas iNOS y Nox desempeñan importantes funciones de señalización de muchos tipos de células (Gaut & Heinecke, 2001). Estudios recientes han demostrado que las LDL mínimamente modificadas activan a la NADPH oxidasa 2 (Nox2) en macrófagos, mediando así la secreción de citocinas proinflamatorias y la migración de células de músculo liso vasculares (Linton et al., 2015; Tsimikas & Miller, 2011). Por su parte, estudios *in vitro* han demostrado que el ON puede reaccionar con iones superóxido para formar peroxinitritos, los cuales a su vez pueden iniciar la peroxidación de las LDL (Figura 2) (Gaut & Heinecke, 2001).

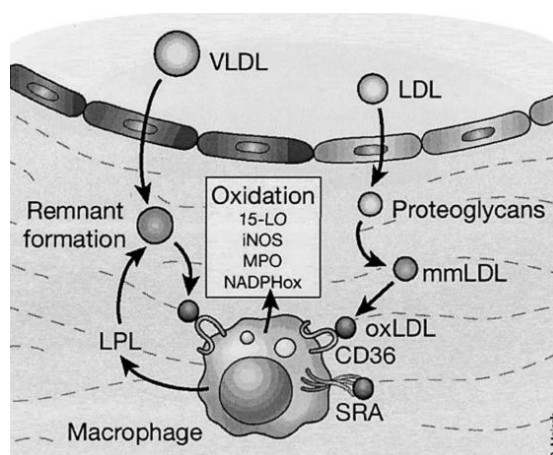


Figura 2. Oxidación enzimática de lipoproteínas. VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; 15-LO: 15- lipooxigenasa; iNOS: óxido nítrico inducible; NADPHox: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada; mmLDL: lipoproteínas de baja densidad mínimamente modificadas; ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; LPL: lipoproteína lipasa; receptor CD36 y receptor SRA (Tomado de Tsimikas, 2006).

Como consecuencia de la oxidación de las LDL existe una producción desregulada de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) provocando un incremento en el estrés oxidante (Niemann et al., 2017). Las fuentes de ROS en el organismo son diversas, siendo la mitocondria una de las principales productoras (Puddu et al., 2009). Este organelo celular está encargado de la producción de trifosfato de adenosina (ATP, por sus siglas en inglés, *Adenosine triphosphate*), de la muerte celular programada, además de la regulación de numerosas vías metabólicas como la  $\beta$ -oxidación y el

ciclo de Krebs (Sack, et al., 2017). El estudio de la participación de la mitocondria en las ECV ha permitido postular la teoría de disfunción mitocondrial, la cual postula que el exceso en la liberación de ROS así como de RNS, pueden contribuir a las señales de inflamación vascular que conllevan al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Puddu et al., 2009). Este desarrollo está asociado con un incremento en la producción de ROS, las cuales tienen la capacidad de causar disfunción endotelial, proliferación y apoptosis de células de musculo liso vasculares y macrófagos, favoreciendo así la progresión y la ruptura de la PA (Puddu et al., 2009; Sack, et al., 2017). En este sentido, una de las mayores fuentes de ROS en mitocondria es la Nox (Niemann et al., 2017), una flavoproteína que incluye dos subunidades transmembrana (gp91phox y p22phox) y tres proteínas citosólicas (p40phox, p47phox y p67phox) (Niemann et al., 2017). Su mayor expresión es en los fagocitos, las células de musculo liso vasculares y las células endoteliales (Najafi et al., 2012). La familia de las Nox es capaz de transportar electrones de la NADPH y reducir el oxígeno al anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Diversos estudios señalan que su incremento está implicado en la patogénesis de las enfermedades vasculares y en los seres humanos se ha correlacionado a los niveles de expresión de sus subunidades con la aterosclerosis, por lo que también es sujeto de estudio en la fisiopatología de la AT (Stanger et al., 2001).

Además de la actividad de las enzimas previamente mencionadas, el estrés presente en la PA también es mediado por la exposición a diferentes factores ambientales, así como por otras enzimas como la hemoxigenasa tipo 1 (HO-1, por sus siglas en inglés *Heme oxygenase-1*), la superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés *Superoxide dismutase*) y la paraoxonasa 1 (PON1, por sus siglas en inglés *Paraoxonase 1*) (Badimon et al., 2012). La SOD, es una enzima antioxidante clave en la dismutación catalítica del  $O_2^{\cdot-}$  que participa en diversos procesos biológicos inducidos por estrés oxidante (Fukai et al., 2011). Dentro de las células, la SOD convierte compuestos reactivos altamente dañinos en  $H_2O_2$ , el cual sirve como sustrato para la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Bresciani et al., 2013). Estas dos enzimas catalizan la conversión de  $H_2O_2$  en agua, manteniendo así el equilibrio óxido-reducción en el organismo (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). La SOD presenta tres isoformas: 1) la SOD1 (Cu/ZnSOD), presente

en el plasma; 2) la SOD2 (MnSOD), presente en la mitocondria y 3) la SOD3 (Cu/ZnSOD) presente en la matriz extracelular (Fukai et al., 2011). Estudios clínicos han señalado que la SOD protege a las células y sus componentes extracelulares de procesos inflamatorios (Xu et al., 2017). Su relación con las ECVs radica en que la SOD1 protege la liberación de ON proveniente del endotelio, por lo que tiene una función importante en la función endotelial. En el caso de la SOD2, esta es la primera línea de defensa en contra de los ROS en mitocondria por lo que su deficiencia parece ser la responsable de la disfunción endotelial mediada principalmente por el incremento de  $O_2^{\cdot-}$  (Münzel et al., 2017). Estos hallazgos han sido respaldados por estudios *in vivo* en donde ratones *knock out* para el gen de SOD2 mueren a los pocos días después del nacimiento, mientras que la deficiencia heterocigota de este mismo gen media la disfunción mitocondrial y el daño al DNA, así como formación de PA en ratones *knock out* para el gen ApoE<sup>-/-</sup> (Münzel et al., 2017). Otros estudios apuntan que las SOD se encuentran involucradas en el proceso de aterogénesis mediante la inhibición de las alteraciones oxidativas causadas por  $O_2^{\cdot-}$ , así como por la prevención de la remoción de ON mediada por  $O_2^{\cdot-}$ , a la vez que facilitan la vaso-relajación del endotelio, la inhibición de la adhesión leucocitaria al endotelio vascular y la alteración de las respuestas celulares vasculares, razones por las cuales se sugiere que esta familia de enzimas funge un papel protector en la aterosclerosis (Xu et al., 2017; Fukai et al., 2016).

Las oxidaciones que sufren las LDL, ya sean por la vía no enzimática o por la vía enzimática conllevan a la acumulación de ox-LDLs favoreciendo la activación del endotelio y la promoción de un estado pro-oxidante (Tsimikas & Miller, 2011). Esta activación es un proceso mediante el cual se pierde la hemostasia vascular, además de que se promueve la expresión de moléculas de adhesión celular tales como la molécula de adhesión celular-1 (ICAM-1, por sus siglas en inglés, *Intracellular Adhesion Molecule 1*) y la molécula de adhesión endotelial-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) las que facilitan el reclutamiento de las células inflamatorias y el depósito de lípidos en la íntima arterial (Figura 3) (Portilla et al., 2013). Posterior a estas modificaciones en el endotelio, las células del sistema inmunitario que se encuentran en el torrente sanguíneo, entran en contacto con los sitios de acumulación de ox-LDL y con otros tipos celulares, comenzando a proliferar (Douglas & Channon, 2014). Los

monocitos se diferencian a macrófagos y por medio de receptores tipo *scavenger* empiezan a fagocitar a las ox-LDL, transformándose en células espumosas que potencian la respuesta inflamatoria, llevando a la formación de estrías grasas (primera etapa del desarrollo de la PA) (Douglas & Channon, 2014).

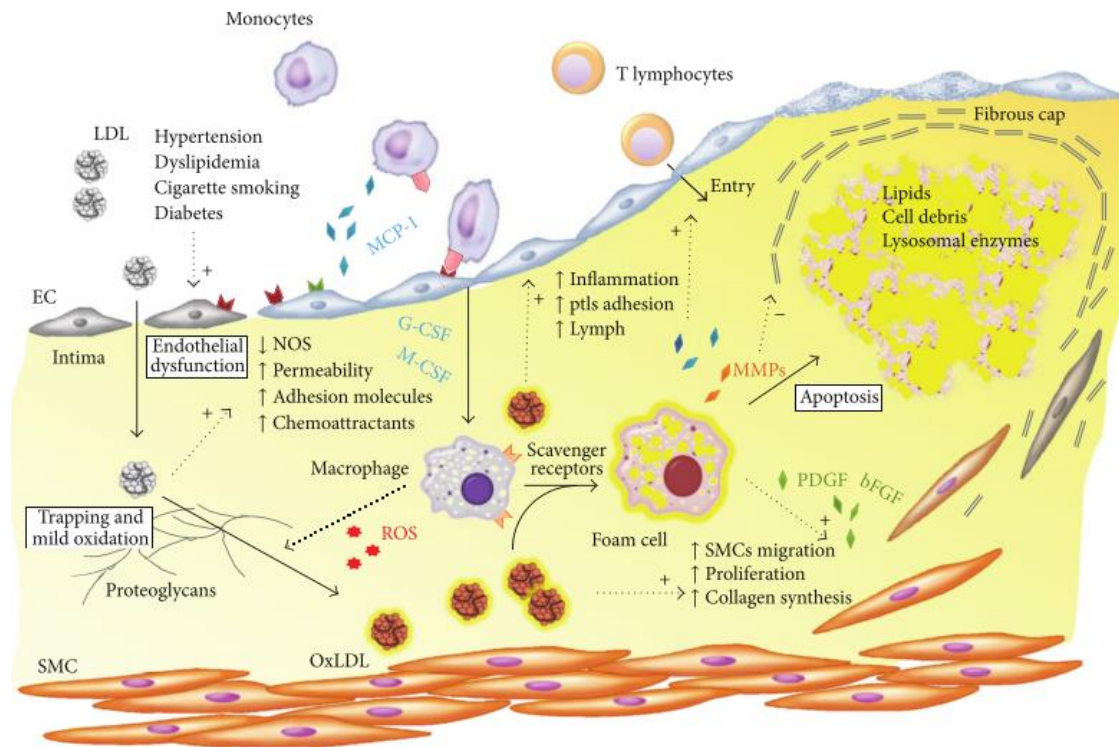


Figura 3. Fisiopatología de la aterosclerosis: participación de las ox-LDL. EC: células endoteliales; SMC: células de músculo liso vasculares; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; ROS: especies reactivas de oxígeno; ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; MMPs: metaloproteinasas de matriz; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos (Tomado de Maiolino et al., 2013).

Además de los receptores antes mencionados, existe un receptor de LDL de baja densidad oxidado de tipo lectina-1 (LOX-1) que tiene un papel crucial en la captura de ox-LDL (Sawamura et al., 2015). Este receptor se encuentra presente en las células endoteliales de las arterias coronarias, las plaquetas, los fibroblastos, las células de músculo liso vascular y los cardiomiocitos (Pothineni et al., 2017). Aunque su expresión basal es baja, bajo la presencia de pro-oxidantes, señales inflamatorias y estrés oxidante, su expresión puede aumentarse rápidamente (Guo et al., 2017). Algunos estudios han señalado que este receptor se encuentra abundantemente en la PA y se conoce que LOX-1 facilita la toma de ox-LDL por los macrófagos y monocitos, resultando en la formación de células espumosas,

además de que la activación del receptor induce un estado de estrés oxidante conduciendo a una mayor oxidación de LDL (Pothineni et al., 2017).

Posterior a la captura de las ox-LDL, dentro de la íntima arterial, la muerte de las células espumosas conduce a la formación de un núcleo lipídico necrótico, lo que promueve la activación de citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor alpha*), el interferón  $\gamma$ , e interleucinas (IL, por sus siglas en inglés, *Interleukin*) como la IL-1, IL-6 e IL-18, así como la expresión de factores de crecimiento (Portilla et al., 2013). En respuesta a este estado proinflamatorio, algunas PA acumulan células de músculo liso vasculares que migran de la capa media a la íntima arterial, lugar en el cual proliferan y sintetizan proteínas de matriz extracelular como el colágeno y la elastina. Dicha proliferación y migración contribuye al estrechamiento luminal, y a la formación de una protuberancia fibrosa cuya función es mantener la estabilidad de la placa por medio del aislamiento del núcleo lipídico del torrente sanguíneo (Figura 3) (Douglas & Channon, 2014; Seidman et al., 2014).

Al disminuir los mecanismos de mantenimiento del endotelio, ocurre el estrechamiento de la luz vascular, resultando en la producción de un flujo turbulento que conlleva al estrés del retículo endoplásmico con la consecuente disminución de la secreción de ON, e incremento de la producción de superóxido (Högström, 2017). Estos eventos fomentan la rotación de las células endoteliales, incrementan la permeabilidad y la acumulación de lípidos en el espacio sub-endotelial y favorecen el crecimiento de la PA (Seidman et al., 2014).

### **1.2.2 Disrupción de la placa: manifestaciones clínicas de la aterotrombosis**

La mayoría de las PA permanecen estables y asintomáticas, aun cuando se empieza a obstruir el flujo sanguíneo (Badimón et al., 2009). Sin embargo, como resultado de los cambios en la composición y estructura celular, las PA pueden perder estabilidad. Las PA inestables se caracterizan por tener un corazón lipídico grande y una capa fibrosa delgada que contiene una alta proporción de macrófagos y un contenido bajo en colágeno (McIntyre & Hazen, 2010). Estas características dan como resultado una debilidad mecánica, que junto con la erosión endotelial fomentan la inestabilidad de la placa (Figura 4a). Al existir erosión o ruptura de la



placa, el contenido altamente trombogénico del núcleo entra en contacto con la sangre periférica lo que conduce a la agregación plaquetaria y a la formación de trombos, lo que desemboca en la AT (Figura 4b) (Badimon et al., 2012). Es así como dependiendo de la zona en la que el trombo se localice se determinará el tipo de evento cardiovascular: sí el trombo se localiza en alguna zona del cerebro, se producirá un ACV; sí se localiza en alguna región del miocardio se presentará un Infarto agudo de miocardio, mientras que sí el trombo se presenta en las arterias coronarias la manifestación clínica será la Enfermedad arterial coronaria (Badimon et al., 2012, 2009).

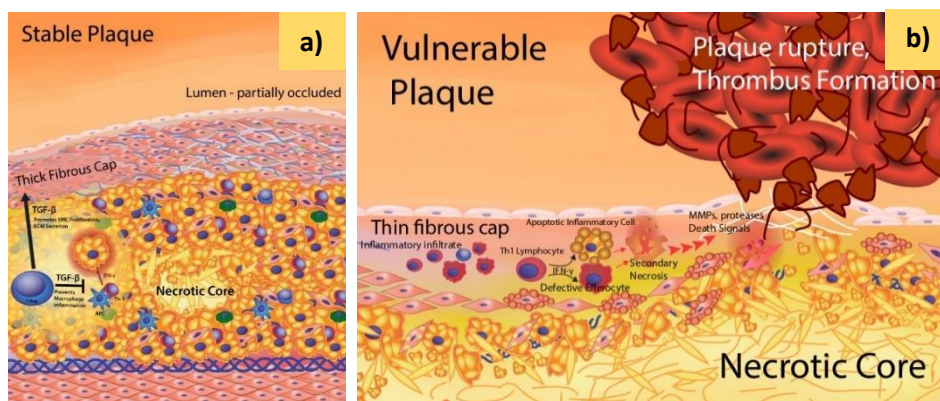


Figura 4. a) Características de la placa aterosclerótica estable (lado izquierdo). TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta. b) Ruptura de la placa y formación del trombo (lado derecho). IFN<sub>γ</sub>: interferón gamma; MMPs: metaloproteinasas de matriz (Tomado de Linton et al., 2015).

### 1.3 Factores de Riesgo

La AT es una enfermedad multifactorial y poligénica consecuencia de la interacción entre la presión ambiental, el estilo de vida y la interacción entre diferentes genes. Entre los factores que contribuyen significativamente al desarrollo de la AT se encuentran: la mala alimentación, el sedentarismo, la edad, el género, la contaminación ambiental, así como factores que subyacen a la enfermedad, destacándose las dislipidemias, la diabetes tipo 2, la obesidad, y la presión arterial elevada, entre otros (Högström, 2017).

El estudio de los factores de riesgo ha permitido establecer que los altos niveles de LDL favorecen positivamente el desarrollo de la PA, además de que la dislipidemia es una característica común en personas con alguna ECV. El término de dislipidemia se utiliza para describir un desbalance existente entre diferentes

tipos de lipoproteínas y lípidos sanguíneos (Högström, 2017). El conocimiento de la participación de los niveles de lípidos incluye también a otros componentes proteicos que se encuentran en la superficie de las lipoproteínas, conocidos como apolipoproteínas (Apo, por sus siglas en inglés, *Apolipoprotein*) (Garelnabi et al., 2013). Entre sus funciones destacan su contribución a la solubilidad de las lipoproteínas, además de que pueden actuar como ligando para algunos receptores y cofactores implicados en el metabolismo de las lipoproteínas, razón por la cual las apolipoproteínas son relacionadas con el desarrollo de distintas ECVs (Garelnabi et al., 2013). Algunas de las Apo que han sido estudiadas son la apolipoproteína 4 (APOA4) y la apolipoproteína 5 (APOA5). La APOA4 es el componente proteico principal en los quilomicrones y HDLs (Gomez et al., 2010). Estudios *in vitro* han demostrado que la APOA4 activa a las enzimas lecitina colesterol aciltransferasa, facilitando la acción de la proteína de transferencia de éster de colesterol, a la vez que modula la actividad de la lipoproteín lipasa (LPL, por sus siglas en inglés, *Lipoprotein lipase*). En conjunto, estas acciones podrían promover el transporte de colesterol desde el tejido y las células extrahepáticas hasta el hígado (Wong et al., 2007). Otros estudios han demostrado que la APOA4 posee propiedades antiaterogénicas, por lo que la sobreexpresión de esta apoproteína en ratones APOE<sup>-/-</sup> transgénicos confiere protección contra la aterosclerosis inducida por dieta, independientemente de la concentración de HDL (Gomez et al., 2010). Algunos otros autores han sugerido que la APOA4 humana inhibe de manera *in vitro* la peroxidación lipídica de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés, *Very low density lipoprotein*) por iones de Cu<sup>2+</sup> (Gomez et al., 2010). Por lo que respecta a la APOA5, diversos estudios han sugerido que reduce la concentración sérica de triglicéridos (TG) por la estimulación de la LPL y por la inhibición de la producción de VLDL-TG en hígado, además de que la APOA5 está asociada a los quilomicrones, VLDL y HDL, pero no a las LDL (Garelnabi et al., 2013). Los datos obtenidos a partir de un estudio de metaanálisis, basado en estudios prospectivos provenientes de 21 poblaciones encontró que, de manera general, la elevación de 89mg/dL en la concentración de triglicéridos estaba asociado con un incremento de 12% de riesgo cardiovascular en hombres y 37% en mujeres tras ajustar por colesterol total (CT), LDL, HDL, IMC, presión arterial y diabetes (Garelnabi et al., 2013). Esto cobra importancia debido a que la presencia

de dislipidemia es un factor de riesgo independiente de la enfermedad cardiovascular (Silva & Sanches, 2010; Garelnabi et al., 2013).

Otros factores de riesgo como la exposición a contaminantes ambientales entre los que se encuentran los solventes, los plaguicidas y el humo de cigarro, entre otros, contribuyen a la morbilidad y mortalidad mediante procesos que subyacen al desarrollo de la PA (Hatzis & Karatolios, 2016). La inhalación de contaminantes ambientales generados por la combustión como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, *por sus siglas en inglés, Poly Aromatic Hydrocarbons*) contribuyen en las distintas fases de la AT, promoviendo la inflamación y el estrés oxidante (Cosselman et al., 2015). Estudios en modelos animales han determinado que una exposición de corta duración a estos compuestos, puede incrementar la peroxidación de lípidos y la disfunción de las HDL (Cosselman et al., 2015).

Por otro lado, los metales también se han relacionado con el desarrollo de las ECVs. El arsénico (As) ha sido uno de los más estudiados en modelos animales y estudios poblacionales. Estos estudios han reportado que existe un aumento de citocinas pro-inflamatorias y marcadores de estrés oxidante por exposición a este elemento químico (Cosselman et al., 2015). Entre los posibles mecanismos de acción se incluyen, la sobrerregulación de señales de inflamación, el potenciamiento del estrés oxidante, la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), además de que se presenta una inhibición en la disponibilidad de ON (Hatzis & Karatolios, 2016). El cadmio (Cd), cuya principal fuente de exposición es el humo de tabaco, induce la disfunción endotelial y promoción de la aterosclerosis mediante mecanismos oxidativos. Estos mecanismos tienen la capacidad de desplazar al fierro y al cobre de los grupos tiol, generando ROS por reacciones de *Fenton*, lo que conlleva a la disrupción de las funciones de la barrera endotelial, la inducción de necrosis y la inhibición de sustancias vasodilatadoras (Cosselman et al., 2015).



### 1.3.1 Consumo de cigarro

Desde hace años se establecido firmemente que el tabaquismo es un importante factor de riesgo para el desarrollo de la PA, la promoción de un estado protrombótico y por ende el desarrollo de la AT (Cosselman et al., 2015). Esclarecer el papel del tabaquismo y su contribución al desarrollo de enfermedades complejas es de suma importancia, dado que el tabaco mata a más de siete millones de personas cada año; seis millones son consumidores del producto (80% de éstos viven en países con ingresos bajos a medios) mientras que el resto son no fumadores expuestos (OMS, 2017). De acuerdo con la Encuesta Nacional de Tabaquismo en Adultos del año 2015, en nuestro país el tabaquismo afecta a cerca de 17 millones de mexicanos, representando el 10% de las defunciones anuales (Secretaría de Salud, 2016).

El estudio del tabaquismo como factor de riesgo cardiovascular ha permitido determinar algunos de los mecanismos que fomentan el desarrollo de la PA. Hoy en día, se conoce que la combustión del tabaco desprende compuestos como monóxido de carbono y PAHs, que en conjunto con la nicotina, están involucrados en los mecanismos que conllevan a la disfunción endotelial (Chang et al., 2017). Estudios realizados en modelos animales, modelos *in vitro*, así como en estudios poblacionales han comprobado que el tabaco y los diferentes PAHs incrementan los niveles de algunas citocinas proinflamatorias como la proteína C reactiva (PCR), IL-6 y células polimorfonucleares, las que a su vez inducen la producción de ROS (Cosselman et al., 2015; Gordon & Flanagan, 2016; Underwood et al., 2012). Este hábito, también ha sido asociado con un aumento en los niveles de LDL en personas fumadoras en comparación con no fumadores (controles sanos), mientras que los niveles de HDL se encuentran disminuidas bajo las mismas condiciones (Gordon & Flanagan, 2016). Asimismo, algunos estudios relacionan al hábito de fumar con las dislipidemias, el aumento del espesor de la íntima media, la aterosclerosis, la disfunción endotelial, aneurismas en las paredes vasculares, la promoción de un estado protrombótico, la inflamación, la alteración del metabolismo de lípidos, la vasoconstricción e hipoxia (Berlin, et al., 2012; Li et al., 2014; Rooks et al., 2011). Se ha descrito que los componentes del humo de cigarro estimulan la Nox endotelial, disminuyendo la función mitocondrial e induciendo así el estrés

oxidativo mitocondrial. La elevada formación de  $O_2^{\cdot-}$  y  $ONOO^-$  median el daño del material genético vascular y la inflamación, acelerando el envejecimiento vascular (Sack et al., 2017).

Otro mecanismo presente en el endotelio es la disminución en la biodisponibilidad de ON por un aumento en las ROS, lo que induce un estado protrombótico así como la iniciación y progresión de la respuesta inflamatoria (Berlin, et al., 2012; Li et al., 2014; Rooks et al., 2011). La progresión de la respuesta inflamatoria puede estar mediada por el humo de tabaco, principalmente por la promoción de mecanismos inflamatorios que son importantes en el desarrollo de la aterosclerosis, siendo uno de ellos la síntesis de leucotrienos mediante la activación de la proteína activadora de la araquidonato 5 lipoxigenasa (ALOX5AP, por sus siglas en inglés, *Arachidonate 5-Lipoxygenase Activating Protein*) (Yao et al., 2014). Los leucotrienos también son mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico. En particular el leucotrieno B4 es un quimioatrayente que promueve la adhesión y diapédesis a través de la barrera endotelial, además de que induce la quimiotaxis y la proliferación celular en arterias coronarias humanas (He et al., 2014).

De acuerdo con el Departamento de Salud de Estados Unidos el riesgo de ECV en personas fumadoras es similar en ambos géneros. Sin embargo, la aparición en los hombres ocurre a edad más temprana (entre los 60-64 años,  $RR=3.9$ ,  $95\%IC=3.2-4.8$ ), mientras que en las mujeres el mayor riesgo se observa a los 64-69 años ( $RR=3.8$ ,  $95\%IC= 2.3-6.3$ ). Esta misma agencia ha reportado que los fumadores de segunda mano tienen un incremento en el riesgo de sufrir un IAM entre un 20-30% (*United States Department of Health and Human Services, 2014*). No obstante, los mecanismos a través de los cuales se llevan a cabo estos cambios fenotípicos no están del todo dilucidados, pero es posible que la formación de radicales libres, producidos por el hábito de fumar, puedan favorecer la oxidación de LDL, piedra angular en el aumento del riesgo de AT (*United States Department of Health and Human Services, 2014*).

Aunque ya se conoce que el ser fumador incrementa el riesgo de desarrollar ECV, se sugiere que los factores de riesgo antes mencionados solo explican la mitad de la variación en la enfermedad cardiovascular, razón por la cual el factor

genético debe ser considerado como la contraparte del desarrollo de la AT (Högström, 2017).

#### 1.4 Factores genéticos

Los estudios realizados en gemelos mono y dicigóticos han soportado que, aunque en las ECV la contribución ambiental y el estilo de vida tienen una participación importante, los factores genéticos contribuyen entre un 30% a un 60% (Högström, 2017). En este sentido, una de las formas más sencillas y ampliamente utilizadas para llevar a cabo asociaciones genotipo-fenotipo es mediante los Estudios de Asociación Genética mediante el estudio de las frecuencias de diversos polimorfismos genéticos (Sachidanandam et al., 2001). Un polimorfismo se define como variaciones comunes en el genoma, que están presentes en al menos el uno por ciento de la población. Estas variaciones pueden ser de diferentes tipos (Attia et al., 2009):

- Inserciones y deleciones (INDELs, por sus siglas en inglés, *Insertions and Deletions*), caracterizados por la presencia o ausencia de un segmento específico del genoma.
- Repetidas en tándem: son motivos repetidos de uno a siete nucleótidos (microsatélites), o motivos de mayor longitud (minisatélites) que se repiten de forma variable en cada individuo (decenas a cientos de veces).
- Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphisms*, por sus siglas en inglés), los cuales se refieren al cambio de una base nitrogenada por otra.

Particularmente, los polimorfismos tipo SNP, son los más comunes dentro del genoma, ya que ocurre uno cada 300 pares de bases. Algunos de estos cambios, pueden ser silentes y no producir ningún efecto en la funcionabilidad del gen o de la proteína. Por el contrario, otros SNPs pueden modificar los procesos genéticos de expresión, transcripción y de corte y empalme, lo que es dependiente de la zona en la que se localicen (región promotora, codificante, no codificante y regiones no traducidas como la 5'UTR y 3'UTR) (Attia et al., 2009; Sachidanandam et al., 2001). Este tipo de marcadores, también pueden actuar como una “bandera” para la identificación de posibles asociaciones con alguna enfermedad, en donde

los verdaderos protagonistas co-segregan con algún SNP, es decir se encuentren en desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés *Linkage Disequilibrium*) (Sachidanandam et al., 2001).

Los estudios en genes candidato, así como los de escaneo del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome Wide Association studies*), han reconocido al menos a 50 SNPs con altos niveles de significancia y una posible asociación con las ECV (Portilla et al., 2013). Algunos de estos polimorfismos han ayudado a dilucidar los posibles mecanismos genéticos que subyacen tanto a la aterosclerosis como a la AT (Tabla 1) (Högström, 2017; Portilla et al., 2014). En el año 2007, los primeros GWAS publicados para enfermedad coronaria identificaron un locus conformado por los polimorfismos rs1333040, rs2383207 y el rs10116277 ubicado en el cromosoma 9p21, el cual presentó una asociación significativa con esta enfermedad ( $p=1.80 \times 10^{-14}$ ) (Helgadottir et al., 2007). Sin embargo, la mayoría de los alelos de riesgo fueron identificados en poblaciones europeas o descendientes de las mismas, mientras que los estudios en poblaciones africanas, asiáticas, latinas y nativas americanas son limitados, aunado al hecho de que presentan diferentes distribuciones genéticas por lo que los hallazgos obtenidos en poblaciones europeas no siempre son extrapolables, mostrando resultados discrepantes entre las diversas poblaciones (Qi & Campos, 2011). Debido a lo anterior, el consorcio STREGA (por sus siglas en inglés *STrengthening the REporting of Genetic Association studies*) implementó como parte del control de calidad de este tipo de estudios, conocer la distribución de los alelos de los *loci* estudiados en la población en general mediante la adición de un control genómico (CG) (Little et al., 2009). Mediante los datos obtenidos del CG, es posible saber si en realidad existe una contribución de ciertos polimorfismos al desarrollo de una enfermedad, o bien, si los alelos de los mismos están representando la arquitectura genética propia de la población y por lo tanto reflejan sus características ancestrales y demográficas, mas no de relación entre los genes y la enfermedad (Camacho-Mejorado et al., 2015).

Aunque el estudio del componente genético en las ECV ha ido en aumento a lo largo del tiempo, hasta ahora los polimorfismos que se han asociado con las ECV y la oxidación de lípidos son solo una minoría del gran compendio de polimorfismos con los que se ha pretendido encontrar asociación (Tabla 1).

Consecuentemente, se requiere de la identificación y participación de un mayor número de polimorfismos con el fin de explicar los mecanismos que contribuyan a dilucidar su participación en el desarrollo de la enfermedad (Högström, 2017; Rui et al., 2014). Asimismo, el hecho de que las ECVs tengan un origen multifactorial y poligénico permite realizar estudios que consideren el aspecto genético en conjunto con el aspecto ambiental (Abe et al., 2015). Esta es una razón por la cual se ha tomado en cuenta la exposición al humo de tabaco como un factor de riesgo que en conjunto con el aspecto genético contribuyen al desarrollo de AT.

Si bien el estudio de genes de manera individual ha permitido esclarecer su participación en el desarrollo de distintas enfermedades, esto no aplica para las enfermedades complejas (Sheweita et al., 2011). Hoy en día es más enriquecedor realizar estudios que incluyan diferentes grupos de genes que puedan explicar ciertas características fenotípicas de una enfermedad compleja (Rui et al., 2014). Debido al carácter poligénico de las ECV, se requiere de la realización de estudios que incluyan un amplio compendio de genes, ya sea que estos se encuentren involucrados en un mecanismo fundamental para el desarrollo de la enfermedad o bien, que permitan explorar a la enfermedad desde diferentes enfoques fenotípicos (Sheweita et al., 2011). Aunado a esto, las combinaciones alélicas que se pueden dar entre los diferentes polimorfismos de estudio permiten “retratar” mejor las características poligénicas de la enfermedad (Brookes, 1999; Rui et al., 2014). Estos estudios permiten sentar las bases para un mejor entendimiento de los mecanismos de la enfermedad, ya que un solo gen difícilmente podría explicar las características tan complejas que subyacen a la AT, siendo esta una de las razones por la cual la realización de los EAG con múltiples genes en conjunto con un factor de riesgo ambiental en diferentes poblaciones es de suma importancia (Man et al., 2010).

Aunque en nuestro grupo de investigación hemos identificado variaciones alélicas en diferentes genes relacionadas significativamente con el desarrollo de ECV (Camacho-Mejorado et al., 2015; López-Salazar et al., 2017; Meraz-ríos et al., 2014), poco hemos estudiado sobre la piedra angular que conlleva al desarrollo de la AT: la oxidación de lípidos, lo que nos lleva a la realización del presente proyecto.

**Tabla 1: Polimorfismos asociados a la oxidación de lípidos**

Gen/SNP	Localización (Cromosoma)	N	Población	Genotipo/ alelo de riesgo	Medida de asociación OR (IC 95%)	Enfermedad Cardiovascular	Referencia
SOD rs4880 Ala16Val	6	164 Ca 203 Co	Tunecina	Ala vs Val/Val	1.89 (1.18-3.42) $p=0.03$	Enfermedad Arterial Coronaria	(Souiden et al., 2016)
APOA5 rs662799	11	88 Ca 503 Co	Chinos Han	G	0.78 (0,76-0.59) $p=0,04$	Infarto isquémico Hipertrigliceridemia	(Lakbakbi et al., 2015)
LOX-1 rs1050283	12	526 Ca 640 Co	Chinos Han	T	1.39 (1.15-1.66) $p=0.001$	Infarto cerebral	(Guo et al., 2017)
ALOX5AP rs4769874	13	1370 Ca 589 Co	Libanesa	A	1.53 (1.09-2.1) $p=0.01$	Enfermedad Arterial Coronaria	(Merhi et al, 2015)
P22Phox rs4673	16	143 Ca 159 Co	Iraní	CT	1.84 (1.13-3.0) $p=0.014$	Enfermedad Arterial coronaria Sustitución de una histidina por una tirosina	(Mazaheri, et al., 2017)
TOMM40 Rs2075650	19	4986 familias	Australiana	Cluster conformado por TOMM40/APOE-C1-C2-C4	Incremento en los niveles de LDL, TG, y disminución de los niveles de HDL	Dislipidemias, promoción de un estado proinflamatorio	(Middelberg et al., 2011)
		701 Ca	Caucásica	G	(-0.37mg/l (0.56-0.18mg/l) $p<0.05$	Disminución en los niveles de CRP	(Christiansen et al., 2017)

**SOD:** superóxido oxidasa; **APOA4:** apolipoproteína 4; **APOA5:** apolipoproteína 5; **LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **ALOX5AP:** proteína activadora de araquidonato 5 lipoxigenasa; **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial; **A:** adenina; **C:** citocina; **G:** guanina; **T:** timina. **A:** alanina; **V:** valina; **H:** histidina; **Y:** tirosina.

## 2. Justificación

La aterotrombosis es una enfermedad compleja, responsable de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. Esta condición multifactorial y poligénica, es subsecuente a la ruptura de la placa aterosclerótica, promoviendo la generación de trombos, así como el estrechamiento de las arterias. Las ECVs son las principales causas de muerte a nivel mundial, representando en nuestro país cerca del 77% de las muertes anuales. Al tener un origen multifactorial, tanto los factores ambientales como genéticos participan en el desarrollo de la AT. Por lo que el tabaquismo, así como diversos polimorfismos genéticos pueden contribuir en la oxidación de lípidos; un proceso clave para el desarrollo de la PA. Aunque el estudio del componente genético y el desarrollo de las ECV es amplio, muchas veces los resultados son discrepantes, razón por la cual los resultados obtenidos en otras poblaciones no pueden extrapolarse a poblaciones con una arquitectura genética compleja como lo es la mestiza mexicana. Es por esto que la identificación de diferentes polimorfismos que estén relacionados en este proceso de oxidación de lípidos aunado al factor ambiental como lo es el tabaquismo, permitiría conocer si en estos factores confieren un mayor riesgo para el desarrollo de la AT en nuestra población.

## 3. Hipótesis

La contribución de alelos y genotipos de riesgo en *loci* relacionados con la oxidación de lípidos, así como el consumo de cigarro, se asocian con la presencia de aterotrombosis en la población mestiza mexicana.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Determinar la asociación entre el hábito de fumar y algunos polimorfismos genéticos involucrados en la oxidación de lípidos con la presencia de aterotrombosis en la población mestiza mexicana del centro del país.

## 4.2 Objetivos particulares

- Determinar la asociación entre la historia de tabaquismo y la presencia de aterotrombosis.
- Determinar las frecuencias de distribución alélicas y genotípicas en una muestra de sujetos con y sin aterotrombosis, así como un control genómico de los polimorfismos, *SOD*-rs4880, *APOA4*-rs5104, *APOA5*-rs662799, *LOX-1*-rs1050283, *ALOX5AP*-rs4769874, y *P22phox*-rs4673, *TOMM40*-rs2075650.
- Determinar la asociación entre los polimorfismos genéticos asociados a la oxidación de lípidos y la presencia de aterotrombosis.
- Evaluar la posible interacción entre los polimorfismos genéticos asociados a la oxidación de lípidos y la historia de tabaquismo sobre la presencia de aterotrombosis.



## 5. Método

### 5.1 Diseño del estudio

El presente estudio es un estudio transversal analizado como casos y controles. La información utilizada fue recolectada en los años 2014 y 2015 como parte del estudio original que llevó por nombre “Asociación de genes mediadores de la inflamación y de estrés oxidante con aterotrombosis en población mestiza mexicana”. Este estudio estuvo conformado por hombres y mujeres con una edad mínima de 11 años y una edad máxima de 89 años pertenecientes a la etnia mestiza mexicana, que acudieron a la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Instituto Mexicano del Seguro Social para un estudio de trombofilia.

#### 5.1.1 Definición de los grupos de estudio

La muestra estuvo integrada por 708 individuos (hombres y mujeres) Mestizos Mexicanos no relacionados entre sí. Estos individuos se dividieron en tres diferentes grupos que se describen en seguida. El tamaño de la muestra se determinó utilizando una calculadora *online* para obtener el tamaño de muestra (<http://med.unne.edu.ar/biblioteca/calculos/calculadora.htm>). Los criterios considerados fueron: un porcentaje de error del 5% y un nivel de confianza del 95%.

El grupo de casos (con presencia de la enfermedad) estuvo integrado por 204 individuos (102 hombres y 102 mujeres) los cuales fueron clasificados en este grupo de acuerdo con sus antecedentes patológicos de infarto agudo de miocardio (52%) diagnosticado mediante ecocardiograma, electrocardiograma, enzimas en suero y/o intervención coronaria; o infarto cerebral (48%) diagnosticado por tomografía axial computarizada o métodos de resonancia magnética.

El grupo de controles estuvo conformado por 204 individuos (sin presencia de la enfermedad) de los que se contaba con historia clínica con ausencia de las enfermedades definitorias de AT, pero que también acudieron al estudio de trombofilia. Cada control fue seleccionado de acuerdo a un caso del mismo género y edad.

Debido a que la población mexicana se encuentra sub-estructurada, con la finalidad de evitar asociaciones espurias, se incluyó un control genómico, el cual estuvo integrado por 300 individuos (150 hombres y 150 mujeres) que acudieron al laboratorio BIMODI (Biología Molecular Diagnóstica), de la Ciudad de Querétaro, Qro. México, para la determinación de parentesco mediante huella digital de DNA. Estos individuos fueron aleatoriamente seleccionados de un estudio que incluyó a 1,640 Mestizos Mexicanos, no relacionados entre sí, provenientes del Valle Central de México (Guanajuato, Querétaro, Puebla y Ciudad de México) con al menos tres generaciones de ancestros nacidos en el país, apellidos derivados del español y que se reconocieran así mismos como mestizos.

**Criterios de inclusión.** Para el grupo de casos fueron que los individuos hubieran sufrido infarto agudo de miocardio y/o infarto cerebral antes de los 45 años. También se consideró que el individuo no estuviera bajo tratamiento con medicamentos hipoglicemiantes, anticoagulantes o estatinas. Los criterios para el grupo de controles fueron que se contara con historia clínica sin diagnóstico de infarto agudo al miocardio o infarto cerebral. Para estos dos grupos se contó con toda la información relacionada a los factores de riesgo clásicos para AT como diabetes mellitus tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensión arterial sistémica, índice de masa corporal, uso de hormonas y antecedentes heredofamiliares de ECV's. Esta información se obtuvo de las historias clínicas de los individuos. Para los tres grupos de estudio, un criterio de inclusión fue que los individuos pertenecieran a la etnia mestiza mexicana la que fue definida por apellidos derivados del español con al menos tres generaciones de ancestros nacidos en México y que no estuvieran relacionados entre sí.

**Criterios de eliminación.** Muestras en las que no se pudo llevar a cabo el 100% de los análisis moleculares requeridos para esta investigación.

#### 5.1.2 Entrevista realizada a los participantes del estudio

Mediante la aplicación de un cuestionario estructurado se obtuvieron los datos acerca del consumo de cigarro, consumo de alcohol, la dieta, el consumo de drogas estimulantes o depresivas, la edad, el género, el lugar de procedencia (padres y abuelos), la actividad física, la ocupación y el nivel socioeconómico. También se preguntó acerca de los antecedentes personales de enfermedades

crónicas, así como los antecedentes familiares de AT y en el caso de las mujeres si consumían hormonas.

### 5.1.3 Descripción de las variables

- **Independientes:** polimorfismos genéticos y el hábito de fumar.
- **Dependientes:** Aterotrombosis, que se manifestó como infarto agudo al miocardio y/o infarto cerebral.

**Variables confusoras:** Diabetes tipo 2, hipercolesterolemia, índice de masa corporal (IMC), hipertensión, género, edad, actividad física, dieta, historia familiar de enfermedad cardiovascular, consumo de drogas y alcohol, y consumo de anticonceptivos orales u hormonales.

**Variables de control:** Todas aquéllas relacionadas con los controles de calidad de la técnica bajo los protocolos estandarizados y sugeridos por la casa comercial.

### 5.1.4 Descripción operacional de las variables

Los **polimorfismos genéticos** son un cambio en la secuencia del genoma, los cuales se presentan en al menos el 1% de la población. Particularmente los **polimorfismos de un solo nucleótido**, conocidos como tipo SNP, son el cambio de una base nitrogenada por otra, cuyos efectos pueden verse reflejados, en la síntesis de un aminoácido o en la función de una proteína (Attia et al., 2009). Estos polimorfismos fueron evaluados en una escala cuantitativa nominal por el tipo de cambio alélico.

**Infarto agudo de miocardio.** Su causa principal es la necrosis de las células del miocardio como consecuencia de una isquemia prolongada producida por la reducción súbita de la irrigación sanguínea coronaria, que compromete una o más zonas del miocardio. Es una entidad clínica caracterizada por un cuadro clínico específico y confirmado mediante estudio de enzimas cardíacas, electrocardiografía, angiografía (Sociedad Española de Cardiología, 2010). Se evaluó mediante escala cualitativa nominal: sí, no.

**Infarto cerebral o accidente cerebrovascular.** Su causa principal es la falta de irrigación de sangre a cualquier parte del cerebro, lo cual provoca isquemia y en

última instancia infarto. El diagnóstico exige la realización de un dúplex/Doppler y/o estudio angiográfico para detectar lesiones en la pared arterial (estenosis y oclusión), particularmente en los vasos grandes (Texas Heart Institute, 2016). Se evaluó mediante escala cualitativa nominal: sí, no.

**Tabaquismo.** Es definido como una enfermedad adictiva crónica que evoluciona con recaídas. Se define como fumador a la persona que ha fumado por lo menos un cigarrillo en los últimos seis meses. Los fumadores pueden clasificarse como: fumador diario, fumador ocasional, fumador pasivo, ex fumador y no fumador (OPS & OMS, 2015).

En el presente estudio la información de consumo de tabaco se obtuvo mediante la aplicación de un cuestionario el cual partía de la pregunta ¿Usted fuma? y por medio de las preguntas subsecuentes se obtuvieron los datos de la duración, el número de cigarrillos que la persona fumaba por día, así como si era fumador actual o exfumador. Una vez que se obtuvieron estos datos para realizar el análisis del consumo de cigarro, se clasificó a los individuos en tres categorías:

- Nunca fumador: aquellos individuos que durante la entrevista refirieron no haber fumado en ningún momento de la vida.
- Fumador actual: aquellos individuos que el día de la aplicación del cuestionario eran fumadores.
- Exfumador: aquellos individuos que fueron fumadores, pero al momento de la entrevista ya no fumaban.

Asimismo, se evaluó la intensidad del consumo mediante el índice tabáquico el cual se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Número de cigarrillos fumados al día}] \times [\text{Años durante los cuales se ha fumado}]}{20}$$

Una vez que se conoció este valor, los individuos se clasificaron de la siguiente manera:

- Nunca: aquellos individuos que durante la entrevista refirieron no haber fumado en algún momento de la vida.
- Menos de dos paquetes por año: aquellos individuos que al momento de la entrevista refirieron consumir o haber consumido menos de dos paquetes de

cigarros o dos paquetes por año, es decir, entre 0.1 cigarrillos hasta 40 cigarrillos.

- Más de dos paquetes por año: aquellos individuos que al momento de la entrevista refirieron consumir o haber consumido más de dos paquetes de cigarros por año, es decir, una cantidad mayor de 40 cigarrillos.

El consumo de alcohol se evaluó partiendo de la pregunta ¿Usted ingiere o ingirió de manera habitual algún tipo de bebida alcohólica? La información obtenida con las preguntas subsecuentes nos permitió conocer los gramos de alcohol consumidos por semana. Una vez que se obtuvieron estos datos se clasificaron en las siguientes categorías:

- No toma: aquellos individuos que en el momento de la entrevista refirieron no haber tomado alcohol a lo largo de su vida.
- Consumo menor a 200gr/semana: aquellos individuos cuyo consumo de alcohol fue menor a 200gr/semana.
- Consumo mayor a 200gr/semana: aquellos individuos que consumieron más de esta cantidad.

El consumo de drogas fue evaluado mediante un cuestionario de adicciones y drogas ilegales. Mientras que para evaluar la dieta de la persona se aplicó un cuestionario de 24 horas con el menú representativo del día anterior. Para el cálculo de las kcal consumidas se utilizó una hoja de cálculo de Excel que contenía los alimentos presentes en el Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes tercera edición. En el caso de la actividad física, se aplicó el cuestionario Mundial sobre actividad física de la OMS. El cálculo del gasto energético por actividad física se calculó con la unidad metabólica llamada MET.

La información de los factores de riesgo clásicos para AT se obtuvo de las historias clínicas de los individuos. El diagnóstico de estos factores de riesgo se realizó con los siguientes criterios:

- Diabetes mellitus tipo 2: HbA1c >6.5% o glucosa sérica >126 mg/dl.
- Hipercolesterolemia: colesterol >200 mg/dl o LDL >135 mg/dl o HDL <45 mg/dl.
- Hipertensión arterial sistémica: presión sistólica >140 mm Hg o presión diastólica >90 mm Hg.

- Índice de masa corporal: <18.5 Kg/m<sup>2</sup>: bajo peso; 18.5-24.9 Kg/m<sup>2</sup>: peso normal; 25.0-29.9 Kg/m<sup>2</sup>: sobrepeso y >30 Kg/m<sup>2</sup>: obesidad.

## 5.2 Estrategia experimental

### 5.2.1 Análisis molecular

#### 5.2.1.1 Procedimiento.

**Extracción del material genético.** El material genético fue obtenido a partir de 10mL de sangre periférica, centrifugados a 6,000 g por 15 min para obtener el paquete leucocitario. El aislamiento del material genético se llevó a cabo mediante métodos salinos empleando un *kit* comercial (Jena Biosciences, Jena, Thüringen, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este material fue cuantificado a las densidades ópticas de 260 y 280nm, así como mediante la relación 260/280 para la determinación de la pureza, empleando un equipo *Thermo Scientific NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, empleando un intercalante fluorescente (MIDORI<sup>Green</sup> Advance DNA Stain, Nippon Genetics, Japón) para ser visualizado mediante un transiluminador ultravioleta a 312 nm (Spectroline ® modelo TM-312, Spectroline Estados Unidos).

#### **Técnica: Análisis molecular por qPCR**

Se analizaron siete marcadores tipo SNP (Tabla 2), con el método de discriminación alélica mediante el uso de sondas Taqman siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, Estados Unidos), utilizando un termociclador de tiempo real C1000 Touch (Bio-Rad, Richmond, CA, Estados Unidos).

**Tabla 2. Características generales de los marcadores tipo SNP analizados**

Gen	Marcador	Localización en el genoma	Cambio de base	Región	MAF
SOD	rs4880	Cromosoma 6	A > <b>G</b>	5'UTR	0.41
APOA4	rs5104	Cromosoma 11	<b>C</b> > T	Intrón	0.24
APOA5	rs662799	Cromosoma 11	<b>G</b> > A	Intrón	0.16
LOX-1	rs1050283	Cromosoma 12	<b>A</b> > G	3'UTR	0.32
ALOX5AP	rs4769874	Cromosoma 13	<b>G</b> > A	Intrón	0.07
NADPH (p22phox)	rs4673	Cromosoma 16	<b>A</b> > G	<i>Missense mutation</i>	0.34
TOMM 40	rs2075650	Cromosoma 19	<b>A</b> > G	Intrón	0.12

**SOD:** superóxido oxidasa; **APOA4:** apolipoproteína 4; **APOA5:** apolipoproteína 5; **LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **ALOX5AP:** proteína activadora de araquidonato 5 lipoxigenasa; **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial; **A:** adenina; **C:** citocina; **G:** guanina; **T:** timina. **A:** alanina; **V:** valina; **H:** histidina; **Y:** tirosina. **MAF:** frecuencia del alelo menor. Los alelos en negritas representan el alelo de riesgo para cada polimorfismo.

### Principio de la técnica

El ensayo TaqMan utiliza sondas complementarias al sitio polimórfico de interés, las sondas están marcadas con fluorocromos en el extremo 5' (VIC o FAM), que al estar unidos a un cebador en el extremo 3' generan un fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés *Fluorescence Resonance Energy transfer*), lo que impide la emisión de fluorescencia. La Técnica de TaqMan se basa en la actividad de la 5' exonucleasa de la *Taq* polimerasa para escindir las sondas hibridadas a la secuencia diana (Tamay de Dios, et al., 2013).

La genotipificación de las muestras se realizó de acuerdo con las condiciones descritas en las tablas 3 y 4. Primeramente se preparó la solución de la reacción para la amplificación de la qPCR (Tabla 3). Posteriormente en una placa de 96 pozos se repartieron 3 µL de la solución inicial para posteriormente agregar los 3 µL de DNA correspondiente a cada individuo en cada pozo.

Control de calidad: la genotipificación se llevó a cabo por duplicado, colocando un control negativo para determinar si hubo contaminación, así como muestras de genotipos conocidos.

**Tabla 3. Condiciones de reacción para la realización de qPCR por sondas *TaqMan*®**

Reactivos	Concentración de los reactivos	Volumen de reacción por muestra
Máster Mix	2x	2.5 µL
Sonda TaqMan	20x	0.25 µL
Agua	-	0.25 µL
DNA	7-10 ng/µL	3 ng/µL
Volumen final		6 µL

**Tabla 4. Condiciones de amplificación para la genotipificación de los polimorfismos estudiados**

SNP	Condiciones PCR	Temp °C	Tiempo	Ciclos
SOD2-rs4880	Desnaturalización	95	10 min	50
	Alineamiento	95	20 seg	
	Extensión	60	2 min	
APOA4-rs5104 APOA5- rs662799	Desnaturalización	95	10 min	50
	Alineamiento	95	15 seg	
	Extensión	60	1:30 min	
LOX-1 rs1050283 ALOX5AP- rs4769874	Desnaturalización	95	10 min	50
	Alineamiento	95	15 seg	
	Extensión	60	2 min	
P22phox-rs4673	Desnaturalización	95	10 min	55
	Alineamiento	95	15 seg	
	Extensión	60	2 min	
TOMM40- rs2075056	Desnaturalización	95	10 min	50
	Alineamiento	95	15 seg	
	Extensión	62	1:30 min	

**SOD:** superóxido oxidasa; **APOA4:** apolipoproteína 4; **APOA5:** apolipoproteína 5; **LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **ALOX5AP:** proteína activadora de araquidonato 5 lipoxigenasa; **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial



## 5.3 Análisis de datos

### 5.3.1 Análisis genético: parámetros genéticos poblacionales

Las frecuencias alélicas y genotípicas, así como el LD entre los diferentes *loci* fueron estimadas utilizando los programas Powerstats v.12, GenAlex v6.502 (Peakall & Smouse, 2012), Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), y Haploview (Barret et al., 2005). Para el análisis de estructuración genética se utilizó el software Structure v.2.3.4 (Pritchard, Wen, & Falush, 2010) empleando 10,000 simulaciones de burnin y 100,000 repeticiones de la cadena de Markov para el after burnin. El equilibrio con respecto a la ecuación de Hardy-Weinberg se obtuvo mediante el estadístico de  $F$  de Weir & Cockerham con el programa Genètx v4.05.2 (Belkhir, et al., 2004). Se consideró que la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg cuando la  $p$  de significancia fue menor a 0.007, de acuerdo con la prueba *posthoc* de Bonferroni. Los análisis de escalamiento multidimensional (MDS, por sus siglas en inglés, *Multidimensional Scaling*), se realizaron determinando la distancia genética y graficándola mediante los programas GenAlex v6.502 y SPSS v.23, respectivamente.

### 5.3.2 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias de frecuencia (alelos y genotipos) entre los grupos estudiados se construyó una tabla de contingencia de 2x2 para cada variante genética. El análisis de los datos categóricos se llevó a cabo mediante la prueba de  $\chi^2$  ( $x^2$ ) y para datos continuos la prueba de T- de student.

La estimación de la asociación de los factores de riesgo clásicos con la presencia de AT se realizó mediante modelos de regresión logística ajustados por índice tabáquico. Para la evaluación del consumo de cigarro se realizaron modelos de regresión logística ajustados por edad, género, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, consumo de alcohol, la actividad física, la ingesta calórica, la ingesta de colesterol y el índice de masa corporal. La categoría de referencia fue el grupo de los no fumadores. También se realizó un análisis de regresión logística estratificado por sexo

Para evaluar la asociación entre el índice tabáquico y la presencia del evento aterotrombótico de acuerdo al antecedente familiar de ECV, se realizó un modelo de regresión logística ajustado por edad, género, consumo de alcohol, actividad física, ingesta calórica, ingesta de colesterol, índice de masa corporal e hipertensión arterial. En ambos análisis se incluyó el valor de la  $p$  de tendencia.

Para el análisis de asociación con los polimorfismos genéticos, se realizaron regresiones logísticas en las que se consideraron modelos de herencia codominante, dominante y recesivo. En el caso de modelo codominante se consideró al genotipo GG como categoría de referencia. Este mismo genotipo fue considerado como de referencia para el modelo dominante conformado por los genotipos AG+AA. Por otra parte para el modelo recesivo fueron los genotipos GG+AG los que se utilizaron como referencia. Estos tres modelos fueron ajustados por las variables de edad, género, antecedentes familiares de ECV e índice tabáquico. También se calculó la  $p$  de tendencia y el índice tabáquico ajustado por el modelo de herencia recesivo. El software utilizado para dichos análisis estadísticos fue STATA versión 12.0 (Stata Corp, College Station, TX, Estados Unidos).

### 5.3.3 Comparaciones con otras poblaciones

Con la intención de comparar las frecuencias genéticas obtenidas con otras poblaciones, se recolectó información genotípica del catálogo de variantes genéticas de los 1,000 genomas (<http://www.internationalgenome.org>, Tabla 5).

**Tabla 5. Comparación con otras poblaciones del mundo**

Población	N
<b>AMR</b>	347
<b>CLM</b>	94
<b>PER</b>	85
<b>PUR</b>	104
<b>MXL</b>	64
<b>AFR</b>	661
<b>EAS</b>	504
<b>EUR</b>	503

Fuente:[http://phase3browser.1000genomes.org/Homo\\_sapiens/Search/Results?site=ensembl&q=2075650](http://phase3browser.1000genomes.org/Homo_sapiens/Search/Results?site=ensembl&q=2075650). AMR: americanos; CLM; colombianos residentes de Medellín; PER: peruanos residentes de Lima; PUR: puertorriqueños residentes de Puerto Rico; MXL: mexicanos residentes de los Ángeles; AFR: africanos; EAS: asiáticos del este; EUR: europeos. poner aquí el significado de las siglas y en la tabla solo dejar las siglas.

#### **5.4 Consideraciones éticas**

Cada individuo perteneciente al estudio firmó una carta de consentimiento informado avalado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS R-2015-3609-20), así como por el comité de ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV, IPN), ambos en la Ciudad de México.

## 6. Resultados

En la Tabla 6 se muestran las características generales de la población de estudio. Debido que se consideró que los participantes tuvieran edades similares, no se observaron diferencias significativas entre la proporción de mujeres y hombres, ni tampoco en el promedio de la edad ( $47.5 \pm 14.5$  vs  $48 \pm 16.6$  años) entre los sujetos con y sin AT. La actividad física (MET-min/sem), la ingesta calórica (kcal/día), la ingesta de colesterol (mg/d), el consumo de hormonas en el caso de las mujeres, el IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) y el antecedente personal de diabetes no mostraron diferencias estadísticas entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ). Al evaluar el hábito tabáquico se encontró que las condiciones de fumador (no fumador, fumador actual y exfumador) fueron estadísticamente diferentes entre los grupos de estudio. De manera contraria, al evaluar la intensidad del consumo mediante el índice tabáquico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con y sin aterotrombosis. Por lo que respecta al consumo de alcohol, dividido para su análisis en tres diferentes puntos de corte, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas, además de que la media de consumo fue mayor en los individuos con evento aterotrombótico ( $p = 0.01$ ). En cuanto a los antecedentes personales de enfermedades crónicas, la hipertensión y la hipercolesterolemia, así como los antecedentes familiares de ECV mostraron ser estadísticamente diferentes entre los grupos de estudio.

En la tabla 7 se muestra la asociación entre las variables seleccionadas y la presencia de AT en toda la población y de acuerdo a hombres y mujeres. Los exfumadores (RM =2.69, IC<sub>95%</sub>= 1.59-4.56) y aquellos sujetos que a lo largo de la vida consumieron un mayor número de cigarrillos (RM =2.64, IC<sub>95%</sub>= 1.46-4.77;  $p$  de tendencia <0.01) presentaron casi 3 veces más posibilidades de tener un evento aterotrombótico y esta asociación fue principalmente entre los hombres y no en las mujeres. Situación similar ocurrió con el antecedente de hipercolesterolemia, donde en los hombres se asoció con casi 10 veces más posibilidades de AT. En contraste, el antecedente familiar de ECV, se asoció con más posibilidad de AT tanto en hombres (RM =4.49, IC<sub>95%</sub>= 2.02-9.97) como en mujeres (RM =3.49, IC<sub>95%</sub>= 1.81-6.73).

Al evaluar la asociación entre hábito tabáquico y AT de acuerdo a la presencia o no de los antecedentes heredofamiliares de ECV (Tabla 8), observamos que la asociación se mantiene sólo entre los sujetos sin antecedente familiar de ECV. En estos sujetos un mayor consumo de paquetes de cigarrillos/año se asoció con un incremento de 4 veces más posibilidades de tener un evento AT (p de tendencia  $<0.01$ ).

**Tabla 6. Características generales de los grupos de estudio**

Característica	Evento Aterotrombótico <sup>1</sup>		*Valor de p
	Si n = 204	No n = 204	
Edad (años)			
Media ± DE	47.5 ± 14.5	48 ± 16.6	0.76
Sexo (%)			
Mujeres vs. Hombres	50	50	1.0
Hábito tabáquico (%)			
Condición de fumador			
Nunca fumador (%)	92 (45)	120 (59)	<b>&lt;0.01</b>
Fumador actual (%)	19 (9)	30 (15)	
Exfumador (%)	93 (46)	54 (26)	
Índice tabáquico (paq/año)**			
Media ± DE	10.5 ± 15.07	7.82 ± 13.2	0.10
Consumo de Alcohol (%)			
No toma alcohol	92 (45)	80 (39.22)	<b>0.01</b>
≤20 g/ sem	38 (18.63)	64 (31.37)	
≥20 g/ sem	74 (36.27)	60 (29.41)	
Media ± DE (g/sem)***	54.92±11.34	30.68 ± 4.34	<b>0.01</b>
Actividad Física (MET-min/sem)			
Mediana (P <sub>25</sub> - P <sub>75</sub> )	960 (300-2160)	960 (0-3360)	0.70
Ingesta calórica (Kcal/d)			
Mediana P <sub>25</sub> - P <sub>75</sub>	1722.3 (1438-2064.87)	1615.5 (1404-1933)	0.07
Ingesta de Colesterol total (mg/d)			
Media ± DE	244.33 ± 14.48	256.56 ± 13.15	0.53
Índice de Masa Corporal			
Media ± DE	26.6 ± 0.31	27.15 ± 0.35	0.22
Antc. Personales de enfermedades Crónicas (% Si)			
Hipertensión	57 (27.9)	36 (17)	<b>0.01</b>
Hipercolesterolemia	41 (20)	13 (6.4)	<b>&lt;0.01</b>
Diabetes	27 (13.2)	21 (10.3)	0.36
Antecedentes familiares de ECV (% Si)	112 (54.9)	56 (27.4)	<b>&lt;0.01</b>

\* t-test, chi-2, o U-Mann Whitney.

\*\* : Sólo fumadores

\*\* : Solo entre consumidores de alcohol

ECV: Enfermedad Cardiovascular

**Tabla 7. Características asociadas con Aterotrombosis en la población de estudio y de acuerdo al sexo**

Características	Todos		Hombres				Mujeres				
			Evento trombótico		RM <sup>1</sup>	IC95%	Evento trombótico		RM <sup>1</sup>	IC95%	
	RM <sup>1</sup>	IC 95%	Si	No			Si	No			
Condición de fumador											
Nunca fumador	1.0	-	34	52	1.0	-	58	68	1.0	-	
Fumador actual	0.92	0.43-1.97	11	22	0.69	0.21-2.19	8	8	1.47	0.44-5.94	
Exfumador	<b>2.69</b>	<b>1.59-4.56</b>	57	28	<b>4.00</b>	<b>1.66-9.66</b>	36	26	1.77	0.86-3.68	
Índice tabáquico											
Nunca	1.0	-	34	52	1.0	-	60	69	1.0	-	
≤ 2 paquetes/año	1.43	0.78-2.62	24	27	1.87	0.74-4.76	16	15	1.24	0.50-3.06	
≥ 2 paquetes/año	<b>2.64</b>	<b>1.46-4.77</b>	44	23	<b>3.17</b>	<b>1.19-8.49</b>	26	18	1.99	0.87-4.58	
<i>Valor de p de tendencia</i>		<i>&lt;0.01</i>				<i>0.02</i>				<i>0.11</i>	
Hipercolesterolemia <sup>2</sup>											
Si vs No	<b>2.91</b>	<b>1.42-5.99</b>	22	2	<b>9.85</b>	<b>1.94-50.02</b>	19	11	1.91	0.77-4.72	
Hipertensión arterial <sup>2</sup>											
Si vs No	1.41	0.78-2.56	33	11	<b>2.86</b>	<b>1.06-7.68</b>	24	25	0.73	0.32-1.64	
Antecedentes familiares de ECV <sup>2</sup>											
Si vs. No	<b>3.15</b>	<b>1.97-5.02</b>	49	21	<b>4.49</b>	<b>2.02-9.97</b>	63	35	<b>3.49</b>	<b>1.81-6.73</b>	

1 modelo ajustado por edad, género, por las variables incluidas en la tabla, además de consumo de alcohol, actividad física, ingesta calórica, ingesta de colesterol, e índice de masa corporal.

2 modelo ajustado por índice tabáquico

Los valores en negrillas corresponden a aquellos que fueron estadísticamente significativas con un valor de p<0.05.

ECV: Enfermedad Cardiovascular

**Tabla 8. Asociación entre índice tabáquico y la presencia de evento aterotrombótico, de acuerdo al antecedente familiar de enfermedad cardiovascular**

Características	Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular							
	Si				No			
	Evento aterotrombótico		RM <sup>1</sup>	IC95 %	Evento aterotrombótico		RM <sup>1</sup>	IC95 %
	Si	No			Si	No		
Índice tabáquico								
Nunca	54	29	1.0	-	40	92	1.0	-
≤ 2 Paquetes/año	19	12	0.71	0.26-1.93	21	30	<b>2.43</b>	<b>1.06-5.56</b>
≥ 2 paquetes/año	39	15	1.41	0.56-3.52	31	26	<b>4.42</b>	<b>1.92-10.16</b>
<i>p de prueba de tendencia</i>				0.48				<b>&lt;0.01</b>

<sup>1</sup> modelo ajustado por: edad, género, consumo de alcohol, actividad física, ingesta calórica, ingesta de colesterol, Índice de Masa Corporal, hipertensión arterial, diabetes e hipercolesterolemia.

Los valores en negrillas corresponden a aquellos que fueron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .



### **Asociación entre las características genéticas y el desarrollo de la AT.**

Las frecuencias alélicas y genotípicas de cada grupo se resumen en la Tabla 9. De manera general, los marcadores evaluados muestran frecuencias alélicas y genotípicas similares entre los grupos de estudio. Sin embargo, de los siete polimorfismos evaluados, *APOA4* y *P22-Phox* mostraron un importante exceso de individuos homocigotos en el grupo de casos. Interesantemente, *P22Phox-rs4673* mostró una mayor frecuencia del genotipo AA en este grupo, siendo inclusive mayor a la encontrada en el CG. Respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, *P22Phox-rs4673* fue el único marcador que se encontró en desequilibrio mostrando un exceso de individuos homocigotos en el grupo de casos ( $F_{IS}= 0.13$ ,  $p=0.04$ ).

Una vez que se conocieron estas frecuencias, se buscó alguna posible asociación entre los polimorfismos y el desarrollo de AT. Este análisis de asociación mostró que los portadores del genotipo AA en el marcador rs4673 en el gen de P22-phox tienen más posibilidades de tener AT en comparación con los portadores del genotipo GG, y esto es independientemente de la edad, el género, consumo de tabaco y antecedentes familiares de ECV (RM=2.25, 95% IC =0.86-5.90,  $p=0.08$ ); esta asociación resultó marginal. Al realizar el modelo de asociación recesivo (GG+AG vs AA), la probabilidad encontrada fue de 2.56 veces más, mostrando nuevamente una asociación marginal ( $p=0.05$ ) (Tabla 10), sugiriendo una posible contribución de este *loci* en el desarrollo de la enfermedad. Así mismo, en esta misma tabla se puede observar que el incremento en las posibilidades de tener este tipo de evento vascular asociado al consumo de tabaco se mantiene significativo, independientemente del polimorfismo.

**Tabla 9. Frecuencias genéticas y estadística descriptiva**

<b>Poblaciones/SNPs</b>	<b>Frecuencias alélicas</b>		<b>Frecuencias genotípicas</b>			<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>F<sub>IS</sub></b>	<b>HWE (p)</b>
<b>SOD2-rs4880</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.35	0.65	0.12 (25)	0.45 (92)	0.43 (87)	0.45	0.45	0.008	0.51
Controles	0.40	0.60	0.17 (35)	0.45 (92)	0.38 (77)	0.45	0.48	0.06	0.24
Control genómico	0.37	0.6	0.16 (49)	0.41 (124)	0.42 (127)	0.41	0.47	0.12	0.03
<b>APOA4-rs5104</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>TT</b>	<b>TC</b>	<b>CC</b>				
Casos	0.79	0.21	0.65 (133)	0.29 (59)	0.06 (12)	0.29	0.32	0.10	0.11
Controles	0.79	0.21	0.63 (129)	0.32 (65)	0.05 (10)	0.32	0.33	0.04	0.37
Control genómico	0.77	0.23	0.59 (234)	0.37 (148)	0.05 (18)	0.37	0.35	-0.04	0.85
<b>APOA5-662799</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.84	0.16	0.71 (145)	0.26 (53)	0.03 (6)	0.27	0.27	0.03	0.43
Controles	0.83	0.17	0.69 (141)	0.27 (55)	0.04 (8)	0.27	0.29	0.06	0.24
Control genómico	0.81	0.19	0.66 (264)	0.29 (116)	0.05 (20)	0.28	0.31	0.09	0.05
<b>LOX-1-rs1050283</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.50	0.50	0.24 (50)	0.50 (102)	0.25 (52)	0.50	0.50	0.002	0.54
Controles	0.49	0.51	0.25 (51)	0.47 (97)	0.27 (56)	0.47	0.50	0.05	0.28
Control genómico	0.51	0.48	0.27 (82)	0.48 (145)	0.24 (73)	0.48	0.50	0.03	0.32

**SNP:** polimorfismos de un solo nucleótido; **Ho:** heterocigosidad observada; **He:** heterocigosidad esperada; **Fis:** Índice de homocigosidad; **SOD:** superóxido oxidasa; **APOA4:** apolipoproteína 4; **APOA5:** apolipoproteína 5; **LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **ALOX5AP:** proteína activadora de araquidonato 5 lipoxigenasa; **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial; **A:** adenina; **C:** citocina; **G:** guanina; **T:** timina. **A:** alanina; **V:** valina; **H:** histidina; **Y:** tirosina. **HWE:** *Hardy-Weinberg Expectation*.

Tabla 9. Frecuencias genéticas y estadística descriptiva (Continuación)

<b>ALOX5AP- rs4769874</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.03	0.97	0.00	0.06 (12)	0.94 (192)	0.06	0.06	-0.03	1
Controles	0.06	0.94	0.00	0.11 (23)	0.89 (181)	0.11	0.11	-0.06	1
Control genómico	0.04	0.96	0.003 (1)	0.07 (21)	0.93 (278)	0.07	0.07	0.05	0.36
<b>P22PHOX-rs4673</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.23	0.76	0.08 (16)	0.31 (64)	0.61 (124)	0.31	0.36	0.13	<b>0.04</b>
Controles	0.23	0.77	0.03 (7)	0.39 (80)	0.57 (117)	0.39	0.35	-0.10	0.96
Control genómico	0.24	0.76	0.05 (17)	0.37 (110)	0.58 (173)	0.37	0.36	-	0.58
								0.003	
<b>TOMM40- rs2075650</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>				
Casos	0.89	0.11	0.79 (158)	0.21 (42)	0	0.20	0.19	-0.07	0.93
Controles	0.88	0.11	0.79 (158)	0.19 (38)	0.02 (4)	0.19	0.20	0.07	0.23
Control genómico	0.91	0.09	0.82 (328)	0.17 (68)	0.01 (4)	0.17	0.17	0.01	0.46

**SNP:** polimorfismos de un solo nucleótido; **Ho:** heterocigosidad observada; **He:** heterocigosidad esperada; **Fis:** Índice de homocigosidad; **SOD:** superóxido oxidasa; **APOA4:** apolipoproteína 4; **APOA5:** apolipoproteína 5; **LOX-1:** receptor tipo lectina de lipoproteínas de baja densidad oxidadas; **ALOX5AP:** proteína activadora de araquidonato 5 lipoxigenasa; **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **TOMM40:** translocasa de membrana externa mitocondrial; **A:** adenina; **C:** citocina; **G:** guanina; **T:** timina. **A:** alanina; **V:** valina; **H:** histidina; **Y:** tirosina. **HWE:** *Hardy-Weinberg Expectation*

**Tabla 10. Polimorfismo P22phox asociado al desarrollo de AT.**

Características	Casos n=204	Controles n=204	OR <sup>1</sup>	IC 95%
<b>Polimorfismo P22phox</b>				
Modelo Codominante				
GG	124	117	1.0	--
AG	64	80	0.70	0.45-1.09
<b>AA</b>	16	7	<b>2.25</b>	<b>0.86-5.90</b>
Modelo Dominante				
GG	124	117	1.0	--
AG+AA	80	87	0.82	0.54-1.25
Modelo Recesivo				
GG + AG	188	197	1.0	--
<b>AA</b>	16	7	<b>2.56</b>	<b>0.99-6.62</b>
<b>Índice tabáquico*</b>				
Nunca	94	121	1.0	--
≤ 2 paquetes/año	27	37	1.19	0.69 - 2.05
≥ 2 paquetes/año	83	46	<b>2.10</b>	<b>1.26 - 3.49</b>

Valor de *p* de tendencia <0.01

Los valores en negritas corresponden a aquellos datos que fueron estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

<sup>1</sup> valor de OR ajustada por edad, género, antecedentes heredo familiares, e índice tabáquico

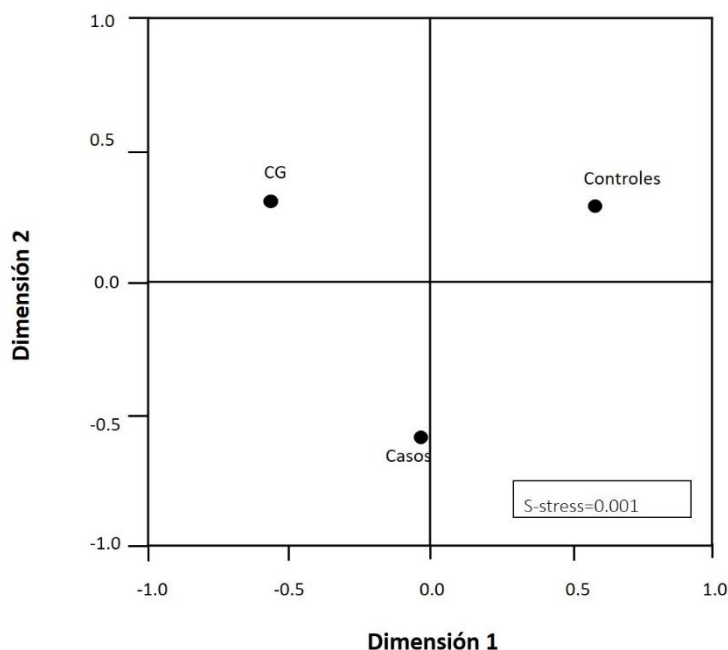
\* La información corresponde al modelo de regresión con modelo de herencia recesivo.

### Desequilibrio de ligamiento

El análisis de LD mostró diferentes patrones de segregación entre los diferentes *loci* y entre los diferentes grupos. De forma general, *TOMM40* (rs2075650) mostró un LD con los *loci* *APOA4* y *APOA5* en los tres grupos de estudio ( $D' > 0.50$ ,  $p < 0.01$ ); *APOA4*-rs5104 y *APOA5*-rs662799 también mostraron un importante LD ( $D' = 0.610$ ;  $p < 0.001$ ). Por su parte, *P22phox*-rs4673 mostró un importante LD con *ALOX5AP* en los grupos de controles y control genómico ( $D' = 1$ ;  $p = 0.001$  para ambos grupos). *P22phox*-rs4673 también mostró un LD con *TOMM40* ( $D' = 0.716$ ;  $p = 0.001$ ) en el grupo de controles, mientras que *ALOX5AP* y *LOX-1* mostraron un fuerte LD en el CG ( $D' = 0.72$ ;  $p = 0.001$ ). El grupo de casos no mostró LD entre los *loci* estudiados.

## Análisis de escalamiento multidimensional

Con la finalidad de observar gráficamente las diferencias entre los grupos de casos, controles y CG, se realizó un análisis de escalamiento multidimensional con los siete polimorfismos estudiados (Figura 5). Este análisis mostró que los casos presentaban un comportamiento peculiar muy diferente a lo que presentaban los grupos de controles y CG, lo que estuvo soportado por el valor de *stress* (0.001).



**Figura 5.** Análisis de escalamiento multidimensional entre los grupos de estudio. CG: Control Genómico empleando los siete marcadores estudiados en el presente trabajo.

## Análisis molecular de varianza

Con la finalidad de explicar las causas de las diferencias observadas en el MDS, se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA). Este análisis mostró que la mayor variabilidad es a nivel intraindividual (98% de varianza molecular  $p < 0.01$ ), siendo sutil la variación entre las poblaciones y entre los individuos.

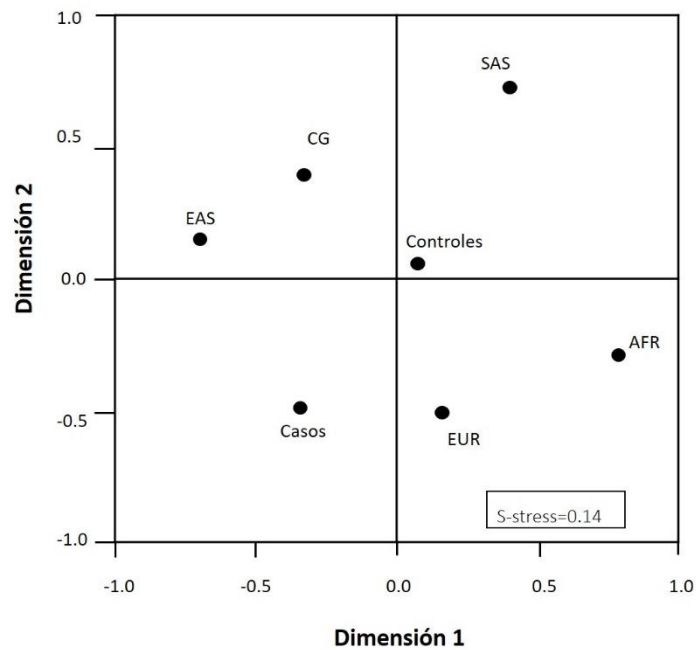
## **Análisis de diferenciación poblacional**

Dado que el AMOVA no permitió explicar las diferencias encontradas en el MDS, se realizó un análisis de diferenciación poblacional. Los resultados mostraron que no existen diferencias entre las poblaciones de estudio ( $F_{ST} = 0.002 - 0.004$ ;  $p > 0.05$ ). Por un lado, este hallazgo confirma la relación ancestral que existe entre las tres poblaciones, soportando una buena selección de muestra. Por otro lado, estos datos también sugieren que las diferencias podrían estar relacionadas con el comportamiento de alguno(s) *loci* en particular o bien, que el MDS está sugiriendo una estratificación poblacional.

Con base en las características genéticas que mostraron los marcadores de *APOA4* y *P22phox*, se sospechó que estos dos *loci* podrían estar modulando en mayor medida el comportamiento de nuestros grupos de estudio. Para ir corroborando esta nueva hipótesis se realizó otro análisis de MDS (Figura 6) incluyendo los datos reportados por el proyecto 1000 genomas (<http://phase3browser.1000genomes.org/index.html>), en poblaciones parentales (aquellas que históricamente contribuyeron a la formación de la población mestiza mexicana). Estos resultados mostraron que el grupo de casos es más afín genéticamente a las poblaciones europeas, mientras que tanto el grupo de los controles como el CG, fueron más similares a las poblaciones asiáticas del este, pudiendo sugerir una contribución por parte de la étnia europea al desarrollo de la AT. Para responder esta nueva interrogativa, se realizó un análisis de diferenciación poblacional tomando en cuenta solo el marcador de *P22phox*, esto debido principalmente a que éste mostró un exceso de individuos homocigotos y se asoció positivamente con el desarrollo de AT. Este análisis también incluyó a seis poblaciones del proyecto de los 1000 genomas. Los resultados sugirieron que los tres grupos de presentan una cercanía genética con las poblaciones europeas ( $F_{ST}=0.023$ ,  $p < 0.01$ ; Tabla 11).

Tomando en cuenta los antecedentes demográficos que dieron origen a la población mestiza mexicana, se realizó un análisis de estratificación poblacional con diferentes combinaciones de *loci* (datos no mostrados). La combinación de *APOA4*-

rs5104 y *P22phox*-rs4673 fue la que mostró una estratificación poblacional integrada por dos subpoblaciones (Figura 7). Estos datos fueron soportados por el análisis estadístico obtenido mediante el programa de Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) en el que se muestra la presencia de las dos subpoblaciones  $k=2$ ,  $p = 0.5303$ ; Figura 8). Para determinar cuáles eran estas dos subpoblaciones se realizó un análisis filogenético, el que mostró una separación entre el grupo de casos (subpoblación 1) y los controles y el control genómico (subpoblación 2), siendo estas las dos poblaciones que se habían observado anteriormente (Figura 9).



**Figura 6.** Análisis de escalamiento multidimensional empleando los *loci* *APOA4*-rs5104 y *P22phox*-rs4673 con los grupos de estudio y otras poblaciones del mundo obtenidas del proyecto 1000 genomas. CG: Control Genómico, AFR: africanos; EAS: asiáticos del este; EUR: europeos.

**Tabla 11. Análisis de diferenciación poblacional con el marcador P22phox.**

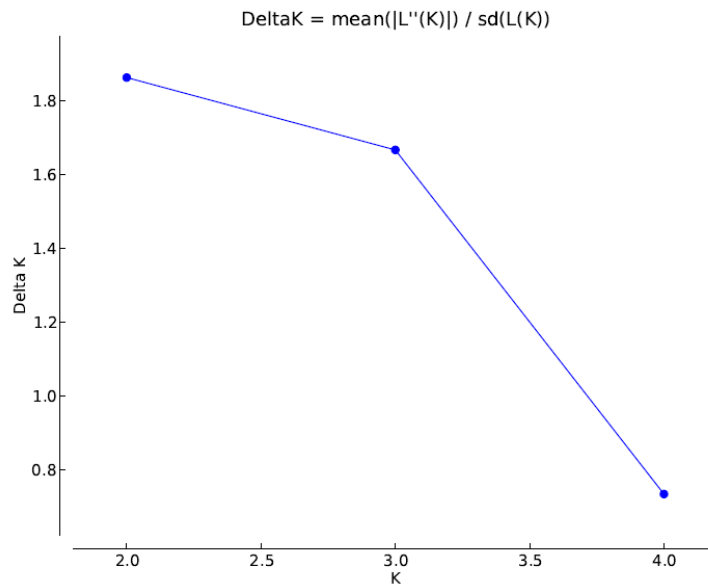
	Casos	Controles	AFR	EAS	EUR	SAS	COL	CG
Casos	0	0.91	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.95
Controles	-0.002	0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.80
AFR	0.14	0.14	0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
EAS	0.09	0.09	0.34	0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
EUR	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	0.05	0.18	0	0.13	0.16	<0.001
SAS	0.04	0.04	0.03	0.21	0.001	0	0.66	<0.001
COL	0.05	0.06	0.02	0.32	0.003	-0,002	0	<0.001
CG	-0.002	-0.001	0.13	0.09	<b>0.02</b>	0.04	0,05	0

Los valores por debajo de la franja gris corresponden a las distancias genéticas ( $F_{ST}$ ), mientras que los que aparecen por encima de la franja representan la significancia estadística. Valores de  $F_{ST}$ = 0.0 - 0.05: poca diferencia genética; 0.05 - 0.15: diferencia genética moderada; 0.15 - 0.25: diferencia genética grande. Los datos con valores de  $p < 0.007$  fueron tomados como estadísticamente significativos (*post hoc Bonferroni*)  $p < 0.05$ . \*Los valores en negritas representan la población con menor diferencia genética con respecto a los grupos de estudio. AFR: africanos; EAS: asiáticos del este; EUR: europeos; SAS: asiáticos del Sur; COL: colombianos; CG: Control Genómico.

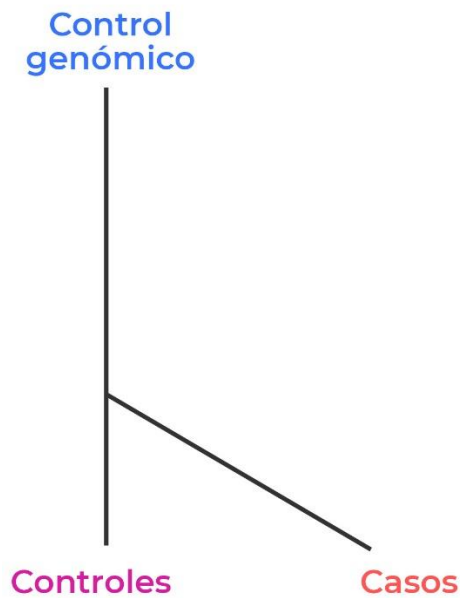


**Figura 7.** Gráfica de barras mostrando la estratificación poblacional obtenida con los marcadores de *APOA4*-rs5104 y *P22phox*-rs4673. El color rojo representa una primera población mientras que el color verde una segunda población. El eje de las Y muestra las proporciones de los diferentes individuos con base en las dos subpoblaciones sugeridas, los cuales son ordenados por el programa de acuerdo con la proporción de su genoma perteneciente a cada población. En el eje de las X se muestran los individuos ordenados de acuerdo con la proporción de cada una de las poblaciones que presentan en su genoma.





**Figura 8.** Gráfica de número de subpoblaciones con respecto al valor de Delta k, realizada con el programa *Harvester*. Los resultados muestran que el mayor valor con respecto a Delta k es el que corresponde a las dos subpoblaciones ( $k=2$ ), reforzando los hallazgos obtenidos mediante el programa *Structure v.2.3.4*.



**Figura 9.** Árbol filogenético obtenido a partir del análisis bayesiano (*Structure v.2.3.4*) para determinar la estratificación poblacional. Aunque las tres subpoblaciones comparten un ancestro común, el grupo de casos se separa de forma oblicua de los grupos de controles y control genómico.

## 7. Discusión

En el presente estudio se evaluó la condición de fumador en conjunto con el factor genético y la AT. Dentro de los resultados más destacables, se encontró una asociación positiva con algunos factores de riesgo clásicos (hipercolesterolemia, hipertensión y antecedentes heredofamiliares de enfermedades cardiovasculares). La condición de exfumador y el índice tabáquico mostraron una contribución a la presencia de AT en el género masculino de forma independiente a los antecedentes heredofamiliares, mientras que el *locus P22phox-rs4673* también contribuyó a su desarrollo.

La asociación positiva entre la hipercolesterolemia y la AT, ha sido soportada por estudios epidemiológicos previos, apuntando a que éste factor de riesgo modificable contribuye con el desarrollo de ECV, reforzando nuestro hallazgo (Abd et al., 2018; Ohira et al., 2006). Estos resultados, son consistentes entre diferentes étnias como lo demuestra un estudio multiétnico realizado en los Estados Unidos, en donde se reportó que la hipercolesterolemia incrementaba el riesgo de enfermedad arterial coronaria hasta en un 33% ( $_{95\%} IC = 1.08-1.64$ ,  $p < 0.05$ ) (Abd et al., 2018). Otro estudio realizado en el mismo país reportó una asociación del 13% con el desarrollo de infarto isquémico de tipo no lacunar (Ohira et al., 2006). Antecedentes previos relacionados con los niveles de colesterol en la población mexicana muestran que el nivel promedio de colesterol es de 202.9 mg/dL, siendo el género masculino el que muestra los mayores niveles en comparación con las mujeres (204.3 mg/dL,  $_{95\%} IC = 200.9-207.6$ ; vs 201.6  $_{95\%} IC = 198.2-205.0$ ) (Escobedo de la Peña et al., 2014). Estos niveles no están muy por encima de los valores normales, pero claramente muestran una variación entre géneros apuntando a que el género masculino presenta un mayor riesgo de AT en comparación con el género femenino, soportando nuestros hallazgos. Aunque algunos estudios asocian el tipo de lípidos tales como LDL, VLDL y HDL con el desarrollo de las ECV, en este estudio no se evaluó la contribución de este tipo de lípidos con el riesgo de AT pues no se contaba con esta información. A pesar de que nuestros hallazgos muestran una clara asociación entre los niveles de colesterol y la AT, es importante destacar que el riesgo de ECV se encuentra modulado por la

presencia o ausencia de otros factores que agraven la situación del individuo (Baeza-Cruz et al., 2018), por ejemplo, algunos contaminantes ambientales como el arsénico, el material particulado, entre otros, los cuales se han visto involucrados en los procesos que subyacen a la formación de la PA tales como la inflamación y el estrés oxidante, los cuales favorecen la formación de trombos (Cosselman et al., 2015; Robertson & Miller, 2018).

Con respecto a la participación de la hipertensión en las ECVs, distintos estudios señalan que la presión sanguínea alta es dañina para las arterias, incrementando el riesgo de falla cardíaca y diversos tipos de infarto (Lippi & Guidi, 2002). Consecuentemente, la determinación de este factor de riesgo es crucial, lo que está soportado por estudios clínicos y experimentales que demuestran una relación causal entre la hipertensión y la remodelación cardíaca vascular y estructural, a la vez que induce estrés oxidante en la pared arterial, fomentando el proceso aterogénico (Koene et al., 2016). La asociación positiva encontrada entre este factor de riesgo y la AT (presente trabajo) es congruente con otros estudios. Particularmente, en las poblaciones asiáticas la hipertensión, contribuyó con más de dos veces al riesgo ( $95\%$  IC = 1.29-3.84,  $p < 0.05$ ) de padecer un infarto de tipo isquémico con un rango de PA sistólica de 130-139 mm Hg y de 85-89 mm Hg en el caso de la PA diastólica; para la EAC este riesgo fue de 2.29 veces más cuando la PA sistólica era de 140-159 mm Hg y la diastólica de 90-99 mm Hg (Ikeda et al., 2009). Variables como la edad ha sido también relacionada primeramente con la hipertensión y posteriormente con el evento aterotrombótico (Hörnsten et al., 2016). Estudios previos realizados en individuos estadounidenses señalan que tanto hombres como mujeres mayores de 65 años tienen mayor riesgo de padecer HTA (RM = 2.20;  $IC_{95\%} = 1.27-3.84$ ,  $p = 0.005$ ) en comparación con los adultos jóvenes (Hörnsten et al., 2016).

Otra variable asociada, es el género ya que los valores de asociación se modifican entre el sexo masculino y femenino sugiriendo que los mecanismos que subyacen a la AT, también podrían diferir dependiendo del género. Un estudio poblacional en los Países Bajos sugirió que las mujeres con esta nacionalidad tienen un mayor riesgo (RM=3.96,  $95\%$  IC = 1.83-8.57,  $p < 0.05$ ) en comparación con los hombres (Løkkegaard

et al., 2003). Similar a estos resultados, el estudio INTERHEART que incluyó individuos de 52 países de Asia, Medio Oriente, África, Australia, América del Norte y América Sur, reportó que las mujeres presentan un mayor riesgo de IAM en comparación con los hombres (RM=2.95 vs 2.32), mientras que tomando en cuenta a ambos géneros este riesgo fue cercano a dos (RM=1.91,  $_{95\%}IC=1.74-2.10$ ) (Yusuf et al., 2004). En poblaciones asiáticas considerando a ambos géneros, se encontró que un aumento en la presión arterial de 10mmHg, incrementaba el riesgo de ACV en casi dos veces más ( $p<0.05$ ) (Nakamura et al., 2008). En otro estudio en esta misma población la HTA clasificada como estadio uno (PA sistólica de 130-139 mm Hg y PA diastólica de 80-89 mm Hg), se asoció con un mayor riesgo cardiovascular solo en individuos menores de 65 años (RM=1.40,  $_{95\%}IC = 1.01-1.94$ ,  $p<0.05$ ) (Ueshima et al., 2011). En cuanto a la información sobre este factor de riesgo en Latinoamérica, países como Argentina, Brasil, Chile y Colombia, han mostrado una asociación positiva con el desarrollo de ECV (Avezum et al., 2009). Así mismo, el estudio CARMELA, dio a conocer que la Ciudad de México tuvo una menor prevalencia de HTA en comparación con las ciudades de Barquisimeto (Venezuela) , Buenos Aires (Argentina) y Santiago (Chile) (Rivera-Andrade & Luna, 2014). Es importante mencionar el estudio INTERHEART dio a conocer que la HTA es el factor de riesgo más fuertemente asociado a IAM en los países de América Latina (RM=2.81,  $_{95\%}IC= 2.39-3.31$ ,  $p<0.05$ ). Estos datos contradicen nuestros hallazgos, lo que pudo estar relacionado con el tipo de hormonas sexuales (Maranon & Reckelhoff, 2013). Existen estudios que señalan que la hipertensión en hombres es mediada por andrógenos, mientras que en las mujeres parece ser independiente de los estrógenos. No obstante, a la llegada de la menopausia el factor protector de los estrógenos se pierde, por lo que el riesgo cardiovascular se incrementa en este sexo (Reckelhoff, 2018). Sin embargo, cabe señalar que la literatura resalta que se necesitan más estudios para determinar completamente los efectos tanto protectores como de riesgo de estas hormonas (Maranon & Reckelhoff, 2013). Otro aspecto importante a considerar para la discrepancia que mostraron nuestros resultados es que la media de edad reportada para las mujeres en este estudio [47.5 años, (33-62)], posiblemente no nos permita ver aún el efecto que tendría la menopausia en nuestra muestra, por lo que, al tratarse de

una edad joven, este factor protector de los estrógenos aún se encuentre presente. No obstante, sería relevante evaluar a las mujeres que se encuentren en edades mayores a los 50 años. Por otro lado, otros estudios consideran que el tratamiento farmacológico también contribuiría en las discrepancias mostradas entre los géneros ya que los medicamentos que se proporcionan parecen ser diferentes para hombres y mujeres. Algunos estudios señalan que las mujeres son más frecuentemente medicadas con fármacos bloqueadores de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, mientras que los hombres son tratados con medicamentos bloqueadores del receptor de angiotensina (Reckelhoff, 2018). Además de que la farmacocinética también se ve alterada dependiendo del género, ya que existen diferentes factores que influyen en la biodisponibilidad y distribución de estos fármacos (Rydberg et al., 2018; Wenger, 2012). Este último punto va de la mano con el auto cuidado de la salud, por lo que no se descarta que haya una relación estrecha con este riesgo incrementado en hombres, ya que generalmente las mujeres acuden a consulta médica de manera más regular que los hombres (Schousboe et al., 2003).

En lo referente a la historia familiar, distintos autores señalan que ésta es un predictor de riesgo independiente que contribuye en el desarrollo del IAM y el ACV (Bachmann et al., 2012). Lo anterior está soportado por estudios en gemelos en donde se ha determinado que las ECVs tienen una heredabilidad de entre un 30% a un 60% (Högström, 2017). Cabe destacar que el fondo genético es variable entre las diferentes poblaciones, lo que apoya los estudios de componentes genéticos de riesgo en poblaciones multiétnicas como la mestiza mexicana. En este sentido, un estudio realizado en población residente de los Países Bajos con diferentes orígenes étnicos (v.gr. asiático y africano), encontró que el contar con historia familiar de ECV incrementaba el riesgo para el desarrollo de ACV (RM = 1.62, 95% IC = 1.19-2.20,  $p < 0.05$ ); los individuos con ascendencia africana mostraron un mayor riesgo en comparación con las poblaciones asiáticas (OR=2.17, 95% IC = 1.32-.57  $p < 0.05$ ) (Valerio et al., 2016). Un hallazgo interesante encontrado por Aambo, *et al* fue que la prevalencia de EAC y el ACV, varía entre poblaciones con ascendencia del sur de Asia, Asia oriental, África y Europa. En este sentido, aquellos pacientes con ascendencia del sur de Asia mostraron un riesgo de casi dos veces más para el

desarrollo de EAC en comparación con los europeos. Al evaluar la prevalencia de ACV se encontró que las mayores tasas son reportadas en los individuos afrodescendientes (Aambo & Klemsdal, 2017). Los datos anteriores indican que en general todos los estudios, incluido el nuestro, soportan una relación entre los antecedentes familiares de ECV y el desarrollo de las mismas. Por otro lado, las diferencias en los valores de riesgo reportados podrían sugerir una dependencia del origen étnico, lo que puede incrementar el riesgo de ECV. Ambos aspectos (antecedentes heredo-familiares y el origen étnico) sustentan la contribución genética en el desarrollo de estas patologías.

Si bien, el estudio de los factores de riesgo clásicos es de suma importancia, el componente ambiental, como el humo del cigarro, toma mayor relevancia por el número de individuos expuestos a la nicotina y los diferentes xenobióticos relacionados con el consumo de cigarro (Csordas & Bernhard, 2013). En este sentido es importante remarcar que en nuestro país, el ser fumador es un factor de riesgo que cobra relevancia ya que 14.3 millones de personas son fumadoras actuales, de las cuales el 25.2% son hombres y el 8.2% son mujeres (Secretaría de Salud, 2016). Nuestro estudio mostró una asociación positiva, independiente a cualquier otra variable, entre la condición de exfumador con la AT, lo que es congruente con los resultados de estudios previos realizados en individuos estadounidenses y asiáticos (Nakamura et al., 2008; Ohira et al., 2006) Con referencia a lo anterior, algunos reportes muestran que no solo el hábito de fumar muestra una relación positiva con el riesgo de ECV, sino que incluso el número de cigarrillos diarios que se fuman modifica significativamente el riesgo en ambos sexos (Markidan et al., 2018; Bhat et al., 2008). Particularmente, los resultados reportados para el género femenino son discrepantes con los encontrados en el presente proyecto. Este comportamiento podría estar relacionado a que la cantidad de mujeres fumadoras es menor en nuestro país en comparación con la de los hombres, además que posiblemente las mujeres fumen menos cigarrillos al día que el género masculino (Pereira-Rodríguez et al., 2015). Si bien fueron los hombres los que mostraron las asociaciones positivas, es importante considerar que ambos sexos tienen un riesgo relevante, dado que la edad promedio en nuestro país para iniciar con el consumo de cigarro es a los 16.4 años para los hombres y de 17.1 años para las mujeres, datos que no presentan una diferencia

significativa aparente (Secretaría de Salud, 2016). Con respecto al consumo promedio de cigarrillos por día, este es de 7.7 piezas, sin embargo, estos datos no representan la exposición de fumadores de segunda y tercera mano, los que probablemente también están siendo afectados con respecto a las ECV así como a otro tipo de enfermedades complejas (Secretaría de Salud, 2016).

Con relación al humo de segunda mano, diversos estudios señalan que este humo es una toxina ambiental además que es una causa establecida de ECV en los no fumadores (Olasky et al., 2012). Algunos metaanálisis han reportado que este tipo de exposición al humo de tabaco aumenta en un 31% el riesgo a EAC y entre un 20 a 30% el riesgo de ACV (Jones et al., 2016). Por su parte el humo de tercera mano, el cual es aquel que se acumula en las superficies presentes en los lugares en donde se ha fumado previamente, también representa una amenaza potencial para la salud (Martins-Green et al., 2014). Aunque los riesgos potenciales atribuidos a este tipo de exposición están aumentando, hasta el momento se carece de información suficiente acerca de las implicaciones específicas para la salud tras una exposición aguda o acumulativa (Martins-Green et al., 2014). Sin embargo, para ambos tipos de exposición entre los posibles mecanismos de toxicidad cardiovascular se incluyen el aumento de la agregación plaquetaria, la disfunción endotelial, la inflamación, el estrés oxidante, la rigidez arterial y la aterosclerosis, los que han sido relacionados con las ECV en general (Jones et al., 2016). Como podemos observar, estas fuentes de exposición contribuyen a la mortalidad por ECVs, lo cual se vuelve cada vez más relevante para la región de Latinoamérica, donde se ha visto un incremento en la tasa de muerte y en la aparición temprana de estas condiciones (Cabral et al, 2017). Interesantemente, Bardach, *et al* reportaron que en los países latinoamericanos el nivel de ingreso se ve relacionado con el tabaquismo. Observando que un nivel de ingresos bajo se asoció con una mayor prevalencia de tabaquismo activo (RM=1.62, IC<sub>95%</sub> = 1.34-1.96), además de que se observó un efecto de dosis respuesta con los niveles de ingresos medio y bajo, siendo los hombres los que mostraron una mayor prevalencia de tabaquismo activo (Bardach et al., 2016).

Aunque se esperaría que la condición de fumador actual estuviera asociada mayormente con la AT, en este proyecto fue la condición de exfumador la que presentó la mayor contribución. Lo anterior podría reflejar que una vez que los individuos son diagnosticados con ECV, existe una mayor presión para abandonar el hábito tabáquico, además de que existe una tendencia a adoptar hábitos de vida saludables, entre los cuales se encuentran el dejar de fumar o disminuir el número de cigarrillos que se fuman por día y consumir menor cantidad de bebidas alcohólicas (Hackshaw-Mcgeagh et al., 2015; Jiménez-Mendoza et al., 2018). También es importante considerar que algunos estudios señalan que el 98.1% de los exfumadores siguen siendo fumadores de segunda mano, por lo que tienen una exposición constante al humo de tabaco, por lo que la presencia de AT también podría ser consecuencia de esta exposición (Campos et al., 2014). De acuerdo con nuestros resultados, el ser fumador actual presenta valores de RM menores, lo que podría sugerir que hay un aumento en el abandono del tabaquismo una vez que las personas fueron diagnosticadas con la enfermedad (Jiménez-Mendoza et al., 2018). No obstante, otro aspecto importante a considerar es que al momento de la entrevista los fumadores actuales se hayan clasificado dentro del grupo de exfumadores, lo cual puede estar relacionado nuevamente con la presión ejercida sobre la persona para abandonar el tabaquismo pero también porque estas personas adquieren un mayor conocimiento acerca de los factores de riesgo que favorecen a la AT (Campos et al., 2014; Jiménez-Mendoza et al., 2018).

Un parámetro que nos proporcionó una gran ventaja fue el cálculo del índice tabáquico, ya que nos permitió observar que entre más número de cigarrillos se fumen al día hay una mayor asociación con la enfermedad, lo cual ya ha sido descrito en otros estudios (Markidan et al., 2018; Bhat et al., 2008). Si esta variable solo hubiera sido evaluada de acuerdo a la condición de fumador, no se hubiera obtenido información acerca de la intensidad del consumo. Además, parece que, sin importar la condición de fumador, entre mayor sea el consumo de cigarros, mayor será la asociación con la enfermedad. Otro aspecto interesante fue que independientemente del polimorfismo, en los individuos con un consumo mayor a dos paquetes por año, la asociación con la presencia de AT se mantiene. Si bien este índice es reconocido como el estándar de



oro para evaluar a los fumadores, existen algunas desventajas que se encuentran relacionadas con el cambio en la intensidad y la duración del consumo a lo largo de la vida, debido a que este índice asume una intensidad de consumo constante. (OPS & OMS, 2015).

Es importante mencionar que al evaluar el consumo de cigarro y el índice tabáquico en conjunto nos permitió encontrar una asociación con la presencia de la AT, sin embargo, se tiene que considerar que existen otros parámetros para medir la contribución de este factor de riesgo en las enfermedades. Entre estas herramientas se encuentra la historia de tabaquismo a lo largo de la vida, la cual considera la temporalidad del consumo así como también los diferentes patrones de intensidad que se presentan en las diferentes etapas de la vida, por lo que sería un mejor indicador del consumo de tabaco y podría mostrarnos un mejor panorama para evaluar su asociación con la presencia de la enfermedad (Jiménez-Mendoza et al., 2018).

Al evaluar en conjunto tanto a los antecedentes familiares como al número de cigarrillos, nuestros hallazgos sugirieron que aquellos individuos con historia familiar de ECV, presentaron menos frecuencia en el hábito de fumar, lo que podría sugerir una mayor comprensión de las consecuencias del consumo del tabaco. No obstante, un estudio realizado en población norteamericana reveló, que la concientización entre los participantes con antecedentes familiares no tenía ningún efecto en el comportamiento relacionado con la salud, excepto en las pruebas de niveles lipídicos (Imes & Lewis, 2014). Además, vale la pena resaltar que, de acuerdo con los resultados encontrados, el incremento de las posibilidades de padecer AT parece ser independiente de los antecedentes familiares. Con respecto a lo anterior se resalta que diversos estudios señalan que fumar es un factor de riesgo importante para la ECV, y puede dar lugar a un aumento de siete veces en el riesgo de enfermedad arterial periférica (EAP) y al menos un aumento del doble en el riesgo de EAC (Mallaina et al., 2013). Así mismo, el estudio INTERHEART mostró que si una persona deja de fumar, reduce su riesgo de IAM en aproximadamente un 65% (Yusuf et al., 2004; Mallaina et al., 2013) por lo que pareciera contribuir por sí solo de manera importante en el desarrollo de la AT. No obstante, es importante hacer hincapié en que la evaluación

de la historia familiar es sumamente informativa ya que sirve como un puente entre la genética y el entorno ambiental común, permitiendo el estudio conjunto de los factores de riesgo a los cuales se encuentran expuestos todos los individuos (Imes & Lewis, 2014).

Aunque esta investigación pudo asociar de manera positiva a la hipercolesterolemia, la hipertensión, los antecedentes familiares, la condición exfumador y el hábito tabáquico con la AT, es importante considerar que la formación de PA es un proceso natural de la vida (Bentzon et al., 2014). Sin embargo, es posible que estos factores puedan favorecer su desarrollo a edades más tempranas. No obstante, los factores de riesgo modificables no pueden explicar por sí solos el origen de esta enfermedad compleja, así como las altas tasas de mortalidad e incidencia de ECVs. Es por ello, que el presente proyecto resaltó la importancia de estudiar la contribución ambiental en conjunto con los factores genéticos, integrando su participación en el desarrollo de la AT.

Haciendo referencia a la parte genética de este proyecto, los polimorfismos que se incluyeron en este estudio se encuentran relacionados con distintos procesos que favorecen la oxidación de lípidos, con la consecuente formación de la placa aterosclerótica y el evento aterotrombótico.

Uno de los principales hallazgos de este proyecto fue que el polimorfismo *P22phox* mostró una asociación del genotipo AA y el modelo de asociación recesivo (GG+AG vs AA) con una mayor probabilidad de desarrollar AT. En relación con lo anterior, también se encontró que las frecuencias genotípicas de este polimorfismo (rs4673) se mostraron diferentes entre los tres grupos evaluados e inclusive estas frecuencias fueron poco similares a las reportadas en otras poblaciones. Estos hallazgos fueron soportados por un exceso de individuos homocigotos en el grupo de casos lo que resultó en un desequilibrio de HW, siendo el único marcador de los evaluados en el cual se mostró este comportamiento. Cabe recordar que el equilibrio de HW es un modelo estadístico esencial para el análisis de los datos genéticos, ya que nos permite conocer el flujo de genes, el apareamiento selectivo, la estratificación poblacional e incluso podría estar marcando cierta relación con la enfermedad

(Gómez, 2017), por lo que este exceso de individuos homocigotos fue uno de los parámetros que nos hizo evaluar a más profundidad a este marcador. En este sentido, al comparar nuestros resultados de asociación con otras poblaciones, se encontró que en individuos de origen caucásico este marcador se asoció positivamente hasta 3.42 veces más con el desarrollo de ECV ( $p < 0.01$ ) (Genius, Grau, & Lichy, 2008), lo que es contrario a lo reportado en poblaciones asiáticas, en las cuales parece existir un efecto protector de este marcador en modelos de asociación codominante y dominante (A vs G, RM=0.77; IC<sub>95%</sub> 0.68-0.87,  $p < 0.05$ ; AA+AG vs GG, RM=0.714 IC<sub>95%</sub> 0.62-0.82;  $p < 0.05$ ) (Fang, et al., 2010). La asociación reportada en poblaciones descendientes de europeos es congruente con nuestros hallazgos, pudiendo sugerir una contribución ancestral al desarrollo de las ECV. La particularidad en el comportamiento de este marcador podría también estar íntimamente relacionado con una gran variabilidad interétnica la cual es un aspecto sumamente relevante para la población mestiza mexicana (Camacho-Mejorado et al., 2015; Santana et al., 2014). Como previamente se ha reportado por nuestro grupo de investigación, la arquitectura genética de la población mexicana se encuentra conformada por al menos tres subpoblaciones, las que posiblemente podrían estar representando (en mayor o menor proporción) a las ancestrías parentales que originaron nuestra población [europea, la amerindia (asiática) y la africana] (Martínez-Cortés et al., 2012; Santana et al., 2014). La confirmación de esta sub-estructuración en nuestras poblaciones de estudio se debió gracias al árbol de filogenia el cual mostró que el grupo de casos se separa (por medio de la distancia genética) de los otros grupos de estudio, por lo que parece tener ciertas características que lo hacen diferente a los otros dos grupos.

Si bien el estudio de *P22phox* no tiene antecedentes en la población mexicana, los hallazgos en este proyecto son de suma relevancia debido principalmente a que la NAD(P)H oxidasa, al ser la mayor fuente de ROS, tiene un papel fundamental en las ECVs, además de que plataforma de *polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) cataloga a esta variante como altamente patogénica (puntaje=1). Este polimorfismo (rs4673), localizado en la región reguladora de *P22phox*, resulta en la sustitución funcional de una G por una A lo que parece causar una reducción en la generación de anión superóxido en la pared vascular (Genius et al., 2008). Este efecto en la reducción

de superóxido conlleva a algunas disfunciones secundarias asociadas a las ECVs tales como el incremento de la adherencia de las plaquetas, la proliferación de diversos tipos celulares y la inflamación, razones por las cuales parece estar íntimamente relacionado con el desarrollo de la AT (Fang et al., 2010).

Otro hallazgo por destacar es que el haber identificado este proceso de subestructuración poblacional utilizando polimorfismos tipo SNP no es algo cotidiano, ya que los marcadores tipo SNP son poco informativos en comparación con otros tipos de polimorfismos como las repetidas cortas en *tándem* (STR, por sus siglas en inglés, *short tandem repeats*). Lo anterior, está dado principalmente porque este tipo de polimorfismos son una forma abundante de variación en el genoma (uno por cada 300pb; pares de bases), cuya variación entre individuos está dada por el cambio de una sola base (Brookes, 1999). Sin embargo, se debe tener en mente que las enfermedades complejas son enfermedades poligénicas en las que la participación de un solo SNP no podría explicar el fenotipo de la enfermedad.

Un punto importante a destacar es que, aunque *P22phox* mostró diferentes patrones de LD con otros *loci*, estos no se encuentran en el mismo cromosoma por lo que se podría hablar de un LD espurio debido al *admixture* de la población (Gómez, 2017). Tomando en cuenta todos estos resultados encontrados para este marcador, se podría sugerir que este polimorfismo (P22phox-rs4673) parece ser el responsable de los comportamientos mostrados por los grupos de estudio, confirmando así la hipótesis que nos planteamos posterior al análisis de MDS y el AMOVA.

En lo que respecta a los demás polimorfismos evaluados, ninguno mostró asociación con la probabilidad de padecer AT. Sin embargo, mostraron una gran variabilidad interétnica mostrando asociaciones positivas con el desarrollo de ECVs en diferentes poblaciones, por lo que no podemos descartar su contribución, en cuyo caso la falta de asociación encontrada en el presente estudio podría estar limitada por el tamaño de muestra, siendo necesario incrementarla en futuros estudios.

Desde el punto de vista de los mecanismos que subyacen a la generación de la AT, las dislipidemias son uno de los principales factores precursores para la formación de la placa, por lo que los polimorfismos presentes en los genes *APOA4* y *APOA5*

podrían favorecer la acumulación de lípidos en la íntima arterial (Ou et al., 2015). Pese a que en nuestro estudio no se pudo establecer una asociación entre el marcador de *APOA4*-rs5104, algunos autores han reportado que el alelo G y su genotipo homocigoto (GG) incrementan 1.42 veces y 1.86 veces el riesgo a padecer dislipidemia ( $p<0.05$ ) (Ou et al., 2015). No obstante, el alelo G presentó una frecuencia muy baja en nuestra población, lo que dificultó su asociación con el fenotipo cardiovascular, además de la disparidad de frecuencias mostrada con las poblaciones africanas y asiáticas del este (Ou et al., 2015). Interesantemente, el genotipo de riesgo mostró un exceso de individuos homocigotos exclusivamente en el grupo de los casos, lo que posiblemente podría estar sugiriendo una relación con la AT. El estudio de los polimorfismos en *APOA4* es interesante, ya que es una proteína sintetizada por los enterocitos del intestino delgado y componente mayoritario de las HDL y quilomicrones (Gomez et al., 2010). Además de que este gen forma parte de un *cluster* de genes conformado por *APOA1* y *APOC3* (Gomez et al., 2010) el cual ha sido asociado con alteraciones lipídicas, principalmente con triglicéridos y HDL-C (Lamina et al., 2015). A su vez, este *cluster* tiene una participación clave en el metabolismo de la mayoría de las lipoproteínas plasmáticas siendo candidatos potenciales para la modulación del tamaño de la partícula de LDL (Gomez et al., 2010).

Por lo que respecta al polimorfismo en *APOA5*-rs662799, algunos autores señalan una asociación positiva al portar el alelo G con enfermedad coronaria (RM=1.42; IC<sub>95%</sub>, 1.036-1.952;  $p=0.03$ ) (Zhou et al., 2013), así como alteraciones en los niveles de la presión arterial sistólica y de triglicéridos ( $p<0.0001$ ) (Ouatou et al., 2015). Contario a este efecto, los resultados obtenidos en la población China Han, atribuyen al alelo G un efecto protector para ACV (RM=0.75 IC<sub>95%</sub>, =0.618-0.923;  $p<0.01$ ), discrepando de los estudios realizados en poblaciones europeas. Cabe mencionar que este gen ha sido considerado un fuerte candidato como modulador del metabolismo de los triglicéridos, mostrando incluso variaciones en los niveles de estos lípidos entre diferentes etnias (Zhou et al., 2013).

Un dato importante es que ambos marcadores (*APOA4*-rs5104 y *APOA5*-rs662799) se localizan en el mismo cromosoma por lo que presentan un fuerte LD,

teniendo un papel importante (como haplotipo de riesgo) en el metabolismo de los lípidos, en particular con los triglicéridos, (Ou et al., 2015). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo, así como los obtenidos en diferentes poblaciones, sugieren una variabilidad interétnica importante, razón por la cual es posible que en nuestro estudio no se haya encontrado alguna asociación entre estos marcadores y la AT, dado que la población mexicana presenta una arquitectura genética multiétnica (Moreno-Estrada et al., 2014). Desafortunadamente, nuestro tamaño de muestra y la baja frecuencia del alelo de riesgo en nuestra población limitó encontrar una posible asociación.

Siguiendo en el tenor de los genes relacionados con los niveles de lípidos, *TOMM40* presentó un fuerte LD con el *locus* de *APOE* por lo que también podría estar afectando al metabolismo de los lípidos sanguíneos (Ronald et al., 2009). De manera similar a los polimorfismos anteriores, tampoco se encontró una asociación entre este polimorfismo (rs2075650) y la AT. No obstante, algunos autores han demostrado que el alelo G incrementa los niveles de LDL-C y triglicéridos, a la vez que disminuye los niveles de HDL-C, incrementando el riesgo cardiovascular (Middelberg et al., 2011). Por otro lado, también se ha encontrado una correlación con el patrón de flotabilidad, es decir, con qué tan densas son las LDL, en donde el alelo G también disminuye la tasa de flotabilidad ( $B=-0.0047$ ) promoviendo un fenotipo aterogénico (Ronald et al., 2009). En cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas, éste fue el marcador que mostró mayor similitud con todas las poblaciones reportadas en el proyecto de los 1000 genomas. Desde el punto de vista genético poblacional, este polimorfismo mostró un exceso de individuos heterocigotos, y aunque no tuvo un valor de  $p$  significativo, podría ser indicativo de una sub-estructuración poblacional, característica que debería de considerarse pues podría ocasionar un sesgo en nuestros resultados (Martínez-Cortés et al., 2012; Santana et al., 2014). Finalmente, el estudio de este SNP ha cobrado relevancia debido a que se encuentra justo río abajo de *APOE* y *APOC1* (Salakhov et al., 2014). Ambas proteínas se encuentran formando parte de algunas lipoproteínas; la *APOE* se encuentra en los quilomicrones y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés, *intermediate density lipoprotein*), mientras que la *APOC1* en las HDL y las VLDL (García, 2003). Ambas proteínas son necesarias para el

correcto metabolismo de los triglicéridos, el colesterol y otros lípidos sanguíneos (Jong, Hofker, & Havekes, 1999).

En conjunto con el incremento en los niveles de lipoproteínas y lípidos sanguíneos, existe una mayor captura de LDL por los receptores de LOX-1 localizados en la superficie de los macrófagos. Esta captura aumentada de LDL y su internalización a la íntima arterial favorece la oxidación de LDL dando como resultado LDL-ox las cuales son fagocitadas por los macrófagos que posteriormente se convierten a células espumosas (Sawamura et al 2015). En lo que se refiere al polimorfismo en *LOX-1-rs1050 283*, es importante resaltar que, aunque nosotros no pudimos reportar una asociación entre este marcador y la AT, su determinación en población mexicana es de suma relevancia ya que algunos autores señalan que este marcador podría ser un predictor para las ECVs (Guo et al., 2017). Esto ha sido soportado por algunos estudios en los que se observó que en individuos con ACV los niveles de RNAm de *Lox-1* se encuentran incrementados, además de que el alelo A se ha visto relacionado con mayores niveles séricos de LOX-1 (Guo et al., 2017; Sawamura et al., 2015). Así mismo en una población Chinos Han, el alelo A se encontró asociado con un incremento en el riesgo de 1.39 veces más ( $_{95\%}$  IC 1.154-1.681,  $p=0.001$ ) para el desarrollo de AVC de tipo isquémico (Guo et al., 2017), mientras que en individuos caucásicos no se ha podido establecer dicha relación (Sciacqua et al., 2014). De acuerdo con las frecuencias de este gen reportadas por el proyecto de los 1000 genomas en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas por este estudio mantienen proporciones similares a las encontradas en Latinoamérica, no así en europeas, africanas y asiáticas. Los resultados que se tienen acerca de este marcador no son concluyentes, posiblemente debido a la variabilidad interétnica, los factores ambientales y la incompleta comprensión del mecanismo de acción, por lo que se sugiere seguir estudiando este marcador en un tamaño de muestra más grande.

Posterior a la captura de las ox-LDL y a la acumulación de células espumosas, existe una promoción de un estado proinflamatorio que puede estar mediado por diferentes rutas proinflamatorias entre las cuales la ruta de los leucotrienos es una de



las más destacables en estos procesos (Ye et al., 2014). Uno de los polimorfismos que ha sido relacionado con la inflamación es el *ALOX5AP*-rs4769874. En nuestro estudio, este marcador tampoco mostró una asociación con la posibilidad de padecer AT, sin embargo, las frecuencias alélicas y genotípicas reportadas concuerdan con las existentes en la base de los 1000 genomas. El estudio de este polimorfismo y su asociación con las ECVs ha captado el interés de los investigadores en los últimos años, ya que algunos estudios señalan que los leucotrienos de clase cuatro, son importantes mediadores que potencian la aterosclerosis al amplificar las reacciones inflamatorias (Kaushal et al., 2007; Wang et al., 2014). Estos estudios han asociado al alelo A con el desarrollo de ACV (RM= 1.537, IC<sub>95%</sub>, =1.099-2.136;  $p=0.01$ ) en población libanesa (Merhi et al., 2015), mientras que en una población de Estados Unidos fue el alelo G el que resultó asociado con ACV de tipo cardioembólico, de vasos de gran calibre y de origen desconocido (RM=6.0, IC<sub>95%</sub>, IC=2.3-16.7;  $p<0.01$ ; RM=3.9, IC<sub>95%</sub>,=1.6-9.7,  $p=0.001$ ; RM=2.5, IC<sub>95%</sub>,=1.3-4.8,  $p=0.003$ , respectivamente), además de que exhibió diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre individuos con origen caucásico y aquellos con origen africano (Kaushal et al., 2007). Sin embargo, debido a que la frecuencia del alelo menor es muy baja (0.07) en nuestra población, se recomienda estudiar a este polimorfismo en una muestra mucho más grande. Sin embargo, la incongruencia reportada en los datos publicados podría sugerir la necesidad de corrección por estratificación poblacional (Moreno-Estrada et al., 2014).

El último marcador evaluado fue el *SOD2*-rs4880. Este marcador mostró frecuencias alélicas y genotípicas variables al compararlas con otras poblaciones, mostrando así una gran variabilidad interétnica. Aunque nosotros no pudimos establecer una asociación con la AT, un estudio realizado en individuos brasileños encontró que los sujetos heterocigotos (AG) y homocigotos AA presentaron un mayor nivel de ox-LDL en comparación con los individuos GG (Gottlieb et al., 2005). En este mismo sentido, otro estudio concluyó que el alelo G incrementa la actividad de la *SOD2* protegiendo a los macrófagos en contra de las ox-LDL reduciendo la apoptosis y como consecuencia la formación de la PA (Bresciani et al., 2013). Desde el punto de vista antioxidante, el estudio de los polimorfismos presentes en *SOD2* es de suma



importancia ya que diversos estudios soportan que el polimorfismo rs4880, estudiado en el presente trabajo, provoca un cambio de una alanina a valina lo que puede causar alteraciones estructurales en el dominio blanco de la proteína, provocando un cambio en la estructura de  $\alpha$ -hélice a hoja  $\beta$ , disminuyendo en un 30 a 40% en la actividad de SOD2 en mitocondria, por lo que consecuentemente habría un aumento en los niveles de estrés oxidante y daño cardiovascular (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

De manera integral, los hallazgos para los marcadores de *P22phox*-rs4673 y *APOA4*-rs5104, destacan la participación de ambos polimorfismos en la AT, ya que por un lado *P22phox* podría estar favoreciendo la oxidación de las ox-LDL, mientras que *APOA4* podría tener un papel protector al fungir como un antioxidante o bien promoviendo la oxidación al favorecer un estado dislipidémico. No obstante, como se mencionó anteriormente, los polimorfismos incluidos en este estudio al encontrarse relacionados con la oxidación de las LDL resaltan la importancia del estudio de genes en conjunto, ya que, al referirse a una enfermedad compleja y poligénica, el estudio aislado de los genes es un factor limitante para encontrar asociaciones con la enfermedad (Mazaheri et al., 2017; Wong et al., 2004).

Finalmente, aunque nuestro proyecto presentó algunas limitantes como el tamaño de la muestra y la falta de control en la evaluación de la variable de consumo de cigarro, los hallazgos de este trabajo resaltan la importancia del estudio de la contribución del componente genético y ambiental en la aterotrombosis en una población compleja como lo es la mestiza mexicana. Hay que tomar en consideración que la presencia de la sub-estructuración poblacional está íntimamente ligada con la diversidad histórica, cultural, lingüística y genética que se gestaron en nuestro país con la llegada de la colonización y los esclavos africanos, lo cual derivó en un proceso de *admixture* entre Nativos Americanos, Europeos y Africanos dando características únicas a nuestra población (Martínez-Cortés et al., 2012; Noris et al., 2012; Santana et al., 2014), por lo que los estudios de asociación genética que se realicen en la población mexicana deberán tomar en cuenta estas características, siendo lo recomendable realizar un apareamiento por ancestría.

Desde el punto de vista toxicológico, una limitante en el presente proyecto fue que no se obtuvo información acerca de los fumadores de segunda mano, además de que posiblemente por el limitado número de muestra, nuestros resultados en el género femenino no pudieron ser iguales de contundentes como lo fue en el caso de los hombres, por lo que se recomienda evaluar si las personas se encuentran expuestas al humo de segunda o tercera mano así como aumentar el número de muestra y el conocimiento del estado hormonal de las mujeres de estudio.

## 8. Conclusiones

- ✓ La hipercolesterolemia, la hipertensión, los antecedentes familiares, así como la condición de fumador y el hábito tabáquico se encontraron asociadas positivamente con una mayor probabilidad de padecer AT.
- ✓ El género masculino mostró mayores probabilidades de padecer AT en comparación con el género femenino.
- ✓ El ser fumador es un factor de riesgo determinante de AT, independientemente de los antecedentes familiares.
- ✓ En lo que respecta a la parte genética del proyecto, tanto el genotipo AA del marcador *P22phox-rs4673*, como su contribución mediante un modelo recesivo, mostró una asociación positiva con el desarrollo de AT.
- ✓ El análisis de estructuración poblacional, los análisis de MDS y el análisis de diferenciación poblacional, dieron a conocer que existen dos sub-poblaciones dentro de nuestra población de estudio: la de casos separada de las de controles y control genómico.
- ✓ En general, los polimorfismos en los *loci* *LOX-1*, *ALOX5AP* y *SOD2*, mostraron una gran variabilidad interétnica, siendo esta una de las razones principales por las que no encontró asociación de estos polimorfismos con la AT.
- ✓ Finalmente, los estudios de asociación genética en poblaciones complejas son un gran reto para la investigación, sin embargo, la realización de estos estudios en nuestra población nos permitiría conocer cuáles son aquellas variantes

genéticas que pueden conferir cierto riesgo para el desarrollo de las enfermedades complejas, tales como la aterotrombosis y así mejorar los métodos de atención y diagnóstico previo al desarrollo de la enfermedad. No obstante, estos estudios deben ser soportados por estudios descriptivos de genética poblacional, los que han demostrado reducir significativamente las falsas asociaciones, relacionadas con la arquitectura genética de la población más que con la asociación fenotipo-genotipo.

## 9. Perspectivas

Como perspectivas a este proyecto se tienen las siguientes:

- ✓ Aumentar el tamaño de la muestra con la finalidad de hacer más claras las posibles asociaciones que se vieron limitadas por el número de individuos estudiados en el presente estudio.
- ✓ Realizar la genotipificación de un control ancestral, lo que podría dilucidar incluso la asociación entre la predisposición y la carga ancestral.
- ✓ Realizar un estudio con los diferentes citocromos relacionados al metabolismo de la nicotina y conocer la influencia de estos en el desarrollo de la AT.
- ✓ Realizar el análisis multiloci, para conocer si estas combinaciones elevan la probabilidad de padecer AT.

## 10. Bibliografías

- Aambo, A., & Klemsdal, T. O. (2017). Cardiovascular disease and diabetes in patients with African or Asian background. *Aambo, Arlid*, 137(22). <http://doi.org/10.4045/tidsskr.16.0680>
- Abd Alamir, M., Goyfman, M., Chaus, A., Dabbous, F., Tamura, L., Sandfort, V., ... Budoff, M. (2018). The Correlation of Dyslipidemia with the Extent of Coronary Artery Disease in the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of Lipids*, 2018, 5607349. <http://doi.org/10.1155/2018/5607349>
- Abe, S., Tokoro, F., Matsuoka, R., Arai, M., Noda, T., Watanabe, S., ... Yamada, Y. (2015). Association of genetic variants with dyslipidemia. *Molecular Medicine Reports*, 12(4), 5429–5436. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4081>
- Attia, J., Ioannidis, J. P. a, Thakkinstian, A., McEvoy, M., Scott, R. J., Minelli, C., ... Guyatt, G. (2009). How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 301(1), 74–81. <http://doi.org/10.1001/jama.2008.901>
- Avezum, Á., Braga, J., Santos, Í., Guimarães, H. P., Marin-Neto, A., Piegas, L. S., & First, H. O. (2009). Cardiovascular disease in South America: Current status and opportunities for prevention. *British Cardiovascular Societyardiovascular Society*, 1–18. <http://doi.org/10.1136/hrt.2008.156331>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S., & Machado, A. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–31. <http://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bachmann, J. M., Willis, B. L., Ayers, C. R., Khera, A., & Berry, J. D. (2012). Association between family history and coronary heart disease death across long-term follow-up in men: The cooper center longitudinal study. *Circulation*, 125(25), 3092–3098. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.065490>
- Badimon, L., Padró, T., & Vilahur, G. (2012). Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 1(1), 60–74. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760546/pdf/10.1177\\_2048872612441582.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760546/pdf/10.1177_2048872612441582.pdf)
- Badimón, L., Vilahur, G., & Padró, T. (2009). Lipoproteins , Platelets , and Atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*, 62(10), 1161–1178. [http://doi.org/10.1016/S1885-5857\(09\)73331-6](http://doi.org/10.1016/S1885-5857(09)73331-6)
- Baeza-Cruz, G., Peniche-Otero, G., Alva-Esqueda, M. E., Naranjo-Muedano, M., Soria-Suárez, N., & Morales-Flores, H. J. (2018). Análisis de costo de la enfermedad, del tratamiento, las complicaciones e intervenciones de la hipercolesterolemia en México en 2016. *Value in Health Regional Issues*, 17, 56–63. <http://doi.org/10.1016/j.vhri.2017.12.003>

- Bardach, A., García, H. A., Ruano, R. A., & Agustín, C. (2016). Niveles de ingreso y prevalencia de tabaquismo en América Latina: revisión sistemática y metaanálisis. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *40*(4), 263–271. Retrieved from [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31309/v40n4a12\\_263-71.pdf?sequence=1](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/31309/v40n4a12_263-71.pdf?sequence=1)
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Retrieved August 7, 2017, from [https://www.google.com.mx/\\_/chrome/newtab?espv=2&ie=UTF-8](https://www.google.com.mx/_/chrome/newtab?espv=2&ie=UTF-8)
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*, *114*, 1852–1866. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
- Berlin, I., Lin, S., Lima, J. A. C., & Bertoni, A. G. (2012). Smoking Status and Metabolic Syndrome in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. A cross-sectional study. *Tobacco Induced Diseases*, *10*(9), 1–8. <http://doi.org/10.1186/1617-9625-10-9>
- Bresciani, G., Cruz, I. B. M., De Paz, J. A., Cuevas, M. J., & González-Gallego, J. (2013). The MnSOD Ala16Val SNP: Relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radical Research*, *47*(10), 781–792. <http://doi.org/10.3109/10715762.2013.836275>
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, *234*(2), 177–186. [http://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00219-X](http://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00219-X)
- Cabral, N., Aracélli, T., Bastos, A., dos Santos, N., & Longo, A. (2017). Increase of Stroke Incidence in Young Adults in a Middle-Income Country. *Stroke*, *48*. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018531>
- Camacho-Mejorado, R., Noris, G., Santana, C., Magaña, J. J., Majluf-Cruz, A., Arellano-Galindo, J., ... Gómez, R. (2015). Interethnic variation of the MMP-9 microsatellite in Amerindian and Mexican Mestizo populations: considerations for genetic association studies. *Funpecrp.Com.Br Genetics and Molecular Research Genet. Mol. Res*, *14*(141), 2929–2939. <http://doi.org/10.4238/2015.March.31.24>
- Campos, T., Richter, K., Cupertino, P., Galil, A., Banhato, E., Colugnati, F., & Batos, M. (2014). Cigarette Smoking Among Patients with Chronic Diseases. *International Journal of Cardiology*, *174*(3), 808–815. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.150>
- Chang, K.-H., Park, J.-M., Lee, C. H., Kim, B., Choi, K.-C., Choi, S.-J., ... Lee, M.-Y. (2017). NADPH oxidase (NOX) 1 mediates cigarette smoke-induced superoxide generation in rat vascular smooth muscle cells. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.013>
- Cosselman, K. E., Navas-Acien, A., & Kaufman, J. D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nature Reviews. Cardiology*, *12*(11), 627–42. <http://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.152>
- Csordas, A., & Bernhard, D. (2013). The biology behind the atherothrombotic effects of

cigarette smoke. *Nature Reviews. Cardiology*, 10(4), 219–30. <http://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.8>

- Díaz-Castro, O., Lamas Touza, J., & Villanueva Benito, I. (2005). Aterotrombosis: la necesidad de la investigación cardiovascular translacional. *Sociedad Castellana de Cardiología*, 7(4), 130–139.
- Douglas, G., & Channon, K. M. (2014). The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine*, 42, 480–484. <http://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.06.011>
- Escobedo de la Peña, J., De Jesus Perez, R., & Schargrotsky, H. (2014). Prevalencia de dislipidemias en la ciudad de México y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular . Resultados del estudio CARMELA. *Gaceta Médica de México*, 150, 1–9.
- European heart network. (2017). European Cardiovascular Disease Statistics 2017. Retrieved July 17, 2018, from <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html>
- Excoffier, L., & Lischer, L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Retrieved August 7, 2017, from <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>
- Fang, S., Wang, L., & Jia, C. (2010). Association of p22phox gene C242T polymorphism with coronary artery disease: A meta-analysis. *Thrombosis Research*, 125(5), e197–e201. <http://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.01.001>
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606. <http://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- García, A. M. (2003). La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *Revista Colombiana de Cardiología Enero/Febrero*, 10(4), 189–193. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcca/v10n4/10n4a3.pdf>
- Garelnabi, M., Lor, K., Jin, J., Chai, F., & Santanam, N. (2013). The paradox of ApoA5 modulation of triglycerides: Evidence from clinical and basic research. *Clinical Biochemistry*, 46(1–2), 12–19. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.09.007>
- Gaut, J. P., & Heinecke, J. W. (2001). Mechanisms for Oxidizing Low-Density Lipoprotein Insights from Patterns of Oxidation Products in the Artery Wall and from Mouse Models of Atherosclerosis. *TCM*, 114(3), 103–112. Retrieved from [http://ac.els-cdn.com/S1050173801001013/1-s2.0-S1050173801001013-main.pdf?\\_tid=d56a322a-629a-11e7-b7fc-00000aacb362&acdnat=1499380461\\_b508b139cef5c8d73004ed3075d885ac](http://ac.els-cdn.com/S1050173801001013/1-s2.0-S1050173801001013-main.pdf?_tid=d56a322a-629a-11e7-b7fc-00000aacb362&acdnat=1499380461_b508b139cef5c8d73004ed3075d885ac)
- Genius, J., Grau, A. J., & Lichy, C. (2008). The C242T polymorphism of the NAD(P)H oxidase p22 subunit is associated with an enhanced risk for cerebrovascular disease at a young age. *Cerebrovascular Diseases*, 26(4), 430–433. <http://doi.org/10.1159/000155639>



- Gómez, L. Al. (2011). Las enfermedades cardiovasculares: un problema de salud pública y un reto global. *Biomedica*, 31(4). <http://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.626>
- Gomez, P., Perez-Martinez, P., Marin, C., Camargo, A., Yubero-Serrano, E. M., Garcia-Rios, A., ... Lopez-Miranda, J. (2010). APOA1 and APOA4 gene polymorphisms influence the effects of dietary fat on LDL particle size and oxidation in healthy young adults. *The Journal of Nutrition*, 140(4), 773–8. <http://doi.org/10.3945/jn.109.115964>
- Gómez, R. (2017). The role of population genetics and its implications in the study of complex-. *J Genet Mol Biol*, 1(1), 8–9.
- Gordon, P., & Flanagan, P. (2016). Special Issue: Vascular Disease Risk Factors Smoking: A risk factor for vascular disease. *Journal of Vascular Nursing*, 34(3), 70–86. <http://doi.org/10.1016/j.jvn.2016.04.001>
- Gottlieb, M. G. V, Schwanke, C. H. A., Santos, A. F. R., Jobim, P. F., Müssel, D. P., & da Cruz, I. B. M. (2005). Association among oxidized LDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in a south Brazilian region population. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 4(4), 691–703.
- Guo, X., Xiang, Y., Yang, H., Yu, L., Peng, X., & Guo, R. (2017). Association of the LOX-1 rs1050283 Polymorphism with Risk for Atherosclerotic Cerebral Infarction and its Effect on sLOX-1 and LOX-1 Expression in a Chinese Population. *J Atheroscler Thromb*, 572–582.
- Hackshaw-Mcgeagh, L. E., Penfold, C. M., Walsh, E., Donovan, J. L., Hamdy, F. C., Neal, D. E., ... Lane, J. A. (2015). Physical activity, alcohol consumption, BMI and smoking status before and after prostate cancer diagnosis in the ProtecT trial: Opportunities for lifestyle modification. *International Journal of Cancer*, 137(6), 1509–1515. <http://doi.org/10.1002/ijc.29514>
- Hatzis, G., & Karatolios, K. (2016). The Contribution of Pollutants and Environmental Chemicals in Cardiovascular Disease. In *Cardiovascular Disease* (pp. 119–136). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-803312-8.00006-9>
- He, G., Ye, S., Hui, J., Shen, D., Qi, C., Xu, L., & Qian, Y. (2014). Interrelationships between ALOX5AP polymorphisms, serum leukotriene B4 level and risk of acute coronary syndrome. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0106596>
- Helgadottir, A., Baker, A., Palsson, A., Masson, G., Gudbjartsson, D. F., Magnusson, K. P., ... Thorsteinsdottir, U. (2007). A Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction. *Science*, 316(June), 1491–1494.
- Hirotsugu Ueshima, Akira Sekikawa, Katsuyuki Miura, Tanvir Chowdhury Turin, Naoyuki Takashima, Yoshikuni Kita, M. W. (2011). Cardiovascular Disease and Risk Factors in Asia: A Selected Review. *Circulation*, 118(25), 2702–2709. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790048>. Cardiovascular

- Hoff, H. F., & O'neil, J. A. (1991). Oxidation of LDL: ROle in Atherogenesis. *Klinische Wochen-Schrift*, 69, 1032–1038.
- Högström, G. (2017). *Cardiovascular disease and all-cause mortality. Influence of fitness , fatness and genetic factors. Institutionen för samhällsmedicin och rehabilitering.*
- Hörnsten, C., Weidung, B., Littbrand, H., Carlberg, B., Nordström, P., Lövheim, H., & Gustafson, Y. (2016). High blood pressure as a risk factor for incident stroke among very old people. *Journal of Hypertension*, 34(10), 2059–2065. <http://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001048>
- Ikeda, A., Iso, H., Yamagishi, K., Inoue, M., & Tsugane, S. (2009). Blood pressure and the risk of stroke, cardiovascular disease, and all-cause mortality among Japanese: The JPHC study. *American Journal of Hypertension*, 22(3), 273–280. <http://doi.org/10.1038/ajh.2008.356>
- Imes, C., & Lewis, F. (2014). Family history of cardiovascular disease (CVD), perceived CVD risk, and health-related behavior: A review of the literature. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 29(2), 108–129. <http://doi.org/10.1097/JCN.0b013e31827db5eb.Family>
- Jiménez-Mendoza, E., Vázquez-Salas, R. A., Barrientos-Gutierrez, T., Reynales-Shigematsu, L. M., Labra-Salgado, I. R., Manzanilla-García, H. A., & Torres-Sánchez, L. E. (2018). Smoking and prostate cancer: A life course analysis. *BMC Cancer*, 18(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/s12885-018-4065-7>
- Jones, M. R., Magid, H. S., Al-Rifai, M., McEvoy, J. W., Kaufman, J. D., Hinckley Stukovsky, K. D., ... Navas-Acien, A. (2016). Secondhand Smoke Exposure and Subclinical Cardiovascular Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *American Heart Journal*, 5, 1–15. <http://doi.org/10.1161/JAHA.115.002965>
- Jong, M. C., Hofker, M. H., & Havekes, L. M. (1999). *Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism Functional Differences Between ApoC1, ApoC2, and ApoC3.* Retrieved from <http://www.atvbaha.org>
- Kaushal, R., Pal, P., Alwell, K., Haverbusch, M., Flaherty, M., Moomaw, C., ... Woo, D. (2007). Association of ALOX5AP with ischemic stroke: A population-based case-control study. *Human Genetics*, 121(5), 601–607. <http://doi.org/10.1007/s00439-007-0338-y>
- Koene, R. J., Prizment, A. E., Blaes, A., & Konety, S. H. (2016). Shared risk factors in cardiovascular disease and cancer. *Circulation*, 133(11), 1104–1114. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020406>
- Krogh Christiansen, M., Larsen, S. B., Nyegaard, M., Neergaard-Petersen, S., Ajjan, R., Wü Rtz, M., ... Dalby Kristensen, S. (2017). Coronary artery disease-associated genetic variants and biomarkers of inflammation. *PLoS ONE*, 12(7), 1–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0180365>
- Lamina, C., Friedel, S., Coassin, S., Rueedi, R., Yousri, N. A., Seppälä, I., ...



- Kronenberg, F. (2015). A genome-wide association meta-analysis on apolipoprotein A-IV concentrations. *Human Molecular Genetics*, 25(16), 3635–3646. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddw211>
- Li, S., Yun, M., Fernandez, C., Xu, J., Srinivasan, S. R., Chen, W., ... Li, Y. (2014). Cigarette Smoking Exacerbates the Adverse Effects of Age and Metabolic Syndrome on Subclinical Atherosclerosis: The Bogalusa Heart Study. *PLoS ONE*, 9(5), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0096368>
- Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jay, W. G., Linton, E. F., & Vickers, K. C. (2015). *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis MacRae*. *Endotext*.
- Lippi, G., & Guidi, G. (2002). Risk factors for cardiovascular disease (CVD). *Heart UK*, 166(0820–3946 (Print)), 710.
- Little, J., Higgins, J. P. T., Ioannidis, J. P. A., Moher, D., Gagnon, F., Elm, E. Von, ... Birkett, N. (2009). STrengthening the REporting of Genetic Association studies (STREGA) – an extension of the STROBE statement. *European Journal of Clinical Investigation*, 39(4), 247–266. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02125.x>
- Løkkegaard, E., Jovanovic, Z., Heitmann, B. L., Keiding, N., Ottesen, B., Hundrup, Y. A., ... Pedersen, A. T. (2003). Increased Risk of Stroke in Hypertensive Women Using Hormone Therapy. *Archives of Neurology*, 60(10), 1379. <http://doi.org/10.1001/archneur.60.10.1379>
- López-Salazar, L. I., Hernández-Tobias, E. A., Noris, G., Santana, C., Meraz-Ríos, M. A., Quiroz-Jiménez, N., ... Gómez, R. (2017). *Lipoprotein (a) and Interleukin-6 Genetic Polymorphisms Interactions Associated with Cardiovascular Events in the Mexican Population*.
- Maiolino, G., Rossitto, G., Caielli, P., Bisogni, V., Rossi, G. P., & Calò, L. A. (2013). The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: The myths and the facts. *Mediators of Inflammation*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/714653>
- Mallaina, P., Lionis, C., Rol, H., Imperiali, R., Burgess, A., Nixon, M., & Malvestiti, F. M. (2013). Smoking cessation and the risk of cardiovascular disease outcomes predicted from established risk scores: results of the Cardiovascular Risk Assessment among Smokers in Primary Care in Europe (CV-ASPIRE) study. *BMC Public Health*, 13, 362. <http://doi.org/10.1186/1471-2458-13-362>
- Man, B. L., Baum, L., Fu, Y. P., Chan, Y. Y., Lam, W., Hui, C. F., ... Wong, K. S. (2010). Genetic polymorphisms of Chinese patients with ischemic stroke and concurrent stenoses of extracranial and intracranial vessels. *Journal of Clinical Neuroscience*, 17(10), 1244–1247. <http://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.01.050>
- Maranon, R., & Reckelhoff, J. F. (2013). Sex and gender differences in control of blood pressure. *Clinical Science*, 125, 311–318. <http://doi.org/10.1042/CS20130140>
- Markidan, J., Cole, J. W., Cronin, C. A., Merino, J. G., Phipps, M. S., Wozniak, M. A., & Kittner, S. J. (2018). Smoking and Risk of Ischemic Stroke in Young Men. *Stroke*, 49(5), STROKEAHA.117.018859.

<http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018859>

- Martínez-Cortés, G., Salazar-Flores, J., Fernández-Rodríguez, L., Rubi-Castellanos, R., Rodríguez-Loya, C., & Rangel-Villalobos, H. (2012). Admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on paternal lineages. *Journal of Human Genetics*, *57*, 568–574. <http://doi.org/10.1038/jhg.2012.67>
- Martins-Green, M., Adhami, N., Frankos, M., Valdez, M., Goodwin, B., Lyubovitsky, J., ... Curras-Collazo, M. (2014). Cigarette Smoke Toxins Deposited on Surfaces: Implications for Human Health. *PLoS ONE*, *9*(1), e86391. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0086391>
- Mazaheri, M., Karimian, M., Behjati, M., Raygan, F., & Hosseinzadeh, A. (2017). Association analysis of rs1049255 and rs4673 transitions in p22phox gene with coronary artery disease: A case-control study and a computational analysis. *Ir J Med Sci*. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11845-017-1601-4.pdf>
- McIntyre, T. M., & Hazen, S. L. (2010). Lipid oxidation and cardiovascular disease: Introduction to a review series. *Circulation Research*, *107*(10), 1167–1169. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224618>
- Meraz-ríos, M. A., Majluf-cruz, A., Santana, C., Noris, G., Camacho-mejorado, R., Acosta-saavedra, L. C., ... Gómez, R. (2014). Association of vWA and TPOX Polymorphisms with Venous Thrombosis in Mexican Mestizos. *BioMed Research International*, *2014*, 9. <http://doi.org/10.1155/2014/697689>
- Merhi, M., Demirdjian, S., Hariri, E., Sabbah, N., Youhanna, S., Ghassibe-Sabbagh, M., ... Khazen, G. (2015). Impact of inflammation, gene variants, and cigarette smoking on coronary artery disease risk. *Inflammation Research*, *64*(6), 415–422. <http://doi.org/10.1007/s00011-015-0821-1>
- Merhi, M., Demirdjian, S., Hariri, E., Sabbah, N., Youhanna, S., Ghassibe-Sabbagh, M., & Naoum, J. (2015). Impact of inflammation, gene variants, and cigarette smoking on coronary artery disease risk. *Inflammation Research*, *64*, 415–422. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs00011-015-0821-1.pdf>
- Middelberg, R. P. S., Ferreira, M. A. R., Henders, A. K., Heath, A. C., Madden, P. A. F., Montgomery, G. W., ... Whitfield, J. B. (2011). Genetic variants in LPL, OASL and TOMM40 / APOE- C1-C2-C4 genes are associated with multiple cardiovascular-related traits. *BMC Medical Genetics*, *12*(1), 123. <http://doi.org/10.1186/1471-2350-12-123>
- Ministerio de Salud. (2015). Enfermedades No Transmisibles - Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Retrieved July 20, 2017, from <http://www.minsal.cl/enfermedades-no-transmisibles/>
- Moreno-Estrada, A., Gignoux, C. R., Fernández-López, J. C., Zakharia, F., Sikora, M., Contreras, A. V., ... Bustamante, C. D. (2014). The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science*,

344(6189), 1280–1285. <http://doi.org/10.1126/science.1251688>

- Münzel, T., Camici, G. G., Maack, C., Bonetti, N. R., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 212–229. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>
- Najafi, M., Alipoor, B., Shabani, M., Amirfarhangi, A., & Ghasemi, H. (2012). Association between rs4673 (C/T) and rs13306294 (A/G) haplotypes of NAD(P)H oxidase p22phox gene and severity of stenosis in coronary arteries. *Gene*, 499(1), 213–217. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.02.032>
- Nakamura, K., Barzi, F., Lam, T.-H., Huxley, R., Feigin, V. L., Ueshima, H., ... Woodward, M. (2008). Cigarette Smoking, Systolic Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases in the Asia-Pacific Region. *Stroke*, 39(6), 1694–1702. <http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.496752>
- Niemann, B., Rohrbach, S., Miller, M. R., Newby, D. E., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 230–251. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.043>
- Noris, G., Santana, C., Antonio, M., Lourdes, D., Abraham, M., Magan, M. J. J., ... Marti, G. (2012). Mexican mestizo population sub-structure : effects on genetic and forensic statistical parameters, 10139–10156. <http://doi.org/10.1007/s11033-012-1888-1>
- OCDE. (2015). *Cardiovascular Disease and Diabetes: Policies for Better Health and Quality of Care*. Retrieved from [http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/cardiovascular-disease-and-diabetes-policies-for-better-health-and-quality-of-care\\_9789264233010-en](http://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/cardiovascular-disease-and-diabetes-policies-for-better-health-and-quality-of-care_9789264233010-en)
- Ohira, T., Shahar, E., Chambless, L. E., Rosamond, W. D., Mosley, T. H., & Folsom, A. R. (2006). Risk factors for ischemic stroke subtypes: The atherosclerosis risk in communities study. *Stroke*, 37(10), 2493–2498. <http://doi.org/10.1161/01.STR.0000239694.19359.88>
- Olasky, S. J., Levy, D., & Moran, A. (2012). Second hand smoke and cardiovascular disease in Low and Middle Income Countries: a case for action. *Global Heart*, 7(2), 151–160. <http://doi.org/10.1016/j.ghheart.2012.05.002>
- OMS. (2015). ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. Retrieved July 20, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- OMS. (2017). Tabaco. Retrieved February 28, 2018, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>
- OPS, & OMS. (2015). *Manual Nacional de Abordaje del Tabaquismo Manual PNA en el Primer Nivel de Atención*. Retrieved from <http://www.who.int/fctc/reporting/Annexsixurue.pdf>
- Ou, H. J., Huang, G., Liu, W., Ma, X. L., Wei, Y., Zhou, T., & Pan, Z. M. (2015).

Relationship of the APOA5/A4/C3/A1 gene cluster and APOB gene polymorphisms with dyslipidemia. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 9277–9290.

- Ouatou, S., Ajjemami, M., Charoute, H., Sefri, C., Ghalim, N., Rhaissi, H., ... Barakat, A. (2015). Association analysis of APOA5 rs662799 and rs3135506 polymorphisms with obesity in Moroccan patients. *Pathologie Biologie*, 63(6), 243–247. <http://doi.org/10.1016/j.patbio.2015.09.002>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update, 28(19), 2537–2539. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pereira-Rodríguez, J., Peñaranda-Florez, D., Reyes-Saenz, A., Caceres-Arevalo, K., & Cañizarez-Pérez, Y. (2015). Prevalence of cardiovascular risk factors in Latin America: a review of the published evidence 2010-2015 Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en América Latina: una revisión de la evidencia publicada de 2010 a 2015. *Rev Mex Cardiol*, 26(3), 125–139. Retrieved from [www.medigraphic.com/revmexcardiol](http://www.medigraphic.com/revmexcardiol)
- Portilla, E. C., Muñoz, W., & Sierra, C. H. (2014). Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Rev Colomb Cardiol*, 21(5), 318–326. <http://doi.org/10.1016/j.rccar.2014.09.003>
- Portilla, E., Muñoz, W., & Sierra, C. (2013). Cellular and molecular mechanisms of atherothrombosis. *Revista Colombiana de Cardiología*, 21(1), 35–43.
- Pothineni, N. V. K., Karathanasis, S. K., Ding, Z., Arulandu, A., Varughese, K. I., & Mehta, J. L. (2017). LOX-1 in Atherosclerosis and Myocardial Ischemia: Biology, Genetics, and Modulation. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(22), 2759–2768. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.010>
- Pritchard, J. K., Wen, X., & Falush, D. (2010). Documentation for structure software : Version 2 . 3. *University of Chicago. IL*, 6(3), 321–326. <http://doi.org/10.1002/spe.4380060305>
- Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., De Pascalis, S., & Muscari, A. (2009). The emerging role of cardiovascular risk factor-induced mitochondrial dysfunction in atherogenesis. *Journal of Biomedical Science*, 16, 112. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-16-112>
- Qi, L., & Campos, H. (2011). Genetic Predictors for Cardiovascular Disease in Hispanics. *Trends Cardiovasc Med*, 21(1), 15–20. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.01.002>
- Reckelhoff, J. F. (2018). Sex Differences in Regulation of Blood Pressure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1065, 139–151. [http://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4\\_9](http://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4_9)
- Rivera-Andrade, A., & Luna, M. A. (2014). Trends and Heterogeneity of Cardiovascular Disease and Risk Factors Across Latin American and Caribbean Countries.

*Progress in Cardiovascular Diseases*, 57, 276–285.  
<http://doi.org/10.1016/j.pcad.2014.09.004>

Robertson, S., & Miller, M. R. (2018). Ambient air pollution and thrombosis. *Particle and Fibre Toxicology*, 15(1), 1–16. <http://doi.org/10.1186/s12989-017-0237-x>

Ronald, J., Rajagopalan, R., Ranchalis, J. E., Marshall, J. K., Hatsukami, T. S., Heagerty, P. J., & Jarvik, G. P. (2009). Analysis of recently identified dyslipidemia alleles reveals two loci that contribute to risk for carotid artery disease. *Lipids in Health and Disease*, 8(52). <http://doi.org/10.1186/1476-511X-8-52>

Rooks, C., Faber, T., Votaw, J., Veledar, E., Goldberg, J., Raggi, P., ... Vaccarino, V. (2011). Effects of Smoking on Coronary Microcirculatory Function: A Twin Study. *Atherosclerosis*, 215(2), 500–506.  
<http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.012>

Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., ... Murray, C. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*.  
<http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>

Rui, L., Xiangdong, W., Kazuyuki, A., & Luonan, C. (2014). Early Diagnosis of Complex Diseases by Molecular Biomarkers, Network Biomarkers, and Dynamical Network Biomarkers. *Medicinal Research Reviews*, 34(3), 455–478.  
<http://doi.org/10.1002/med>

Rydberg, D. M., Mejyr, S., Loikas, D., Schenck-Gustafsson, K., Von Euler, M., & Malmström, R. E. (2018). Sex differences in spontaneous reports on adverse drug events for common antihypertensive drugs. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 74(9), 1165–1173. <http://doi.org/10.1007/s00228-018-2480-y>

Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S. C., Kakol, J. M., Stein, L. D., Marth, G., ... International SNP Map Working Group. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409(6822), 928–933. <http://doi.org/10.1038/35057149>

Sack, M. N., Fyhrquist, F. Y., Saijonmaa, O. J., Fuster, V., & Kovacic, J. C. (2017). Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 196–211.  
<http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.034>

Salakhov, R. R., Goncharova, I. A., Makeeva, O. A., Golubenko, M. V, Kulish, E. V, Kashtalap, V. V, ... Puzyrev, V. P. (2014). TOMM40 Gene Polymorphisms Association with Lipid Profile. *ISSN Russian Journal of Genetics Genetika*, 102227954(2), 198–204. <http://doi.org/10.1134/S1022795413120090>

Santana, C., Noris, G., Meraz-Ríos, M. A., Magaña, J. J., Calderon-Aranda, E. S., De Lourdes Muñoz, M., & Gómez, R. (2014). Genetic Analysis of 17 Y-STRs in a Mestizo Population from the Central Valley of Mexico. *Human Biology*, 86(4), 289–312. <http://doi.org/10.13110/humanbiology.86.4.0289>



- Sawamura, T., Wakabayashi, I., & Okamura, T. (2015). LOX-1 in atherosclerotic disease. *Clinica Chimica Acta*, 440, 157–163. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2014.11.016>
- Schousboe, K., Willemsen, G., Kyvik, K. O., Mortensen, J., Boomsma, D. I., Cornes, B. K., ... Harris, J. R. (2003). Sex Differences in Heritability of BMI : A Comparative Study of Results from Twin Studies in Eight Countries, 6(5), 409–421.
- Sciacqua, A., Presta, I., Perticone, M., Tassone, E. J., Andreozzi, F., Quitadamo, M. C., ... Perticone, F. (2014). 3'-UTR OLR1/LOX-1 gene polymorphism and endothelial dysfunction: Molecular and vascular data in never-treated hypertensive patients. *Internal and Emergency Medicine*, 9(3), 273–281. <http://doi.org/10.1007/s11739-012-0857-y>
- Secretaría de Salud. (2016). Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos México 2015. *Comición Nacional Contra Las Adicciones*. Retrieved from [www.gob.mx/salud](http://www.gob.mx/salud)
- Seidman, M. A., Mitchell, R. N., & Stone, J. R. (2014). Pathophysiology of Atherosclerosis. In *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease* (pp. 221–237). San Diego, USA: Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-405206-2.00012-0>
- Sheweita, S. A., Baghdadi, H., & Allam, A. R. (2011). Role of Genetic Changes in the Progression of Cardiovascular Diseases. *Int J Biomed Sci Wwww.Ijbs.Org*, 7(4). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614847/pdf/IJBS-7-238.pdf>
- Silva, I. Da, & Sanches, L. (2010). Impacto de la Proteína-C Reactiva en el Riesgo Cardiovascular de Adolescentes. *Arq Bras ...*, (Imc), 567–573.
- Sociedad Española de Cardiología. (2010). Informe de la salud cardiovascular en España en el contexto europeo. *Fundación Española Del Corazón*. Retrieved from <http://secardiologia.es/images/stories/file/salud-cardiovascular-espana-europa.pdf>
- Souiden, Y., Mallouli, H., Meskhi, S., Chaabouni, Y., Rebai, A., Chéour, F., & Mahdouani, K. (2016). MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. *Biological Research*, 49(22), 1–12. Retrieved from [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828869/pdf/40659\\_2016\\_Article\\_83.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4828869/pdf/40659_2016_Article_83.pdf)
- Spronk, H., Padro, T., Siland, J., Prochaska, J., Winters, J., van der Wal, A., ... ten Cate, H. (2018). Atherothrombosis and Thromboembolism: Position Paper from the Second Maastricht Consensus Conference on Thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 118(02), 229–250. <http://doi.org/10.1160/TH17-07-0492>
- Stanger, O., Renner, W., Khoschorur, G., Rigler, B., & Wascher, T. C. (2001). NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease. *Clinical Physiology*, 21(6), 718–722. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2281.2001.00381.x>

- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2(5), 70–78. <http://doi.org/10.1157/13059826>
- Texas Heart Institute. (2016). Accidente cerebrovascular. Retrieved August 7, 2017, from [http://www.texasheart.org/HIC/Topics\\_Esp/Cond/strok\\_sp.cfm](http://www.texasheart.org/HIC/Topics_Esp/Cond/strok_sp.cfm)
- Tsimikas, S. (2006). LIPOPROTEINS AND OXIDATION. In *Antioxidants and Cardiovascular Disease* (pp. 17–48). Retrieved from [https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F0-387-29553-4\\_2.pdf](https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F0-387-29553-4_2.pdf)
- Tsimikas, S., & Miller, Y. I. (2011). Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*, 17(1), 27–37. <http://doi.org/BSP/CPD/E-Pub/000306> [pii]
- Underwood, P. C., Chamarthi, B., Williams, J. S., Sun, B., Vaidya, A., Raby, B. A., ... Williams, G. H. (2012). Replication and meta-analysis of the gene-environment interaction between body mass index and the interleukin-6 promoter polymorphism with higher insulin resistance. *Metabolism*, 61(5), 667–671. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2011.09.018>
- United States Department of Health and Human Services. (2014). The Health Consequences of Smoking—50 Years of Progress A Report of the Surgeon General. *A Report of the Surgeon General*, 1081.
- Valerio, L., Peters, R. J., Zwinderman, A. H., & Pinto-Sietsma, S. J. (2016). Association of Family History With Cardiovascular Disease in Hypertensive Individuals in a Multiethnic Population. *Journal of the American Heart Association*, 5(12), 1–10. <http://doi.org/10.1161/JAHA.116.004260>
- Wang, G., Liu, R., & Zhang, J. (2014). The arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (ALOX5AP) gene SG13S114 polymorphism and ischemic stroke in Chinese population: A meta-analysis. *Gene*, 533(2), 461–468. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.018>
- Wang, X., & Peter, K. (2017). Molecular Imaging of Atherothrombotic Diseases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, ATVBAHA.116.306483. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.306483>
- Wenger, N. K. (2012). Gender disparity in cardiovascular disease: Bias or biology? *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10(11), 1401–1411. <http://doi.org/10.1586/erc.12.133>
- Wong, W.-M. R., Stephens, J. W., Acharya, J., Hurel, S. J., Humphries, S. E., & Talmud, P. J. (2004). The APOA4 T347S variant is associated with reduced plasma TAOS in subjects with diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research*, 45(8), 1565–1571. <http://doi.org/10.1194/jlr.M400130-JLR200>
- Wong, W. M. R., Gerry, A. B., Putt, W., Roberts, J. L., Weinberg, R. B., Humphries, S. E., ... Talmud, P. J. (2007). Common variants of apolipoprotein A-IV differ in their ability to inhibit low density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis*, 192(2), 266–274.

<http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.017>

World Heart Federation. (2016). *Factsheet: Enfermedades Cardiovasculares en México*. World Heart Federation.

Xu, M., Xu, M., Han, L., Yuan, C., Mei, Y., Zhang, H., ... Zhu, B. (2017). Role for functional SOD2 polymorphism in pulmonary arterial hypertension in a Chinese population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3). <http://doi.org/10.3390/ijerph14030266>

Yao, Q., Zhang, C., Zhang, X., Yuan, R., Li, J., Sun, F., & Zhou, C. (2014). Synergistic effect of ALOX5AP polymorphisms and cigarette smoking on the risk of atherosclerotic cerebral infarction in a Northern Han Chinese population. *Journal of Clinical Neuroscience*, 21(6), 975–979. <http://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.08.023>

Ye, F., Liu, N. N., Zheng, Y. Q., Zhang, W. J., Wang, C. M., Xu, Y., ... Wang, J. (2014). Three polymorphisms of ALOX5AP and risk of ischemic stroke in Chinese: Evidence from a meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences*, 336(1–2), 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2013.10.013>

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), 1875–1882. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038>

Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., & Avezum Alvaro. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*, 364(93), 937–952. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)

Zhou, J., Xu, L., Huang, R. S., Huang, Y., Le, Y., Jiang, D., & Duan, S. (2013). Apolipoprotein A5 gene variants and the risk of coronary heart disease: A case-control study and meta-analysis. *Molecular Medicine Reports*, 8, 1175–1182. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013.1642>