



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

PAPEL DE LAS VARIANTES POLIMORFICAS DE LOS
GENES *EDN-1* Y *ABCA1* EN EL DESARROLLO DE LA
ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA PREMATURA
EN POBLACIÓN MEXICANA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ARACELI BAUTISTA GRANDE

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESEIDENTE:	M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ*
VOCAL:	DRA. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA**
SECRETARIO:	DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN*
SUPLENTE:	DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ*
SUPLENTE:	M en C. HUGO LÓPEZ MUÑOZ*

* Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM).

** Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM).

DEDICATORIAS

A Dios por prestarme vida y salud hasta este momento y culminar uno de mis más anhelados sueños.

A mi mamá Rosa María de la cual estoy orgullosa, una mujer de lucha que venciendo los obstáculos a sabido crear en sus hijos gentes de bien, a esa mujer que a sobrepasado lo imposible y nos dio lo suficiente, gracias mamita por tus consejos, apapachos, regaños por estar siempre con nosotros a pesar de cómo te sientas, por tener un consejo para cada situación, por salvarnos de equivocaciones y más aún, por brindarme tu amor incondicional, por ser mi cómplice y mi amiga. A la cabecera de mi familia, gracias.

A mi papá Gabriel del cual también estoy orgullosa, por que has sabido hacer de nosotros gente de provecho, gracias papa por proveernos de lo suficiente. Gracias por que estar siempre presente en las situaciones difíciles, por ayudarnos sin poner pretextos, por desvelarte conmigo cuando hacía tarea, por preocuparte por nosotros, sé que aunque no nos lo demuestres nos amas, y yo te amo también. Gracias papito por que nos demostraste que nosotros somos más importantes que cualquier cosa. A los dos seres más importantes de mi vida, nunca me cansaré de agradecerles lo mucho que han hecho por mí, ¡Los Amo!

A mis hermanos Mario, Claudia, Oscar y Rosalina, por que con sus ejemplos de vida, me han ayudado a ser la persona que soy ahora, gracias por compartir conmigo sus momentos más felices y los más difíciles, siempre estaré con ustedes para apoyarlos: Los Adoro.

A mis cuñados, Federico, Claudia y Vero, gracias por apoyarme, por sus buenos consejos, por que son también mi ejemplo de vida, los admiro.

A mis 13 enanos, Fred, Fer, Ricky, Gaby, Jeny, Alain, Vale, Karla, Oscar A, Karen, Dany, Santy y Marifer, mis pequeños traviesos, que son mi inspiración para crecer.

A mis segundos padres, mi tío Daniel y mi tía Yolanda, que son mí mejor ejemplo a seguir, gracias por brindarme su apoyo, su cariño, sus consejos, por creer en mí. Los admiro y los quiero, gracias por estar en los momentos más alegres y más difíciles, este triunfo se los dedico por que son personas importantes en mi carrera y en mi vida. Por que se que nunca estaré sola y siempre podré contar con ustedes ¡Los Adoro!

A mis queridos tíos: Ricardo, Eloisa y Martha que son los mejores, gracias por su apoyo, por sus consejos, y por estar con mi familia y conmigo en los momentos más difíciles.

A mis 4 abuelitos, por estar conmigo en estos momentos.

A mis primos Daniel, Clarita y Patsy gracias por su apoyo. A mis primas gracias por su apoyo, por guardar mis secretos, por ser mis mejores amigas.

A Jaime Ángel, sabes lo importante que eres para mí, gracias por todo.

A mis amigos; Alma, Caro, Cesia, Janet y Dan, gracias por los mejores momentos de la facultad, por sus consejos y su apoyo. Gracias por permitirme conocerlos y compartir momentos inolvidables.

A Eliseo, Rey, Yoyiz, Karla, Ely e Iván por brindarme su amistad. Gracias a todos por estar conmigo, y por todos los momentos felices y tristes: Los Quiero.

A Bladimir, gracias por tu apoyo y por todo lo que has hecho por mí.

A Lupita, gracias por escucharme, por darme consejos, por compartir las mismas cosas, por guardar mis secretos y más aun por ser mi amiga.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, Erika y Mactzil, gracias por su apoyo, tanto en lo académico como en lo personal, las admiro y quiero. Gracias por su amistad sincera.

A mis mejores amigas de infancia, Rosalina y Lizette gracias por darme palabras de aliento cuando más lo necesito, por estar siempre a mi lado y por hacerme ver mis errores. ¡Las Amo!

A una persona importante para mi, la maestra Angelina Geniz, gracias por sembrar en cada uno de sus alumnos la esencia y el conocimiento de su país, por enseñarnos a amar y poner en alto a nuestra universidad, se que estaría orgullosa por que un triunfo de sus alumnos era un triunfo personal. Donde quiera que esté maestra: Gracias. Nunca la olvidaré.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Ma. Teresa Villarreal Molina, por esta gran oportunidad de crecer en lo profesional, por creer en mí, por permitirme formar parte de su primera generación de investigadores, por apoyarme constantemente en la realización de esta tesis.

Al Dr Samuel Canizales Quinteros, por sus importantes aportaciones y apoyo en la realización de esta tesis, y aspectos técnicos de este proyecto.

A la Dra. Ma Teresa Tusié Luna, por su apoyo y sus aportaciones a este trabajo.

A Marisela Villalobos, Tere Flores y Leonor Jacobo por su paciencia y por compartirme su conocimiento en la enseñanza de las técnicas.

Al Instituto Nacional de Neurología, a la Dra. Yescas por su apoyo en aspectos técnicos de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez, al Dr. Guillermo Cardoso, a la Dra. Rocío Alvarado por su apoyo en la recolección de datos para este proyecto y por permitirme trabajar en su laboratorio.

A las instituciones y a los doctores participantes en el proyecto GEA, Dr. Carlos Posadas, Dr. Gilberto Vargas Alarcón al Dr. Erick Kimura del instituto Nacional de Cardiología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Dra. Ma, Teresa Villarreal Molina, por permitirme conocer su trabajo y formar parte de él.

A todo el personal en general de la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del INCMNSZ.

A los miembros de jurado: M. en C. Luís Sánchez Sánchez, Dra. Ma. Teresa Villarreal Molina, Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, Dra. Ma, del Carmen García Rodríguez y al M. en C. Hugo López Muñoz, por la revisión crítica del presente trabajo.

A todos mis profesores responsables de mi formación académica.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Enfermedad Arterial Coronaria (EAC).....	11
1.1.1 Definición.....	11
1.1.2 Clasificación de la EAC.....	12
1.2 Aterosclerosis.....	12
1.3 Fisiopatología.....	13
1.3.1 Ruptura de Placa y Formación de Trombos.....	14
1.4 Etiología de la Aterosclerosis y la EAC.....	15
1.5 Factores de Riesgo.....	16
1.6 Componente Genético de la EAC.....	16
1.7 Gen <i>ABCA1</i>	18
1.7.1 Variante R230C.....	19
1.8 Gen Endotelina-1 (<i>EDN-1</i>).....	20
1.8.1 Estructura y Biosíntesis.....	21
1.8.2 Regulación de la <i>EDN-1</i>	22
1.8.3 Polimorfismos de <i>EDN-1</i> y su asociación a diversas enfermedades.....	22
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo General.....	26
4.2. Objetivos Particulares.....	26
V. METODOLOGÍA.....	27
5.1 Población de estudio.....	27
5.2 Parámetros Bioquímicos.....	28
5.3 Extracción de Ácidos nucleicos y Cuantificación de DNA.....	29
5.4 Genotipificación de los SNPs de los genes <i>EDN-1</i> y <i>ABCA1</i>	29
5.5 Fundamento de la técnica.....	30

5.5.1 Sondas tipo Taqman.....	31
5.5.2 Ensayo de discriminación alélica.....	31
5.6 Análisis Estadístico.....	33
VI. RESULTADOS.....	34
6.1 Población.....	34
6.2 Características Generales de la Población.....	34
6.3 Genotipificación de la variante R230C del Gen <i>ABCA1</i>	36
6.4 Genotipificación de rs5370 del Gen <i>EDN-1</i>	37
6.5 Frecuencias Alélicas y Genotípicas.....	38
6.6 Asociación de la Variante R230C a otros Parámetro Bioquímicos y Metabólicos.....	40
6.7 Asociación del polimorfismo rs5370 <i>EDN-1</i> a otros Parámetros Bioquímicos y Metabólicos.....	43
VII. DISCUSION.....	46
7.1 Características Generales de los Grupos de estudio.....	46
7.2 Limitaciones de los Estudios de Asociación Caso-Control.....	47
7.3 Asociación de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i> con EAC.....	47
7.4 Asociación con los niveles de colesterol, obesidad, hipertensión y síndrome metabólico.....	50
7.5 Asociación de rs5370 del gen <i>EDN-1</i> con la EAC.....	50
VIII. CONCLUSIONES.....	53
IX. PERSPECTIVAS.....	54
X. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.....	55
XI. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espectro Arterial.....	11
Figura 2. Etapas en el establecimiento de la placa ateromatosa.....	14
Figura 3. Ruptura de la pared endotelial y la formación del trombo en arteria con lesión ateromatosa.....	15
Figura 4. Síntesis de endotelina. Factores de estimulación e inhibición.....	21
Figura 5. Gráfica de un ensayo de discriminación alélica para la genotipificación de muestras por PCR en tiempo real obtenida mediante el programa SDS 2.2.....	32
Figura 6. Genotipificación de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i> por sondas Taqman.....	36
Figura 7. Genotipificación de la variante rs5370 del gen <i>EDN-1</i> por sondas Taqman.....	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la presentación clínica de la enfermedad arterial coronaria.....	12
Tabla 2. Algunos genes asociados a la enfermedad arterial coronaria en otras poblaciones.....	17
Tabla 3. Criterios de la ATP-III para el diagnóstico de síndrome metabólico...	29
Tabla 4. Generalidades de los SNPs estudiados.....	30
Tabla 5. Comparación de los parámetros bioquímicos y antropométricos de los individuos de acuerdo al grupo de estudio.....	35
Tabla 6a. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i> en los diferentes grupos de estudio.....	39
Tabla 6b. Frecuencias alélicas y genotípicas de la variante rs5370 del gen <i>EDN-1</i> de acuerdo al grupo de estudio.....	39
Tabla 6.1. Asociación de los diferentes alelos de riesgo con EAC prematura y Aterosclerosis Subclínica.....	39
Tabla 7. Comparación de los parámetros bioquímicas en la población de controles, de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i>	41
Tabla 8. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de casos, de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen <i>ABCA1</i>	42
Tabla 9. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de controles, de acuerdo a la presencia de la variante rs5370 del gen <i>EDN-1</i>	44
Tabla 10. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de casos, de acuerdo a la presencia de la variante rs5370 del gen <i>EDN-1</i>	45

RESUMEN

La variante R230C del gen transportador de colesterol *ABCA1* ha sido asociada a niveles bajos de HDL-C, diabetes mellitus, síndrome metabólico y obesidad, todos ellos factores de riesgo para la enfermedad arterial coronaria (EAC). La variante rs5370 del gen endotelina-1 (*EDN-1*) se asoció a niveles de HDL-C, hipertensión, resistencia a la insulina y a enfermedad arterial coronaria en diferentes poblaciones. La EAC y su principal complicación el infarto al miocardio, es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo. La EAC resulta de aterosclerosis, que es la acumulación de depósitos grasos a lo largo de la capa más profunda de la arteria coronaria, formando placas de ateroma que las va estrechando y endureciendo hasta obstruirlas. La EAC puede presentarse como aterosclerosis subclínica (asintomática, con oclusión parcial que no causa falta de oxígeno) o bien como infarto al miocardio (sintomática, con oclusión completa y necrosis del miocardio). En este trabajo se analizó la asociación de los polimorfismos R230C del gen *ABCA1* y rs5370 del gen *EDN-1* como posibles alelos de susceptibilidad para el desarrollo de la EAC en población mexicana. Estos polimorfismos se genotipificaron por PCR tiempo real en 236 pacientes con EAC prematura (casos), y en 356 individuos aparentemente sanos sin antecedentes heredofamiliares de EAC prematura (controles). A todos los participantes se les midió índice de calcio coronario por tomografía, y se extrajo una muestra de sangre periférica para mediciones bioquímicas y extracción de DNA en sangre. Entre el grupo de controles se identificaron a 95 individuos con aterosclerosis subclínica (AS), por lo que se analizaron como grupo independiente. Se evaluó la asociación de estos polimorfismos a diversos rasgos cuantitativos utilizando el programa SPSS v15. Aunque en esta muestra R230C mostró asociación al síndrome metabólico y menores niveles de HDL-C, a diferencia de lo esperado el alelo C230 fue menos frecuente en casos (6.3%) que en controles (9.45%) y sujetos con AS (12.10%), confiriendo protección contra eventos isquémicos (EAC vs AS: OR=0.477, IC95% 0.249-0.913, P=0.025; EAC vs controles: OR=0.584, IC95% 0.324-1.052, P=0.079). Rs5370 no mostró asociación a EAC prematura o AS, pero sí a menores niveles de glucosa (P=0.028). En conclusión, la variante R230C no aumenta el riesgo a desarrollar EAC prematura sintomática, parece

disminuirlo. Debe estudiarse si se asocia a EAC no prematura, o si protege contra el infarto al miocardio a través de otro mecanismo. Rs5370 del gen EDN-1 no parece jugar un papel importante en la susceptibilidad a EAC en población mexicana, aunque debe analizarse su papel en el desarrollo de otros rasgos metabólicos.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)

La enfermedad arterial coronaria (EAC) y su principal complicación, el infarto al miocardio, es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo (López *et al.*, 2006), por lo que es fundamental entender sus causas e identificar personas en riesgo a padecerla.

1.1.1 Definición

El término Enfermedad Arterial Coronaria abarca una gama de enfermedades que son resultado de la presencia de placas de ateroma en las arterias coronarias, lo cual puede eventualmente causar obstrucción de la arteria causando síntomas por la falta de oxígeno al miocardio. La oclusión puede ser parcial causando isquemia (angina de pecho), o puede ser permanente causando necrosis (infarto) del miocardio (Figura 1). Las placas de ateroma pueden ser estables (con poco contenido lipídico y con una capa fibrosa gruesa) o inestables (con alto contenido lipídico y una capa fibrosa delgada). Cuando la placa inestable sufre ruptura, se liberan factores protrombóticos y vasoconstrictores que aumentan la probabilidad de la oclusión completa de la arteria (Ashley, 2004).

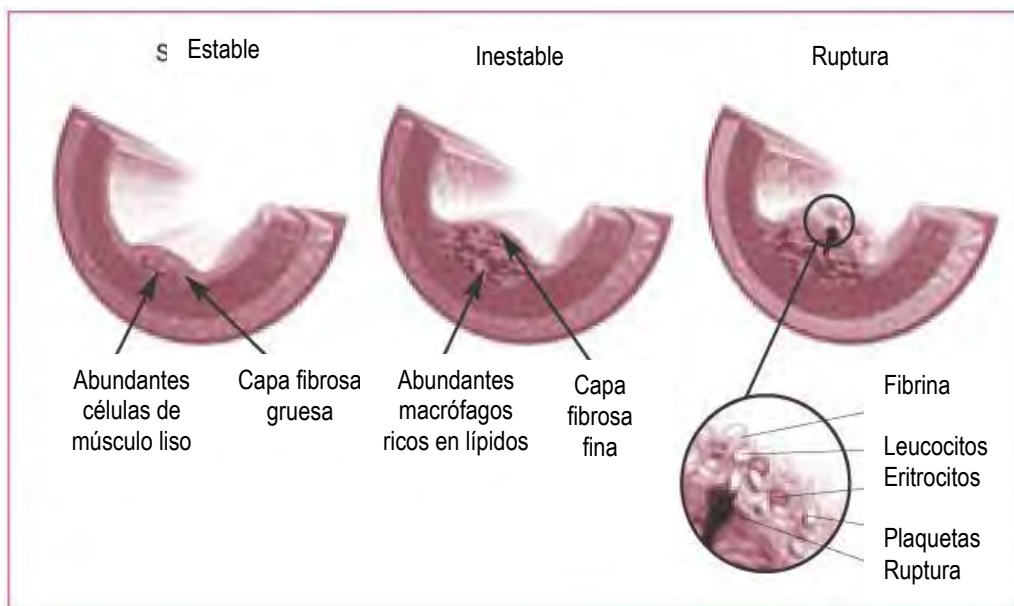


Figura 1. Espectro Arterial: Placa estable, placa inestable y ruptura de la placa ateromatosa, engrosamiento de la pared arterial, ruptura y formación del trombo (Obtenida de Ashley, 2004).

1.1.2 Clasificación de la EAC

La presentación clínica de la enfermedad arterial coronaria se puede clasificar como se muestra en la tabla 1 (Ashley, 2004):

Presentación	Evento Vascular
Aterosclerosis Subclínica	Aterosclerosis coronaria asintomática, oclusión parcial que no causa falta de oxígeno al miocardio.
Angina estable	No hay ruptura de placa, pero la oclusión es sintomática o restrictiva estable.
Síndromes Coronarios Agudos	Ruptura de placa con oclusión transitoria o incompleta.
Infarto al Miocardio	Ruptura de placa con oclusión completa y necrosis de tejido.

Tabla 1. Clasificación de la presentación clínica de la enfermedad arterial coronaria y su evento vascular (Obtenida de Ashley, 2004).

1.2 Aterosclerosis

La EAC resulta de aterosclerosis, un proceso particularmente complejo donde intervienen factores tanto genéticos como ambientales (Assman *et al.*, 2002; Lloyd-Jones *et al.*, 2004). El proceso de aterosclerosis se caracteriza por la acumulación de depósitos grasos a lo largo de la capa mas profunda de la arteria coronaria. El colesterol tiende a fijarse en las paredes de las arterias, formando placas de ateroma, que las va estrechando y endureciendo hasta obstruirlas, esta afectación puede ocurrir a lo largo de todo el árbol arterial y afectar a diversos órganos (cerebro, extremidades inferiores, corazón, etc.).

Aunque en las últimas décadas ha progresado de manera significativa el conocimiento de su fisiopatología, queda aún mucho por entender, particularmente sobre los mecanismos moleculares que explican muchos de los factores de riesgo establecidos para la aterogénesis (Libby, 2005).

1.3 Fisiopatología

La aterogénesis se desarrolla a lo largo de muchos años, y aunque inicialmente es asintomática, la mayoría de las veces provoca episodios clínicos agudos y graves, los cuales constituyen la primera manifestación sintomática de la enfermedad. La formación de la lesión ateromatosa esta dada por varios procesos que se describen a continuación (Libby, 2005) (Figura 2):

Formación de la estría grasa. Es la acumulación localizada de lipoproteínas en la capa íntima arterial. Esta acumulación se debe a que la capa endotelial de la íntima tiene contacto con la sangre, y la hipercolesterolemia facilita la acumulación de partículas LDL acompañadas de componentes de la matriz extracelular como los proteoglucanos. El secuestro dentro de la íntima separa a las lipoproteínas de los antioxidantes plasmáticos, lo cual favorece su modificación oxidativa y así desencadenan la respuesta inflamatoria que provoca la formación de lesiones.

Reclutamiento de leucocitos. Los monocitos y los linfocitos son los principales leucocitos hallados en una placa de ateroma. La oxidación de las LDL estimula la producción de moléculas de adhesión que activan los receptores de los monocitos circulantes, causando su acumulación en el subendotelio. Una vez adheridos a la superficie de la célula endotelial arterial establecen su resistencia en la íntima.

Formación de células espumosas. Una vez dentro de la íntima, los fagocitos mononucleares se transforman en macrófagos. Los macrófagos acumulan en su interior partículas de lipoproteínas a través de una endocitosis mediada por receptores, transformándose en células espumosas cargadas de lípidos. La acumulación de los lípidos y la tendencia para formar una placa de ateroma tiene lugar cuando la cantidad de los lípidos que penetran en la pared arterial por medio de los fagocitos mononucleares es mayor que la cantidad de lípidos que salen de ella.

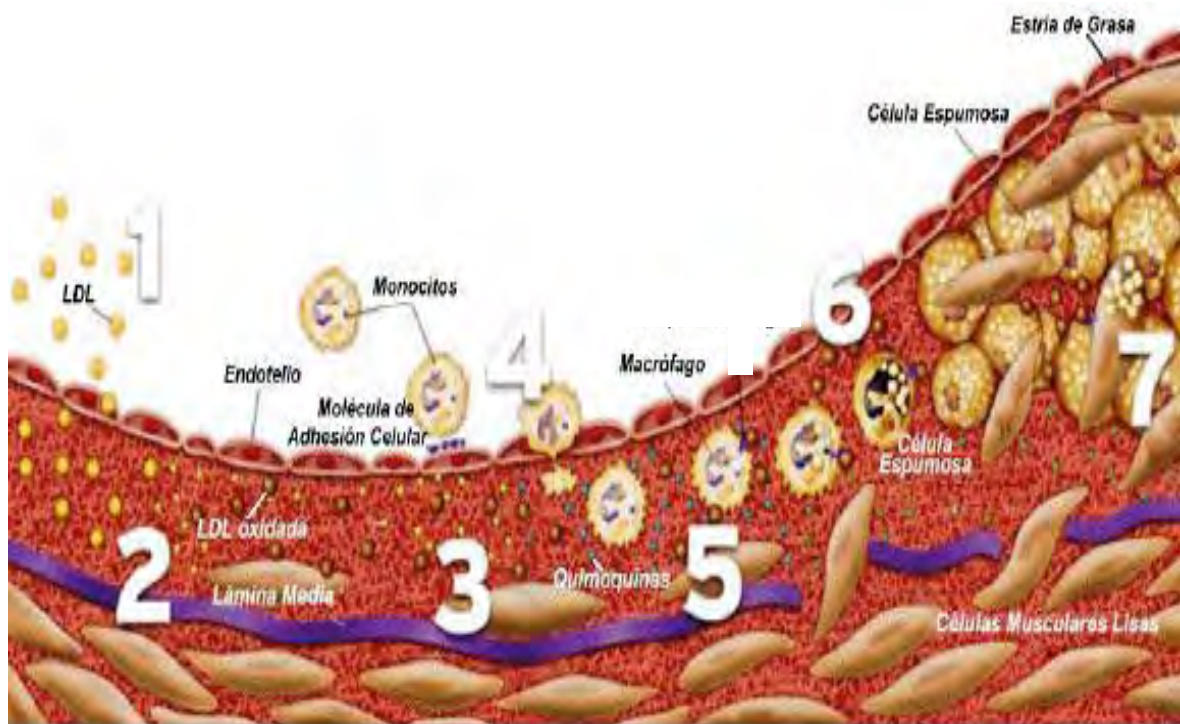


Figura 2. Etapas en el establecimiento de la placa aterosclerótica. 1 y 2. Entrada de lipoproteínas al subendotelio y su posterior modificación. 3 y 4. Liberación de factores de crecimiento y citocinas que promueven la llegada de monocitos hacia la intima y su diferenciación en macrófagos. 5 y 6. Formación de células espumosas debido a las lipoproteínas modificadas y oxidadas. 7. Establecimiento de la estría grasa, debido a la acumulación de células espumosas (Obtenida de www.scielo.org.ve/img/fbpe/ic/v50n1/art12fig3.gif).

1.3.1 Ruptura de Placa y Formación de Trombos

Una vez formada la placa aterosclerótica estará sometida a la acción de una combinación de factores que inducen su ruptura, destacándose la inflamación local, la degradación del colágeno de la capa fibrosa y las alteraciones vasomotoras. Una vez rota, la exposición del material colágeno-lipídico a la sangre llevará a la trombosis parcial o completa del vaso coronario (Fuster *et al.*, 1990). Las placas vulnerables tienen un contenido lipídico voluminoso, blando y formado por ésteres de colesterol, su capa fibrosa es fina y el contenido de colágeno es reducido, además de poseer elevadas concentraciones de células inflamatorias (Falk *et al.*, 1995) (Figura 3).

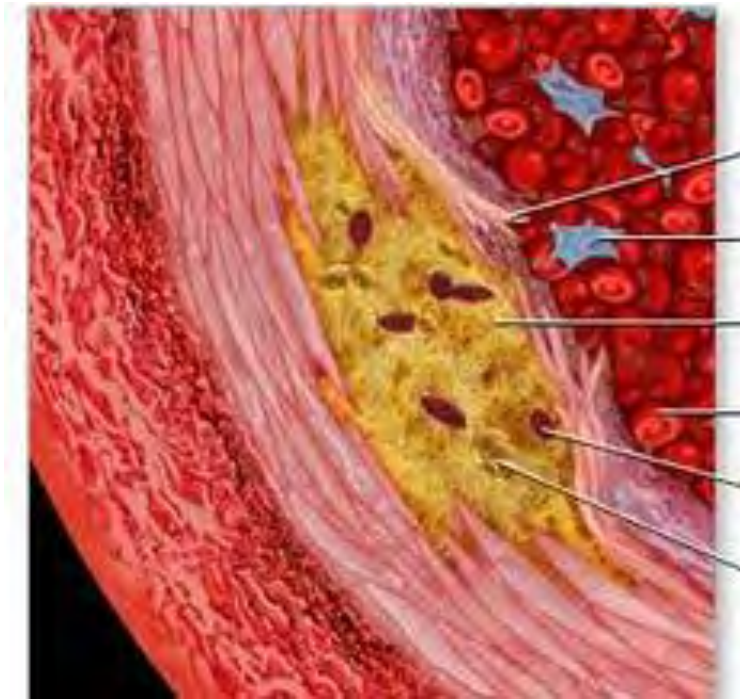


Figura 3.

Pasos para la ruptura de la pared endotelial y la formación del trombo en arteria con lesión aterosclerótica.

1. Desgarramiento de la pared arterial
2. Macrófago.
3. Depósitos de colesterol.
4. Glóbulos rojos.
5. Células espumosas.
6. Depósitos de grasa.

Obtenida de 2.bp.blogspot.com/.../tGHZsqGKe1A/s320/18018.jpg

1.4 Etiología de la Aterosclerosis y la EAC

Una proporción reducida de casos de EAC pueden atribuirse a enfermedades monogénicas. Sin embargo la vasta mayoría de los casos son de etiología multifactorial, donde participan una gran cantidad de factores de riesgo tanto ambientales como hereditarios (Yusuf *et al.*, 2004; Marenberg *et al.*, 1994). Se calcula en general que la EAC tiene una heredabilidad de ~ 50%. (López *et al.*, 2006; Paré *et al.*, 2008), mientras que estudios en gemelos reportan que la heredabilidad de eventos fatales por EAC es del 57% para hombres y del 38% para mujeres en población sueca (Zradovic *et al.*, 2002). Por otro lado, varios estudios muy extensos han demostrado que el tener antecedentes familiares de EAC prematura es un importante factor de riesgo para padecer la enfermedad, aún después de ajustar por otros factores de riesgo conocidos como el tabaquismo (Myers *et al.*, 1990). La complejidad genética de la susceptibilidad a padecer EAC parece ser considerable, tomando en cuenta además que cada uno de los numerosos factores de riesgo clínicos para la EAC tiene su propia base genética compleja.

1.5 Factores de Riesgo

Entre los factores clínicos de riesgo para esta entidad según el Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, se encuentra la hipertensión arterial (presión arterial $\geq 140/90$ mmHg o estar en tratamiento antihipertensivo), las dislipidemias como la hipercolesterolemia (Colesterol Total en sangre ≥ 200 mg/100ml), hipoalfalipoproteinemia (bajas concentraciones de colesterol HDL < 40 mg/100 ml), hipertrigliceridemia (triglicéridos > 150 mg/dL), la diabetes mellitus, tabaquismo, antecedentes familiares de EAC prematura (< 55 años en hombres y < 65 años mujeres), obesidad (IMC ≥ 30 kg/m²), sedentarismo y régimen alimentario aterógeno (Fruchart *et al.*, 2004). También contribuyen de manera importante los estados protrombóticos y proinflamatorios (Ross *et al.*, 1999; Libby, 2002).

1.6 Componente Genético de la EAC

Diversos estudios principalmente en poblaciones caucásicas han buscado encontrar variantes genéticas que confieren susceptibilidad a padecer EAC y aterosclerosis utilizando diferentes estrategias que se complementan entre sí, (estudios de ligamiento y asociación caso-control, tanto en genes candidato como por escrutinio del genoma completo). Aunque algunos resultados no siempre han sido consistentes, la evidencia apunta a que tanto polimorfismos comunes como variantes raras en genes que participan en el metabolismo de lípidos y en la cascada inflamatoria están involucrados en la etiología de la EAC (Christensen *et al.*, 2007).

Actualmente se han identificado más de 80 diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de susceptibilidad para la EAC (Tousoulis *et al.*, 2008). Hasta el momento, la vasta mayoría de esos SNPs se encuentran en genes involucrados en el metabolismo de lípidos/carbohidratos, la función endotelial, inflamación, y trombosis/fibrinólisis (Tabla 2).

Gen	Polimorfismo	Proteína que codifica	Asociación	Referencia
ApoE	ε2, ε3, ε4	ApoE	Metabolismo de lípidos	Schmitz <i>et al.</i> , 2007
OLR	150 1 G>C	OLR1	Metabolismo de lípidos	Tatsuguchi <i>et al.</i> , 2003
CETP	TaqIB	CETP	Metabolismo de lípidos	Liu <i>et al.</i> , 2002
LPL	Gly188Glu, Asp9Asn, Asn291Ser, Ser447Ter	LPL	Metabolismo de lípidos	Wittrup <i>et al.</i> , 1999
MTHFR	677 C>T	MTHFR	Trombosis y fibrinólisis	Klerk <i>et al.</i> , 2002
IL-6	572 G>C, 598 C>T	IL-6	Trombosis y fibrinólisis	Malarstig <i>et al.</i> , 2007
LTA		LTA	Inflamación	Ozaki <i>et al.</i> , 2002
IL-18	SNP rs2043055	IL-18	Inflamación	Bis <i>et al.</i> , 2008

Tabla 2. Algunos genes asociados a la enfermedad arterial coronaria en otras poblaciones (Obtenida de Tousoulis *et al.*, 2008).

La población mexicana representa un caso especial. Primeramente, la población mexicana tiene una muy alta incidencia de enfermedades que son factores de riesgo para la EAC, como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y las dislipidemias (ENSANUT 2006; Aguilar-Salinas *et al.*, 2001). Algunos estudios genéticos han aportado evidencia de que esta alta incidencia se debe a nuestro componente genético amerindio (Cossrow *et al.*, 2004). Además, se han encontrado marcadores genéticos que parecen ser exclusivos de poblaciones amerindias y sus derivadas (como la mestiza mexicana) (Schroeder *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2007). Sin embargo, existen relativamente pocos estudios sobre las bases genómicas de la EAC y la aterosclerosis en población mexicana.

Wang *et al* 2005(a) realizaron un análisis de ligamiento para el grosor de la íntima-media de la arteria carótida (IMT) en población México-americana, encontrando ligamiento en 3 locus, 2q33-35, 6p12-p22 y 13q32-33. Encontraron que existen varios genes candidato en estas regiones como el gen *NOSTRIN* y diversos genes más relacionados con el proceso inflamatorio en la

región 6p12. En esta región también se encuentra *EDN-1*, que ha sido asociado a la hipertensión arterial en varios estudios (Kaetsu *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004; Goodarzi *et al.*, 2005), en la región 6p21 encontraron que el gen de la calpaína 10 (*CAPN10*) previamente asociado a diabetes en población mexicana, también se asocia aterosclerosis subclínica. Otros estudios en esta población han encontrado asociación de diferentes genes con factores de riesgo para la EAC y la aterosclerosis, como el gen *LPL* asociado a resistencia a la insulina (Goodarzi *et al.*, 2005), *USF1* asociado a la hiperlipidemia familiar combinada (Huertas-Vázquez *et al.*, 2005), y *ABCA1* asociado a obesidad, hipoalfalipoproteinemia, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (Villarreal- Molina *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2008). Sin embargo no se ha analizado si se asocian a la EAC en población mexicana.

1.7 Gen *ABCA1*

El gen *ABCA1* (por sus siglas en inglés ATP—binding cassette transporter A1) se encuentra en el cromosoma 9p21 y tiene 147,153 pares de bases y 50 exones, codificando una proteína de membrana dependiente de ATP de 2261 aminoácidos, cuya función es transportar principalmente colesterol y fosfolípidos a través de membranas. Al promover el eflujo de colesterol hacia la apoproteína A1 (principalmente en enterocitos y hepatocitos), forma lipoproteínas de alta densidad (HDL). En macrófagos, la función de *ABCA1* no contribuye de manera importante para los niveles de HDL-C plasmáticos, sin embargo es fundamental para evitar la formación de células espumosas y depósitos de colesterol en las arterias, previniendo la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica (Hamon *et al.*; 2000, 2006; Zha *et al.*; 2003).

Las mutaciones que suprimen la función del gen causan la enfermedad de Tangier, entidad autosómica recesiva poco frecuente que cursa con niveles muy bajos de HDL-C (< 5 mg/dL), formación de depósitos de colesterol en macrófagos tisulares y en otros tejidos, así como un riesgo alto de EAC prematura (Rust *et al.*; 1999, Bodzioch *et al.*; 1999, Brooks-wilson *et al.*, 1999). Si bien las mutaciones que suprimen la función del gen son raras, *ABCA1* es un gen con una gran cantidad de polimorfismos, reportándose hasta el

momento más de 100 diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *ABCA1* humano. Múltiples estudios han buscado asociaciones de SNPs de *ABCA1* con los niveles de HDL-C y/o la presencia de aterosclerosis en diferentes poblaciones con resultados inconsistentes (Cenarro *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2003; Singaraja *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2003; Shioji *et al.*, 2004; Tregouet *et al.*, 2004; Yamakawa-Kobayashi *et al.*, 2004; Benton *et al.*, 2007). Hasta el momento, solamente 2 estudios han analizado los efectos funcionales de diferentes SNPs *in vitro* (Brunham *et al.*, 2005; Kyriakou *et al.*, 2007), demostrando que las variantes I883M y S1731C disminuyen significativamente el eflujo de colesterol, mientras que los SNPs V771M y V825I parecen incrementarlo. Llama la atención que una de las variantes más frecuentes y más estudiadas (R219K), asociada a niveles más altos de HDL en una gran cantidad de estudios, no mostró diferencia alguna en el porcentaje de eflujo de colesterol en comparación con el alelo silvestre.

1.7.1 Variante R230C

Recientemente, se encontró una variante del gen *ABCA1* en población mestiza mexicana, que parece ser exclusiva de poblaciones nativas de América y sus derivadas. Esta variante es un cambio de una citosina por una timina en la posición 1001 del transcrito, que origina un cambio de una arginina (R) por una cisteína (C) en la posición 230 de la proteína (R230C). La frecuencia del alelo C es alta en mestizos mexicanos (11%), y se encontró asociada a menores niveles de HDL-C, a obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano (Villarreal-Molina *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2008); todos ellos factores de riesgo para la EAC. Por esto es indispensable analizar si esta variante se asocia a un mayor riesgo de enfermedad arterial coronaria en nuestra población.

1.8 Gen Endotelina-1 (*EDN-1*)

Las endotelinas son una familia de proteínas que incluye a la endotelina 1, endotelina 2 y endotelina 3, cada una de las cuales consta de 21 aminoácidos. Son potentes agentes vasopresores y endógenos secretados por diferentes tejidos y células del organismo. Actúan como moduladores del tono vasomotor, proliferación celular y de producción hormonal. La endotelina fue descrita por primera vez por Hickey *et al.* en 1985 como un factor secretado por el endotelio vascular causante de la contracción de músculo liso. Posteriormente Yanagisawa *et al.* en 1988 aislaron una sustancia con propiedades vasoactivas que identificaron como endotelina (*EDN-1*), siendo los primeros en determinar la estructura molecular del péptido de 21 aminoácidos a partir del sobrenadante de cultivo de células endoteliales de aorta porcina (Baltazares *et al.*, 2005).

La *EDN-1* es la proteína más estudiada de la familia de las endotelinas. Se sintetiza predominantemente en el endotelio vascular, células de músculo liso vascular, células epiteliales, células mesangiales, células de la glía neuronal y células hepáticas. Tiene como función ejercer una acción vasoconstrictora y proliferativa sobre las células de músculo liso vascular, es pro-inflamatoria, tiene acción potencialmente mitógena, promueve la producción de fibroblastos, modula la síntesis de la matriz extracelular, causa hipertrofia de las células de músculo liso vascular, afecta la permeabilidad vascular, y es estimulante del sistema nervioso simpático. Los efectos fisiológicos de la *EDN-1* están mediados a través de dos tipos de receptores, ET_A y ET_B . Los receptores ET_A están localizados principalmente en el músculo liso vascular y son responsables de inducir la proliferación celular y vasoconstricción. Los receptores ET_B están presentes en las células endoteliales y son mediadores de la relajación vascular, además de intervenir en la depuración de la *EDN-1*.

1.8.1 Estructura y Biosíntesis

El gen *EDN-1* se encuentra en el cromosoma 6p12 y tiene de 6899 pares de bases y 5 exones. Al igual que las otras endotelinas, se sintetiza como una pre-hormona que posteriormente es procesada hasta formar un péptido activo. Este proceso se desarrolla en el citosol de las células endoteliales. El RNA mensajero (RNAm) de *EDN-1* codifica a la preproendotelina de 212 aminoácidos, que a través de la acción proteolítica de una endopeptidasa la transforma en Big-endotelina de 39 aminoácidos (Big-ET-1). Por la acción de la enzima convertidora de endotelinas (ECE--1), una metaloendoproteasa que rompe la unión en la posición triptófano 21 - valina 22 (Trp21-Val22), este fragmento es transformado en la endotelina-1 de 21 aminoácidos que es el péptido activo (Figura 3). Este péptido tiene 4 residuos de cisteína que permiten establecer dos puentes intramoleculares disulfuro para formar una estructura semicónica inusual. Los puentes disulfuro son importantes tanto para la unión de las endotelinas con su receptor específico como para su actividad biológica.

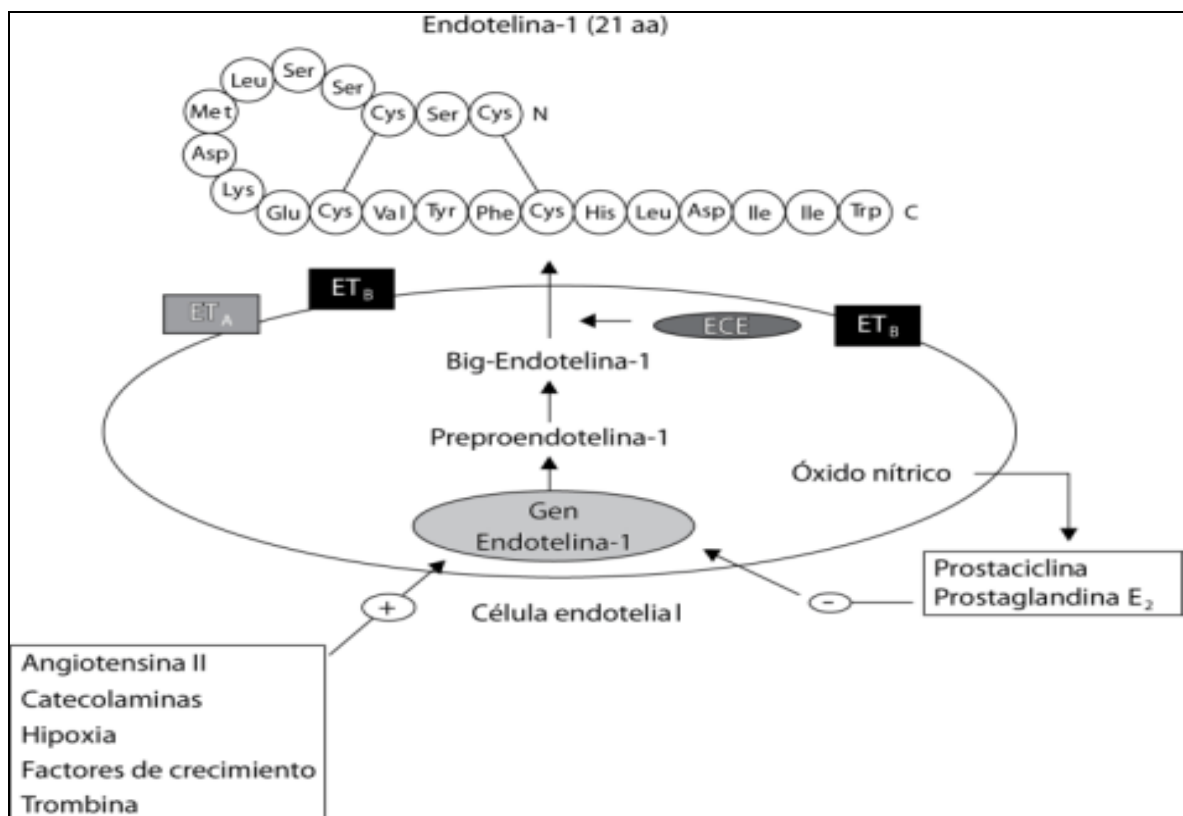


Figura 4. Síntesis de endotelina-1. Factores de estimulación e inhibición (Imagen obtenida de Baltazares *et al.*, 2005).

1.8.2 Regulación de la *EDN-1*

La regulación de la endotelina 1 es muy compleja, participan diversos factores como la tensión pulsátil, lesión endotelial y pH, entre otros. El ejercicio miocárdico incrementa la expresión de *EDN-1*, sugiriendo un posible papel en el mantenimiento de la función cardíaca. La hipoxia es un fuerte estímulo para la síntesis de la *EDN-1* que puede ser importante para mantener la función cardíaca durante la isquemia. Además, la biosíntesis de la *EDN-1* es estimulada por factores de riesgo cardiovascular, como niveles elevados de colesterol, lipoproteínas de baja densidad y glucosa, así como la obesidad. Otras moléculas que estimulan la producción de endotelinas incluyen mediadores pro-coagulantes semejantes a trombina, vasoconstrictores, factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión. En contraste, vasodilatadores como el óxido nítrico (ON) y la prostaciclina inhiben la producción de endotelina-1 a través de mecanismos comunes que involucran la producción de guanosina monofosfato cíclico (GMPc); mientras que la hormona natriurética auricular inhibe la producción basal de endotelina.

1.8.3 Polimorfismos de *EDN-1* y su asociación a diversas enfermedades

Hasta el momento se han reportado 130 SNPs en el gen *EDN-1* humano, la mayoría de los cuales se encuentran en los intrones (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Por la función reguladora del tono vasomotor de la *EDN-1*, diversos grupos de investigadores han buscado asociaciones de diferentes polimorfismos en este gen con la hipertensión arterial (Kaetsu *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004); o bien a hipertensión asociada a diferentes enfermedades como la artritis reumatoide (Panoulas *et al.*, 2008) y la obesidad (Barath *et al.*, 2007); pero los resultados no han sido consistentes, lo cual es muy frecuente en los estudios de asociación en diferentes poblaciones.

Entre todos los polimorfismos, destaca el denominado rs5370, que causa el cambio de una lisina (K) por una asparagina (N) en la posición 198 de la proteína (Lys198Asn). Se ha encontrado asociación de este polimorfismo con la retinopatía diabética (Li *et al.*, 2008); con la angina por vasoespasmo

coronario (Lee *et al.*, 2008); y con los niveles de presión arterial e hipertensión (Tanaka *et al.*, 2004). De manera reciente, se ha encontrado que este polimorfismo aumenta discretamente el riesgo de enfermedad arterial coronaria en la población alemana (Bühler *et al.*, 2007) y en individuos hipertensos (Popov *et al.*, 2008). Además, este polimorfismo se encontró asociado a riesgo de padecer asma (Zhu *et al.*, 2008), y a niveles de HDL en población franco-canadiense (Paré *et al.*, 2008). Puesto que este polimorfismo ha sido asociado a hipertensión arterial, niveles de HDL y enfermedad arterial coronaria en diferentes poblaciones, es importante investigar si este polimorfismo confiere susceptibilidad a la enfermedad arterial coronaria en población mexicana.

Es muy importante mencionar que existe evidencia experimental que relaciona a la endotelina-1 con la resistencia a la insulina, un factor de riesgo más para la enfermedad arterial coronaria. En primer lugar, se ha reportado que individuos con enfermedades que cursan con resistencia a la insulina como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, presentan niveles plasmáticos elevados de EDN-1 (Maeda *et al.*, 2006). Además, estudios *in vivo* sugieren que la EDN-1 puede causar resistencia a la insulina tanto en humanos como en ratas (Ottosson-Seeberger *et al.*, 1997; Juan *et al.*, 1996). La endotelina es capaz de inhibir la captación de glucosa estimulada por la insulina en células musculares de rata (Jiang *et al.*, 1999), en adipocitos de rata (Chou *et al.*, 1994) y en adipocitos 3T3-L1 (Ishibashi *et al.*, 2001). A pesar de esta evidencia, a la fecha solo se ha buscado asociación de polimorfismos del gen *EDN-1* con el síndrome metabólico y a la resistencia a la insulina en un estudio en población australiana (Wiltshire *et al.*, 2008), pero la variante Lys198Asn no mostró asociación a estos rasgos, y tampoco a hipertensión o niveles de lipoproteínas en esta población.

En Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) se encontró en una muestra de población abierta de mestizos mexicanos del Distrito Federal, que el alelo Asn de la variante rs5370 se asoció a un mayor riesgo de resistencia a la insulina y a menores niveles de HDL (datos en prensa). Por esto, es indispensable evaluar si estos alelos se asocian a la susceptibilidad de la enfermedad arterial coronaria en la población mexicana.

II. JUSTIFICACIÓN

La EAC prematura y su principal complicación el infarto al miocardio son una de las principales causas de muerte en México y en el mundo, su prevalencia ha ido en aumento en los últimos años. La población mexicana tiene una muy alta incidencia de obesidad, dislipidemias, síndrome metabólico (SM) y diabetes, todos ellos factores de riesgo para la EAC, sin embargo, existen pocos estudios sobre las bases genómicas de la EAC en población mexicana. El conocimiento de la etiología genética de la EAC es un factor importante para conocer y entender el proceso fisiopatológico de esta enfermedad y así poder diseñar en un futuro mejores estrategias de prevención y diagnóstico para identificar personas de riesgo a padecerla.

Se han realizado estudios de asociación para evaluar la contribución de polimorfismos presentes en diferentes genes para el desarrollo de la EAC y aterosclerosis. Los genes *ABCA1* y *EDN-1* se han asociado a más de un factor de riesgo para desarrollar EAC, por lo que podrían estar involucrados en la fisiopatología de esta enfermedad en población mexicana.

III. HIPÓTESIS

Debido a que los polimorfismos comunes en los genes *EDN-1* y *ABCA1* se asocian a más de un factor de riesgo para desarrollar EAC prematura, pueden conferir susceptibilidad a dicha enfermedad en la población mexicana.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar si los polimorfismos rs5370 del gen *EDN-1* y el polimorfismo R230C del gen *ABCA1* son alelos de susceptibilidad para el desarrollo de la EAC prematura en población mexicana.

4.2. Objetivos Particulares

- Genotipificar los polimorfismos rs5370 del gen *EDN-1* y el polimorfismo R230C del gen *ABCA1* en pacientes con EAC prematura y controles.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas para cada polimorfismo en casos y controles.
- Evaluar la asociación de los polimorfismos de manera individual al desarrollo de la EAC prematura y a diversas variables antropométricas y bioquímicas (niveles de lípidos, índice de masa corporal, cintura, etc.).

V. METODOLOGÍA

Este proyecto se realizó en la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), en colaboración con el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH).

Se realizó un estudio de asociación caso/control, en el cual se recolectó un total de 592 muestras de sangre, 236 casos y 356 controles en un periodo de 5 meses (noviembre de 2008 a marzo de 2009).

5.1 Población de estudio

a) Casos

Se reclutaron 236 pacientes mexicanos no emparentados, con EAC prematura (edad de inicio < 65 años para mujeres y < 55 años para hombres), de los cuales fueron 208 hombres y 29 mujeres, con edad de 30 a 70 años. La captación de estos pacientes se realizó a través de la unidad de endocrinología del INCICH. Se excluyeron a aquellos pacientes que presentaban trastornos tiroideos, hepáticos, renales u oncológicos.

b) Individuos Controles

Se reclutaron 356 controles mexicanos no emparentados, aparentemente sanos, sin antecedentes heredo-familiares de EAC prematura. A todos se les realizó Tomografía con multidetector de 64 canales (TAC) para descartar la presencia de calcio en las arterias coronarias. Este grupo estuvo comprendido de 174 hombres y 182 mujeres con edad de 30 a 70 años, se utilizaron como criterios de exclusión los mismos para casos. Estos individuos fueron reclutados del banco de sangre del INCICH.

Todos los individuos firmaron una carta de consentimiento informado del proyecto. Se utilizó un cuestionario para obtener información sobre el nivel socioeconómico y educativo, así como los antecedentes personales patológicos y no patológicos. Se realizó una exploración física incluyendo medición de peso, talla, cintura y presión arterial medida con baumanómetro. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) dividiendo el peso en kilogramos entre la talla en metros elevada al cuadrado ($IMC = \text{peso}/\text{talla}^2$). Se midió el índice de Calcio en arterias coronarias con tomografía axial computarizada de las coronarias, realizada en el INCICH. Se les tomó además una muestra de 10 ml de sangre para realizar mediciones bioquímicas (química sanguínea y perfil de lípidos), así como para extracción de DNA.

5.2 Parámetros Bioquímicos

Todas las mediciones bioquímicas en sangre (LDL, HDL, Colesterol no HDL, Triglicéridos, Relación colesterol total/ HDL, Relación LDL/ HDL, Relación triglicéridos/ HDL, glucosa) se realizaron en el departamento de Endocrinología del INCICH utilizando procedimientos estandarizados y reactivos comerciales. La glucosa sérica se midió utilizando el método de la glucosa oxidasa. Los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y triglicéridos (TG) se midieron a través de métodos enzimáticos (Boehringer-Mannheim); los niveles plasmáticos de HDL se midieron usando ácido fosfotúngstico y Mg^{2+} .

Con base a la exploración física se diagnosticó Síndrome Metabólico (SM) utilizando los criterios de la NCEP (Tabla 3):

1. Obesidad Central	Cintura > 102 cm en hombres, > 88 cm en mujeres.
2. Niveles bajos de HDL-C	HDL-C < 40 mg/dl en hombres, < 50 mg/dl en mujeres.
1 Hipertrigliceridemia	Triglicéridos séricos \geq 150 mg/dl.
4. Hipertensión arterial	Presión arterial \geq 138/85 o uso de medicamentos antihipertensivos.
5. Glucosa plasmática en ayuno	Glucemia \geq 100 mg/dl o uso de hipoglucemiantes.

Tabla 3. Criterios de la ATP- III para el síndrome metabólico. La presencia de al menos 3 de estos criterios en un individuo es diagnóstico de Síndrome Metabólico (Obtenida de Grundy *et al.*, 2004).

5.3 Extracción de Ácidos nucleicos y Cuantificación de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de sangre total utilizando el kit comercial (QIAmp DNA Blood Midi kit, QIAGEN). Se verificó la integridad en gel de agarosa al 1%. Se cuantificó el DNA por espectrofotometría utilizando el equipo NANODROP Data. Se hicieron alícuotas homogéneas de 10 ng/ μ l de cada muestra.

5.4 Genotipificación de los SNPs de los genes *EDN-1* y *ABCA1*

Se genotipificó el SNP R230C del gen *ABCA1*, así como el SNPs rs5370 del gen *EDN-1* por ensayos de PCR tiempo real con sondas Taqman y ensayo de discriminación alélica, utilizando un sistema ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) (Tabla 4).

SNP	GEN	LOCUS	CAMBIO DE BASE	TIPO DE VARIANTE	POBLACION	FREC. ALELO MAYOR	FREC. ALELO MENOR	FREC. GENOTIPO		
								GG	GT	TT
rs5370	EDN-1	6p12	[G/T] EXON 5	Lys/Asn Codificante no sinónimo	Población Global	G = 0.77	T = 0.23	0,61	0,3	0,07
					Población Europea	G = 0.76	T = 0.24	0,57	0,4	0,05
					Población Hispana	G = 0.98	T = 0.02	0,95	0,045	0
R230C	ABCA1	9p21	[C/T] EXON 7	Cys/Arg Codificante no sinónimo				CC	CT	TT
					Población Global	C = 0.98	T = 0.02	0,96	0	
					Población Europea	C = 1.000	T = 0.00	1.000	0	
					Población Hispana	C = 0.96	T = 0.04	0,91	0,1	

Tabla 4. Generalidades de los SNPs estudiados. Se describe el locus, el cambio de base, las frecuencias alélicas y genotípicas para cada población (Obtenida de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

5.5 Fundamento de la técnica

La PCR en tiempo real es un método que mediante la reacción de PCR y detección de fluorescencia permite cuantificar la cantidad de DNA producido, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los valores de fluorescencia, expresados como logaritmos a fin de estudiar fácilmente la fase exponencial de amplificación, aparecen como una línea recta al representar gráficamente el logaritmo de la fluorescencia frente al número de ciclo. Este segmento, denominado segmento cuantificable, permite valorar la cantidad de ADN inicial. Esta técnica es un método específico y sensible, en esta técnica los procesos de amplificación y detección se llevan a cabo de manera simultánea (Higuchi *et al.*, 1993).

Los sistemas de detección de secuencia (SDS) por fluorescencia empleados en el PCR tiempo real pueden ser por sondas específicas. Estas sondas de hibridación específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un

donador y un receptor. El proceso de esta técnica se basa en el empleo del FRET o transmisión de energía de resonancia (Fluorescent Resonant Energy Transfer: FRET), que es un mecanismo de transferencia de energía entre cromóforos. EL FRET se fundamenta en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula, mediante un mecanismo acoplador dipolo-dipolo. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas Taqman.

5.5.1 Sondas tipo Taqman

Permiten genotipificar polimorfismos de un solo nucleótido, utilizando 1 sonda específica para cada alelo y a su vez garantiza la especificidad de la detección. (McGuigan *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2006). Cada sonda está marcada con 1 tipo de fluorescencia diferente (VIC y FAM). Una de las sondas incluye la base correspondiente al alelo silvestre y la otra sonda presenta la base correspondiente al alelo mutado; el fluoróforo detectado revela la presencia o ausencia del polimorfismo en la muestra analizada.

Cada sonda posee un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula (denominada quencher) en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia. Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emite fluorescencia. Cuando la polimerasa se topa con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del quencher y por tanto, la emisión de fluorescencia que está relacionada con la cantidad de amplicón producido.

5.5.2 Ensayo de discriminación alélica

El ensayo de discriminación alélica es una de las aplicaciones de la PCR en tiempo real, permite conocer el genotipo presente en cada una de las muestras

de DNA analizadas. El programa computacional SDS 2.2 acoplado al equipo de PCR tiempo real, mediante la aplicación de un algoritmo previamente establecido y tomando en cuenta la fluorescencia basal del ensayo, nos indica el genotipo presente en la muestra analizada y además nos proporciona un valor de calidad del ensayo. Los resultados de la discriminación alélica son presentados en forma de gráfica (alelo A vs alelo a), en donde es fácil ubicar las muestras genotipificadas como homocigotos para el alelo “A”, homocigotos para el alelo “a” o como heterocigotos “Aa” (Figura 5).

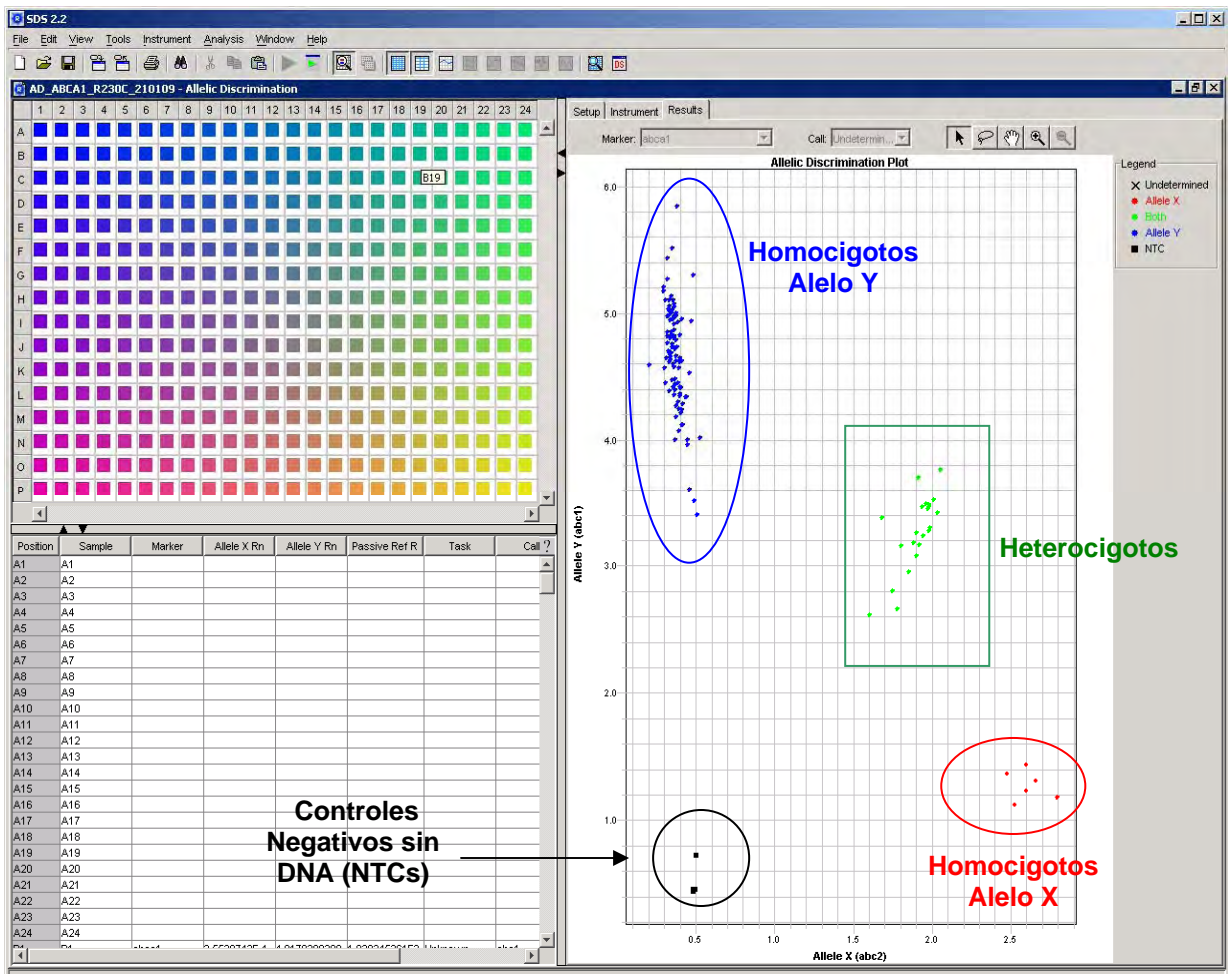


Figura 5. Gráfica de un ensayo de discriminación alélica para la genotipificación de muestras por PCR en tiempo real obtenida mediante el programa SSPS 2.2. El color y la ubicación de las muestras dentro de la gráfica permiten la determinación del genotipo, considerando la fluorescencia basal del ensayo, representada por NTCs (Imagen obtenida mediante el programa SDS 2.2).

5.6 Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Chicago II) para el análisis de resultados. Se calcularon las medias \pm desviación estándar y frecuencias de los parámetros básicos de los casos y controles participantes. Se analizaron las posibles asociaciones de los diferentes alelos y genotipos con la EAC utilizando un modelo de regresión logística, y análisis de covarianza para rasgos cuantitativos tomando como factor fijo el genotipo, ajustando por otras variables pertinentes (edad, género y tabaquismo, factores de riesgo para la EAC).

Se utilizó la prueba de X^2 para analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se consideró como nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

6.1 Población

Para este proyecto se reclutaron en total 592 individuos (381 hombres y 211 mujeres): 356 fueron controles (174 hombres y 182 mujeres), de los cuales 11 fueron eliminados (2 por parentesco; 5 por origen étnico no mexicano, 2 por tener antecedentes heredo familiares de EAC prematura y 2 por padecer alcoholismo). Además, en este grupo se identificaron 95 individuos (68 hombres y 27 mujeres) con presencia de calcio en las arterias, por lo que se decidió analizarlos de forma independiente como un grupo de Aterosclerosis Subclínica (AS).

Para la población de casos se obtuvo una muestra de 236 pacientes (208 hombres y 29 mujeres), de los cuales se eliminó a un solo individuo por ser de origen español.

6.2 Características Generales de la Población

Los parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos en los diferentes grupos de estudio se muestran en la tabla 5. Como era de esperarse, los grupos de EAC prematura y aterosclerosis subclínica muestran diferencias significativas en todos los parámetros que son considerados factor de riesgo para la EAC al compararlos con el grupo control. Puesto que el 94% y el 74% de los individuos del grupo de EAC prematura estaban bajo tratamiento hipolipemiente y antihipertensivo respectivamente, este grupo presentaba niveles séricos más bajos de colesterol total, LDL y colesterol no-HDL que los otros grupos, y a pesar de presentar mayor frecuencia de hipertensión arterial sistémica, las cifras de tensión arterial tanto diastólica como sistólica no fueron mayores que en los otros grupos. Sin embargo, existen algunas diferencias significativas entre los grupos EAC y aterosclerosis subclínica que llaman la atención. Los factores de riesgo que fueron significativamente más frecuentes en el grupo de EAC fueron: porcentaje de individuos del sexo masculino, hipertensión arterial y síndrome metabólico, mientras que la frecuencia de

diabetes mellitus, obesidad e hipertrigliceridemia fue similar en ambos grupos. A pesar de que la HTAS fue más frecuente en el grupo de EAC, el promedio de cifras de tensión arterial fue mayor en el grupo de AS. Además, los niveles de colesterol total y HDL-C fueron significativamente más bajos en el grupo de EAC.

VARIABLE	CONTROLES	ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA	CASOS	p*	p**	p***
Edad (años)	50.21 ± 9.40	56.25 ± 8.17	54.16 ± 7.16	<.001	0.031	<.001
Hombres	40.40%	71.60%	87.70%	<.001	0.001	<.001
IMC	27.67 ± 4.19	28.52 ± 4.14	28.77 ± 3.79	0.089	NS	0.002
Circunferencia de cintura	91.09 ± 11.12	96.25 ± 11.45	97.51 ± 9.84	<.001	NS	<.001
Obesidad	35.80%	37.90%	33.10%	NS	NS	NS
Promedio Presión Sistólica (PAS)	118.33 ± 16.99	128.69 ± 22.47	122.13 ± 18.70	<.001	0.013	0.019
Promedio Presión Diastólica (PAD)	72.97 ± 9.24	77.98 ± 10.66	75.44 ± 9.63	<.001	0.046	0.004
Hipertensión Arterial sistémica	15.80%	38.90%	63.60%	<.001	<.001	<.001
Colesterol Total	191.11 ± 37.17	202.76 ± 31.99	162.31 ± 41.69	0.004	<.001	<.001
HDL	46.96 ± 12.72	42.54 ± 11.04	36.32 ± 8.42	0.002	<.001	<.001
Hipo α-lipoproteinemia	48.80%	48.40%	75.40%	NS	<.001	<.001
LDL	117.72 ± 31.93	130.91 ± 28.37	93.79 ± 35.24	<.001	<.001	<.001
Colesterol no HDL	144.16 ± 38.94	160.22 ± 31.06	125.56 ± 41.40	<.001	<.001	<.001
Triglicéridos	169.27 ± 132.76	191.17 ± 125.21	202.48 ± 113.61	0.012	NS	<.001
Hipertrigliceridemia	43.80%	63.20%	65.30%	0.002	NS	<.001
Glucosa	93.45 ± 25.25	109.18 ± 46.77	100.63 ± 29.81	0.001	0.13	<.001
Diabetes Mellitus	17.70%	35.80%	32.20%	0.001	NS	<.001
Relación CT/HDL	4.37 ± 1.52	5.03 ± 1.46	4.64 ± 1.39	<.001	0.025	0.041
Relación CLDL/CHDL	2.69 ± 1.11	3.19 ± .91	2.68 ± 1.04	<.001	<.001	NS
Relación TG/CHDL	4.25 ± 4.99	5.28 ± 6.25	6.08 ± 4.44	0.151	NS	<.001
Síndrome Metabólico	24.60%	42.10%	55.10%	0.002	0.039	<.001

Tabla 5. Comparación de los parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos de acuerdo al grupo de estudio. P* comparación de Controles vs. Aterosclerosis subclínica, P** comparación del grupo de Aterosclerosis Subclínica vs. Casos, P*** comparación de Controles vs. Casos, ajustado por edad y género. Los datos representan la media ± desviación estándar para las variables continuas (IMC, Circunferencia de cintura, PAS, PAD, CT, HDL, LDL, C no LDL, CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL, TG y glucosa) Para TG y glucosa se presentan las medias aritméticas, pero para análisis estadístico se tomó en cuenta el Ln. Las variables categóricas están expresadas en porcentajes, y se compararon con la prueba de X².

6.3 Genotipificación de la variante R230C del Gen *ABCA1*.

Fue posible genotipificar el 98% de las muestras (Figura 6). El análisis con sondas Taqman en 576 individuos mexicanos mostró que 99 individuos son heterocigotos R230C (17.2 %) y solo un individuo es homocigoto C230C (0.2 %). Este polimorfismo no mostró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($p=0.142$).

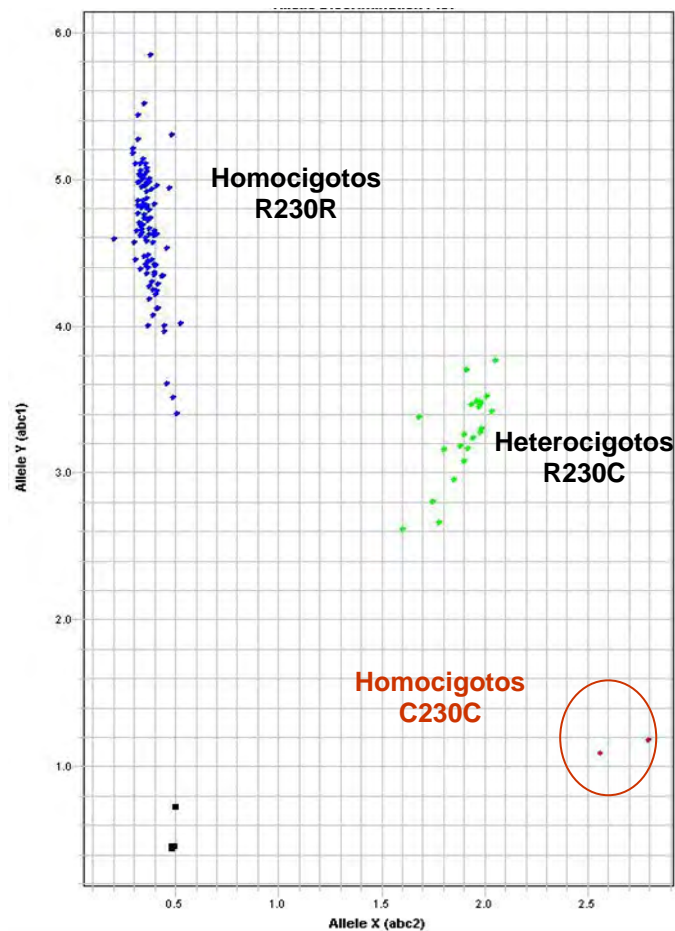


Figura 6. Genotipificación de la variante R230C del gen *ABCA1* por sondas Taqman. La sonda complementaria al alelo “R” está marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “Y”. La sonda complementaria al alelo “C” está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “X”. Cada punto representa una muestra; los homocigotos R230R aparecen como un punto azul (solo fluoresce VIC), los homocigotos C230C como un punto rojo (solo fluoresce FAM), y los heterocigotos R230C que emiten ambos tipos de fluorescencia aparecen como un punto verde. Los cuadros negros representan controles negativos.

6.4 Genotipificación de rs5370 del Gen *EDN-1*

Fue posible genotipificar el 96% de las muestras mediante el ensayo Taqman (Figura 7). El análisis por sondas Taqman en 571 individuos mexicanos mostró que 129 individuos son heterocigotos K198N (22.6%) y 18 individuos son homocigotos N198N (3.2%). Este polimorfismo no mostró desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P= 0.13$).

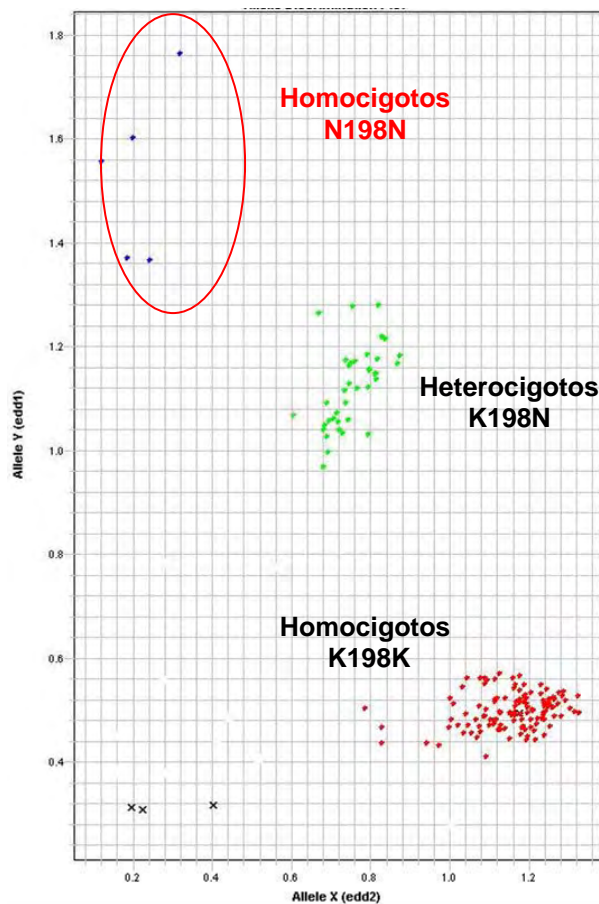


Figura 7. Genotipificación de la variante rs5370 del gen *EDN-1* por sondas Taqman. La sonda complementaria al alelo “K” está marcada con el fluoróforo VIC, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “Y”. La sonda complementaria al alelo “N” está marcada con el fluoróforo FAM, cuya fluorescencia se graficó en el eje de las “X”. Cada punto representa una muestra; los homocigotos K198K aparecen como un punto rojo (solo fluoresce VIC), los homocigotos N198N como un punto azul (solo fluoresce FAM), y los heterocigotos K198N que emiten ambos tipos de fluorescencia aparecen como un punto verde. Los cuadros negros representan controles negativos.

6.5 Frecuencias Alélicas y Genotípicas

La tabla 6 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes R230C y rs5370 en los diferentes grupos de estudio. La frecuencia del alelo C230 fue más alta en el grupo AS (12.10%), y más baja en el grupo de EAC prematura (6.3%). En el grupo control, la frecuencia alélica fue similar a la previamente reportada en mestizos mexicanos (9.45%). El único individuo homocigoto C230C presentaba EAC prematura. Por el número reducido de homocigotos, se calcularon las razones de momios bajo el modelo dominante únicamente. La frecuencia del alelo N198 de la variante rs5370 en los controles fue de 14.9%, y no fue significativamente diferente a la encontrada en el grupo de AS (13.5%) o EAC prematura (17.8%). La distribución de genotipos rs5370 tampoco mostró diferencias por grupo de estudio.

En la tabla 6.1 se muestra los resultados del análisis de regresión logística para las variantes R230C y rs5370. Mientras que el polimorfismo rs5370 no parece jugar un papel importante en el riesgo a desarrollar EAC prematura o la AS en la población mexicana, la variante R230C no solo no confiere riesgo de EAC prematura, parece ser un alelo de protección para desarrollar esta entidad, ya que fue significativamente menor en el grupo de casos que en el de AS, y mostró una tendencia a ser menor en comparación con los controles (RM= 0.477, IC 95%: 0.249-0.913, P= 0.025 y RM=0.584, IC 95% 0.324-1.052, P= 0.079 respectivamente).

A) Variante R230C del gen *ABCA1*.

GRUPO DE ESTUDIO	GENOTIPO			ALELO	
	R230R	R230C	C230C	R230	C230
CONTROLES n= 259	210 81.1%	49 18.9%	0 0%	90.54%	9.45%
ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA n= 95	72 75.8%	23 24.2%	0 0.00%	87.89%	12.10%
CASOS n= 222	194 87.4%	27 12.2%	1 0.5%	93.47%	6.31%

B) Variante rs5370 del gen *EDN-1*

GRUPO DE ESTUDIO	GENOTIPO			ALELO	
	K198K	K198N	N198N	K198	N198
CONTROLES n= 255	188 73.7%	58 22.7%	9 3.5%	85.08%	14.90%
ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA n= 95	74 77.9%	17 17.9%	4 4.2%	86.84%	13.15%
CASOS n= 221	162 73.3%	54 24.4%	5 2.3%	85.52%	17.48%

Tabla 6. Frecuencias alélicas y genotípicas de A) la variante R230C del gen *ABCA1*; y B) de la variante rs5370 del gen *EDN-1*, según el grupo de estudio.

SNP	STATUS	RM (IC 95 %)	p*
R230C	CASOS vs. CONTROLES	0.584 (0.324-1.052)	0.079*
	CONTROLES vs. ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA	1.207 (0.650-2.240)	0.552*
	ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA VS. CASOS	0.477 (0.249-0.913)	0.025*
rs5370	CASOS vs. CONTROLES	0.812 (0.500-1.320)	0.401**
	CONTROLES vs. ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA	0.743 (0.404-1.36)	0.340**
	ATEROSCLEROSIS SUBCLINICA VS. CASOS	1.44 (0.791-2.63)	0.232**

Tabla 6.1. Asociación de los diferentes alelos de riesgo con EAC prematura y Aterosclerosis Subclínica. RM= razón de momios, IC 95%= intervalo de confianza del 95%; P* significancia estadística ajustada por edad, género y tabaquismo. P** significancia estadística ajustada por edad, género e IMC.

6.6 Asociación de la Variante R230C a otros Parámetros Bioquímicos y Metabólicos.

La tabla 7 muestra los parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos controles de acuerdo a su genotipo. Se compararon los individuos con la variante (genotipos R230C/C230C) y sin la variante (R230R). Los individuos con genotipos R230C/C230C presentaron niveles de HDL-C más bajos y TG más altos que los R230R, y la diferencia dio una tendencia a la significancia estadística (44.46 ± 11.57 vs 47.46 ± 12.91 , $P=0.184$; y 183.37 ± 85.62 vs 166.37 ± 141.67 , $P=0.168$, respectivamente). Sin embargo, el porcentaje de individuos con índice TG/HDL elevado (factor de riesgo para la EAC) sí fue significativamente mayor en individuos R230C/C230C (65.3%) que en individuos R230R (45.7%, $P=0.017$). Además, los porcentajes de individuos con hipertrigliceridemia, dislipidemia aterogénica y síndrome metabólico fueron significativamente mayores en los individuos con genotipos R230C/C230C que en individuos R230R ($P=0.010$, 0.029 y 0.040 respectivamente). El IMC y el porcentaje de obesidad no mostraron diferencias de acuerdo al genotipo.

La tabla 8 de igual forma muestra la relación de los parámetros antropométricos y bioquímicos de acuerdo al genotipo, en el grupo de casos. Aunque los niveles de HDL fueron menores en los individuos R230C/C230C, la diferencia no alcanzó significancia estadística. No se observaron diferencias por genotipo en IMC, circunferencia de cintura, porcentaje de obesidad, niveles de triglicéridos y porcentaje de síndrome metabólico. Sin embargo, los individuos con genotipos R230C/C230C presentaron niveles significativamente más altos de colesterol total, LDL, colesterol-no HDL, mayores índices LDL/HDL y TG/HDL, así como mayor porcentaje de individuos con colesterol total elevado ($p < 0.04$).

VARIABLE	GENOTIPO		P
	R230R n=210	R230C/C230C n= 49	
IMC	27.75 ± 4.25	27.47 ± 3.87	NS
Circunferencia de cintura	91.10 ± 11.24	91.46 ± 10.49	NS
OBESIDAD	52 (24.8%)	13 (26.5%)	NS
PERFIL DE LÍPIDOS			
Colesterol Total (CT)	191.69 ± 38.03	188.83 ± 33.89	NS
HDL	47.46 ± 12.91	44.46 ± 11.57	0.184*
LDL	118.41 ± 32.96	115.03 ± 27.54	NS
C no HDL	144.23 ± 39.71	144.37 ± 36.10	NS
Triglicéridos (TG)	166.37 ± 141.67	183.37 ± 85.62	0.168*
Hipertrigliceridemia	84 (40.0%)	30 (61.2%)	0.010**
LDL Elevados	194 (92.4 %)	45 (91.8%)	NS
Colesterol Total elevado	71 (33.8%)	15 (30.6%)	NS
Relación CT/HDL	4.34 ± 1.57	4.51 ± 1.31	NS
Relación LDL/HDL	2.67 ± 1.14	2.77 ± .97	NS
Relación TG/HDL	4.19 ± 5.411	4.57 ± 2.63	NS
Colesterol no HDL elevado	58 (27.6%)	11 (22.4%)	NS
Colesterol Total_ HDL elevado	81(38.6%)	26(53.1%)	0.077**
LDL_HDL elevado	208 (99.0%)	47 (95.9%)	NS
TG_HDL elevado	96 (45.7%)	32 (65.3%)	0.017**
PRESIÓN ARTERIAL			
Promedio Presión Sistólica (PAS)	118.05 ± 17.16	119.30 ± 16.49	NS
Promedio Presión Diastolita (PAD)	72.96 ± 9.54	72.91 ± 7.96	NS
Diagnostico Hipertensión Arterial Sistémica (HTAs)	28 (13.3%)	9 (18.4%)	NS
SÍNDROME METABÓLICO			
ATP III Obesidad Central	73 (34.8%)	20 (40.8%)	NS
ATP III Hipo α lipoproteinemia	99 (47.1)	28 (57.1%)	NS
ATP III Hipertrigliceridemia	84 (40.0%)	30 (61.2%)	0.010**
ATP III Hipertensión Arterial Siatemica	31 (14.8%)	10 (20.4%)	NS
ATP III Disglucemia	35 (16.7%)	11 (22.4%)	NS
Diagnostico de Síndrome Metabólico	48 (22.9%)	17 (38.8%)	0.029**
Glucosa	92.80 ± 25.52	96.20 ± 24.41	NS
Diabetes Mellitus (T2D)	8 (3.8%)	4 (8.2%)	NS
Dislipidemia aterogenica	60 (28.6 %)	22 (44.9%)	0.040**

Tabla 7. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de **Controles**, de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen *ABCA1*. Los datos representan la media ± desviación estándar de variables continuas (IMC, Circunferencia de cintura, PAS, PAD, CT, HDL, LDL, C no LDL, CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL, TG y glucosa), las diferencias entre genotipos se compararon mediante análisis univariado (P*) ajustando por edad, género y tabaquismo. Para TG y glucosa, se presentan las medias aritméticas, pero para análisis estadístico se tomo en cuenta el Ln de cada variable. Las variables categóricas están expresadas en porcentajes, y se compararon con la Prueba de X² (P**)

VARIABLE	GENOTIPO		P
	R230R n=194	R230C/C230C n= 28	
IMC	28.7 ± 3.71	28.66 ± 3.23	NS
Circunferencia de cintura	97.51 ±10.11	95.79 ± 7.20	NS
OBESIDAD	65 (33.5%)	11 (39.3%)	NS
PERFIL DE LÍPIDOS			
Colesterol Total (CT)	160.66 ± 41.24	177.60 ± 43.88	0.035*
HDL	36.61 ± 8.38	34.31 ± 7.46	0.197
LDL	92.06 ± 34.49	110.56 ± 38.11	0.010*
C no HDL	123.60 ± 40.95	142.65 ± 44.10	0.020*
Triglicéridos (TG)	199.94 ± 104.11	222.27 ± 176.00	NS
Hipertrigliceridemia	126 (64.9%)	18 (64.3%)	NS
LDL Elevados	25 (12.9%)	8 (28.6%)	0.130**
Colesterol Total elevado	29 (14.9%)	9 (32.1%)	0.032**
Relación CT/HDL	4.54 ± 1.31	5.39 ± 1.79	0.004*
Relación LDL/HDL	2.61 ± 1.00	3.22 ± 1.16	0.006*
Relación TG/HDL	5.89 ± 3.77	3.77 ± 7.93	NS
Colesterol no HDL elevado	33 (17.0%)	9 (32.1%)	0.070**
Colesterol Total_ HDL elevado	90 (46.4%)	15 (53.6%)	NS
LDL_ HDL elevado	60 (31.3%)	12 (46.2%)	0.181**
TG_ HDL elevado	160 (82.5%)	23 (82.1%)	NS
PRESIÓN ARTERIAL			
Promedio Presión Sistólica (PAS)	122.22 ± 18.89	119.70 ± 15.61	NS
Promedio Presión Diastolita (PAD)	75.78 ± 9.52	76.07 ± 9.18	NS
Diagnostico Hipertensión Arterial Sistémica (HTAs)	43 (22.2%)	6 (21.4%)	NS
SÍNDROME METABÓLICO			
ATP III Obesidad Central	63 (32.5%)	7 (25.0%)	NS
ATP III Hipo α lipoproteinemia	144 (74.2%)	24 (85.7%)	NS
ATP III Hipertrigliceridemia	127 (65.5%)	18 (64.3%)	NS
ATP III Hipertensión Arterial Siatemica	126 (64.9%)	14 (50.0%)	NS
ATP III Disglucemia	65 (33.5%)	6 (21.4%)	NS
Diagnostico de Síndrome Metabólico	106 (54.6%)	14 (50.0%)	NS
Glucosa	100.60 ± 29.90	97.61 ± 21.28	NS
Diabetes Mellitus (T2D)	21 (10.8%)	3 (10.7%)	NS
Dislipidemia aterogénica	101 (52.1%)	17 (60.7%)	NS

Tabla 8. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de **Casos**, de acuerdo a la presencia de la variante R230C del gen *ABCA1*. Los datos representan la media ± desviación estándar de variables continuas (IMC, Circunferencia de cintura, PAS, PAD, CT, HDL, LDL, C no LDL, CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL, TG y glucosa), las diferencias entre genotipos se compararon mediante análisis univariado (P*) ajustando por edad, género y tabaquismo. Para TG y Glucosa, se presentan las medias aritméticas, pero para análisis estadístico se tomo en cuenta el Ln de cada variable. Las variables categóricas están expresadas en porcentajes, y se compararon con la Prueba de X² (P**).

6.7 Asociación del polimorfismo rs5370 *EDN-1* a otros parámetros bioquímicos y metabólicos.

La tabla 9 muestra los parámetros antropométricos y bioquímicos de los individuos de acuerdo a su genotipo. Se encontraron 18 homocigotos N198N, y el análisis se realizó bajo un modelo dominante, donde se compararon los individuos con la variante (genotipos K198N/N198N) con individuos sin la variante (genotipo K198K). Los niveles de glucosa de los individuos con genotipos K198N/N198N fueron significativamente más bajos que los individuos K198K (89.55 ± 14.55 vs 94.99 ± 28.27 , $P=0.028$), y mostraron una tendencia a presentar menor índice TG/HDL ($P= 0.089$). No se encontraron diferencias significativas de acuerdo al genotipo en otros parámetros, sin embargo los individuos con la variante 198N presentaron menor frecuencia de hipoalfalipoproteinemia (43.3 vs 51.6%) hipertrigliceridemia (37.3 vs 46.8%) y dislipidemia aterogénica (23.9 vs 34.6%) que los individuos K198K, sin alcanzar significancia estadística.

Al comparar estos parámetros por genotipo en el grupo de casos (tabla 10), se observó que los niveles de glucosa también fueron menores en los individuos con la variante 198N (95.17 ± 21.47 vs 101.02 ± 29.42), aunque la diferencia no alcanzó significancia estadística ($P=0.077$). En este grupo se observó que los individuos portadores de la variante 198N presentaron menor frecuencia de colesterol no-HDL elevado (19.4 vs 29.3%), índice LDL/HDL elevado (26.3 vs 35.0%), diagnóstico de hipertensión arterial sistémica (18.6 vs 23.0%), disglucemia por los criterios ATPIII (23.7 vs 34.6%), síndrome metabólico (45.8 vs 56.8%), diabetes mellitus (6.8 vs 11.7%) y dislipidemia aterogénica (23.7 vs 34.6%), sin alcanzar significancia estadística en ningún caso.

VARIABLE	GENOTIPO		P
	K198K n= 188	K198N/ N198N n= 67	
IMC	28.71 ± 3.76	28.76 ± 3.69	NS
Circunferencia de cintura	90.59 ± 11.43	92.78 ± 10.26	0.131
OBESIDAD	50 (26.6%)	13 (19.4%)	NS
PERFIL DE LÍPIDOS			
Colesterol Total (CT)	163.85 ± 41.28	160.44 ± 43.97	NS
HDL	36.48 ± 8.39	36.24 ± 8.40	NS
LDL	95.96 ± 35.68	89.46 ± 34.09	NS
C no HDL	126.68 ± 41.46	124.32 ± 43.09	NS
Triglicéridos (TG)	198.27 ± 106.51	216.44 ± 138.09	NS
Hipertrigliceridemia	88 (46.8%)	25 (37.3%)	NS
LDL Elevados	172 (91.5%)	63 (94.0%)	NS
Colesterol Total elevado	65 (34.6%)	20 (29.9%)	NS
Relación CT/HDL	4.42 ± 1.61	4.28 ± 1.23	NS
Relación LDL/HDL	2.71 ± 1.18	2.68 ± .90	NS
Relación TG/HDL	4.48 ± 5.41	3.75 ± 2.62	0.089*
Colesterol no HDL elevado	55 (29.3%)	13 (19.4%)	NS
Relación Colesterol Total_ HDL elevado	79 (42.0%)	27 (40.3%)	NS
Relación LDL_ HDL elevado	185 (98.4%)	66 (98.5%)	NS
Relación TG_ HDL elevado	98 (52.1%)	28 (41.8%)	NS
PRESIÓN ARTERIAL			
Promedio Presión Sistólica (PAS)	117.96 ± 17.49	118.16 ± 15.38	NS
Promedio Presión Diastolita (PAD)	72.44 ± 8.89	73.95 ± 9.94	NS
Diagnostico Hipertensión Arterial Sistémica (HTAs)	161 (85.6%)	59 (88.1%)	NS
SÍNDROME METABÓLICO			
ATP III Obesidad Central	65 (34.6%)	26 (38.8%)	NS
ATP III Hipo α lipoproteinemia	97 (51.6%)	29 (43.3%)	NS
ATP III Hipertrigliceridemia	88 (46.8%)	25 (37.3%)	NS
ATP III Hipertensión Arterial Siatemica	29 (15.4%)	9 (13.4%)	NS
ATP III Disglucemia	34 (18.1%)	12 (17.9%)	NS
Diagnostico de Síndrome Metabólico	141 (75.0%)	51 (76.1%)	NS
Glucosa	94.99 ± 28.27	89.55 ± 14.55	0.028*
Diabetes Mellitus (T2D)	10(5.3%)	2 (3.0%)	NS
Dislipidemia aterogenica	65 (34.6%)	16 (23.9%)	NS

Tabla 9. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de **Controles**, de acuerdo a la presencia de la variante rs5370 del gen *EDN-1*. Los datos presentados la media ± desviación estándar de variables continuas (IMC, Circunferencia de cintura, PAS, PAD, CT, HDL, LDL, C no LDL, CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL, TG y glucosa), las diferencias entre genotipos se compararon mediante análisis univariado (P*) ajustando por edad, género y tabaquismo. Para TG y Glucosa, se presentan las medias aritméticas, pero para análisis estadístico se tomo en cuenta el Ln de cada variable. Las variables categóricas están expresadas en porcentajes, y se compararon con la Prueba de X² (P**)

VARIABLE	GENOTIPO		P
	K198K n= 162	K198N/ N198N n= 59	
IMC	27.67 ± 4.17	27.77 ± 4.27	NS
Circunferencia de cintura	97.32 ± 10.00	97.51 ± 9.77	NS
OBESIDAD	55 (34.2%)	20 (33.9%)	NS
PERFIL DE LÍPIDOS			
Colesterol Total (CT)	191.93 ± 38.10	190.49 ± 34.77	NS
HDL	46.78 ± 12.85	47.09 ± 12.52	NS
LDL	117.87 ± 32.96	118.69 ± 29.08	NS
Colesterol no HDL	145.15 ± 40.55	143.41 ± 33.83	NS
Triglicéridos (TG)	176.10 ± 148.62	154.43 ± 75.73	NS
Hipertrigliceridemia	105 (65.2%)	38 (64.4%)	NS
LDL Elevados	7 (4.4%)	4 (7.0%)	NS
Colesterol Total elevado	27 (16.8%)	10 (16.9%)	NS
Relación CT/HDL	4.66 ± 1.42	4.59 ± 1.38	NS
Relación LDL/HDL	2.74 ± 1.07	2.52 ± .93	NS
Relación TG/HDL	5.51 ± 4.37	6.57 ± 4.93	NS
Colesterol no HDL elevado	55 (29.3%)	13 (19.4%)	NS
Colesterol Total_ HDL elevado	76 (47.2%)	27 (45.8%)	NS
LDL_HDL elevado	56 (35.0%)	15 (26.3%)	NS
TG_HDL elevado	133 (82.1%)	49 (83.1%)	
PRESIÓN ARTERIAL			
Promedio Presión Sistólica (PAS)	122.50 ± 18.79	119.92 ± 17.45	NS
Promedio Presión Diastolita (PAD)	75.55 ± 9.63	74.78 ± 9.04	NS
Diagnostico Hipertensión Arterial Sistémica (HTAs)	37 (23.0%)	11 (18.6%)	NS
SÍNDROME METABÓLICO			
ATP III Obesidad Central	47 (29,0%)	21 (35.6%)	NS
ATP III Hipo α lipoproteinemia	123 (76.4%)	43 (72.9%)	NS
ATP III Hipertrigliceridemia	106 (65.8%)	38 (64.4%)	NS
ATP III Hipertensión Arterial Sistémica	109 (67.3%)	34 (57.6%)	NS
ATP III Disglucemia	56 (34.6%)	14 (23.7%)	NS
Diagnostico de Síndrome Metabólico	92 (56.8%)	27 (45.8%)	NS
Glucosa	101.02 ± 29.42	95.17 ± 21.47	0.077*
Diabetes Mellitus (T2D)	19 (11.7%)	4 (6.8%)	NS
Dislipidemia aterogenica	56 (34.6%)	14 (23.7%)	0.143

Tabla 10. Comparación de los parámetros bioquímicos en la población de **Casos**, de acuerdo a la presencia de la variante rs5370 del gen *EDN-1*. Los datos representan la media ± desviación estándar de variables continuas (IMC, Circunferencia de cintura, PAS, PAD, CT, HDL, LDL, C no LDL, CT/HDL, LDL/HDL, TG/HDL, TG y glucosa), las diferencias entre genotipos se compararon mediante análisis univariado (P*) ajustando por edad, género y tabaquismo. Para TG y glucosa, se presentan las medias aritméticas, pero para análisis estadístico se tomo en cuenta el Ln de cada variable. Las variables categóricas están expresadas en porcentajes, y se compararon con la Prueba de X² (P**).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Características Generales de los Grupos de estudio

El índice de calcio en las arterias coronarias (iCAC) es considerado un marcador específico de aterosclerosis (Blankenhorn, 1961), y es un excelente parámetro para descartar la presencia de daño ateromatoso asintomático. Entre los individuos aparentemente sanos que acudieron a Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología con fines de donación, cerca del 25% presentaron iCAC mayor a cero, es decir, ya tenían daño ateromatoso en sus arterias coronarias. Por ser una proporción tan alta, se decidió estudiarlos como un grupo independiente con aterosclerosis subclínica (AS). Este es un hallazgo muy importante ya que 1 de cada 4 individuos adultos de población general que acuden a donación de sangre tienen aterosclerosis subclínica sin saberlo. Se desconoce qué proporción de estos individuos desarrollarán eventos coronarios en el futuro, pero este dato tiene relevancia epidemiológica, y amerita estudios clínicos de seguimiento a largo plazo.

La comparación de los parámetros clínicos en los tres grupos de estudio mostró algunos datos interesantes, principalmente en lo que se refiere a las diferencias entre los grupos de AS y EAC. En este sentido, los factores que parecen diferenciar a ambos grupos independientemente de posibles tratamientos anti-hipertensivos e hipolipemiantes son: la mayor frecuencia de hipertensión arterial, la mayor frecuencia de hipoalfa-lipoproteinemia, los menores niveles séricos de HDL y la mayor frecuencia de síndrome metabólico en el grupo EAC. Los otros parámetros del síndrome metabólico (hipertrigliceridemia, obesidad central y disglucemia) fueron similares en ambos grupos (EAC y AS), y significativamente mayores que en el grupo control.

Llama la atención que aunque la hipertensión arterial fue más frecuente en el grupo de EAC prematura, este grupo presenta niveles de presión arterial sistólica y diastólica significativamente más bajos que el grupo de AS ($P=0.013$ y $P=0.046$ respectivamente). Esto podría explicarse porque una proporción alta de casos (74%) están en tratamiento anti-hipertensivo, y así, aunque tienen

diagnóstico de hipertensión arterial, presentaron cifras de TA más bajas. Por otro lado se sabe que las estatinas disminuyen los niveles de las lipoproteínas aterogénicas y disminuyen significativamente los eventos clínicos y la mortalidad de aterosclerosis (Lusis, 2000). Así, aunque la hipercolesterolemia es un factor de riesgo bien establecido para la EAC, nuestro grupo de casos presentaba niveles significativamente menores de colesterol total, LDL y colesterol no-HDL que los otros 2 grupos. Esto probablemente también se deba a que el 94% de los casos estaba bajo tratamiento hipolipemiente.

7.2 Limitaciones de los Estudios de Asociación Caso-Control

Aunque los estudios de asociación han permitido confirmar de manera irrefutable la participación de varios genes y sus variantes alélicas en diferentes enfermedades multifactoriales (Loannidis *et al.*, 2003; Lohmueller *et al.*, 2003), esta estrategia tiene limitaciones que debe tomarse en cuenta: los resultados de los estudios de asociación suelen diferir de acuerdo a la población estudiada (Singaraja *et al.*, 2003; Knoblauch *et al.*, 2004; Tregouet *et al.*, 2004); en poblaciones genéticamente heterogéneas como la nuestra, pueden dar resultados falsos positivos si existe estratificación de la población (Hinds *et al.*, 2004; Ziv, 2003) o si el alelo en estudio tiene una baja frecuencia y/o un efecto relativamente pequeño. Como ya hemos mencionado, si el efecto de una variante es pequeño, se necesitan muestras muy grandes para tener un poder estadístico adecuado, pudiendo dar resultados falsos negativos [Wang *et al.*, 2005 (b)]. A pesar de estas limitaciones, este tipo de estudios han contribuido de manera importante a entender las bases genéticas de enfermedades multifactoriales, y en ocasiones a entender los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades.

7.3. Asociación de la variante R230C del gen ABCA1 con EAC

La función de la proteína ABCA1 es compleja, está implicada en el transporte reverso del colesterol y la formación de partículas HDL-C, pero se conoce muy poco de su función en otros tipos celulares (Oram y Heinecke, 2005). Se sabe que la variante R230C inhibe hasta un 30% el eflujo de colesterol de la proteína

ABCA1 in vitro (datos no publicados), por lo que puede considerarse que es un polimorfismo funcional. Recientemente esta variante se asoció a niveles bajos de HDL-C, síndrome metabólico, obesidad y diabetes mellitus en población mexicana, todos ellos factores de riesgo para la EAC (Villarreal-Molina *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2008). A pesar de esto, no se había estudiado la posible asociación de esta variante con la EAC prematura.

Estudios epidemiológicos han demostrado consistentemente una fuerte asociación entre los niveles bajos de HDL-C y el riesgo de isquemia miocárdica (Gordon *et al.*, 1989; Lancet, 2007), pero en otras poblaciones los resultados indican que tener niveles bajos de colesterol HDL por sí mismo no predice un aumento de riesgo para la cardiopatía isquémica (Schmidt, 2009). Existen varios estudios de asociación de otras variantes del gen *ABCA1* con niveles de HDL-C, enfermedad arterial coronaria, cardiopatía isquémica y aterosclerosis subclínica en que los resultados han sido inconsistentes (Clee *et al.*, 2001; Tregouet *et al.*, 2004; Brousseau *et al.*, 2001; Kyriakou *et al.*, 2005; Frikke-Schmidt 2009). Muchos de estos estudios analizan diferentes polimorfismos que son poco frecuentes en muestras de tamaño pequeño a moderado, lo cual puede explicar estas inconsistencias. Frikke-Schmidt *et al.*, (2008) reportó que 3 variantes no sinónimas (V771M, I883M y E1172D) del gen *ABCA1* aumentan el riesgo de enfermedad isquémica en la población danesa, mientras que otras variantes en el mismo gen no afectan el riesgo de EAC.

Inicialmente, por estar asociada con varios factores de riesgo para EAC, esperábamos que en la población de pacientes con EAC prematura (casos) la frecuencia del alelo de riesgo (alelo C) fuera mayor. Sin embargo, fue lo contrario, el alelo C fue más frecuente en individuos con aterosclerosis subclínica y en controles que en los casos ($P= 0.025$ y $P= 0.079$ respectivamente). Esto resulta muy interesante ya que independientemente de estar relacionado a más de un factor de riesgo, parecería que el alelo C confiere protección contra el infarto al miocardio. Hasta el momento nadie ha reportado variantes del gen *ABCA1* que confieran protección a desarrollar EAC, por lo que los resultados obtenidos podrían ser un hallazgo importante. Aunque la población de estudio es pequeña, el resultado fue significativo o se acercó a

la significancia, pero se debe aumentar la muestra para comprobar dicho resultado.

Parecería que la variante R230C aumenta el riesgo de aterosclerosis subclínica, es decir que causa daño al endotelio. Debe considerarse que existe la posibilidad de que los individuos con AS desarrollen eventos coronarios en un futuro, y que R230C fuera más frecuente en pacientes con EAC no prematura. Sin embargo, existe otra posibilidad relacionada con la función plaquetaria. Se sabe que las partículas de HDL-C inhiben la agregación plaquetaria. Así cuando la función de *ABCA1* es deficiente, bajan los niveles de HDL favoreciendo un estado pro-trombótico (Schmitz, 2006). Sin embargo, existe evidencia importante de que la disfunción de *ABCA1* altera la función de plaquetas: En primer lugar, los enfermos con síndrome de Tangier presentan trombocitopenia (niveles bajos de plaquetas en sangre) (Assman *et al.*, 2000), y sus plaquetas responden de manera diferente (mayor o menor) a diversos agentes agonistas en comparación con individuos normales (Shiastri *et al.*, 1980; Vergani *et al.*, 1984; Harmon *et al.*, 1986). Las plaquetas humanas expresan *ABCA1*, y la ausencia de esta proteína afecta la formación y liberación de cuerpos densos, y disminuye la capacidad de la respuesta de las plaquetas tanto a la colágena como a dosis bajas de trombina (Nofer *et al.*, 2004). Parece que esta falla en la respuesta a la colágena se debe a una disfunción de los cuerpos densos, que afecta la liberación de agonistas de los gránulos delta durante el proceso de activación plaquetaria. Además, los ratones Knockout *ABCA1* presentan diátesis hemorrágica leve, así como anomalías visibles en el aparato de Golgi de las plaquetas (Orso *et al.*, 2000). Por todo lo anterior, cabe la posibilidad de que los individuos portadores de la variante R230C con aterosclerosis subclínica tengan menor susceptibilidad a desarrollar eventos coronarios clínicos por presentar alteraciones leves en la función plaquetaria. Para poder dilucidar la razón por la cual la variante R230C es menos frecuente en individuos con EAC prematura, primeramente debe buscarse en un grupo de pacientes con EAC no prematura, y en segundo lugar cuantificar el número de plaquetas, observar las características de los cuerpos densos mediante microscopía electrónica y realizar pruebas finas de coagulación en individuos homocigotos y heterocigotos.

7.4. Asociación con los niveles de colesterol, obesidad, hipertensión y síndrome metabólico.

La dislipidemia más frecuente en toda la población estudiada fue la baja concentración plasmática de HDL-C, de acuerdo con lo previamente reportado en población mexicana (Aguilar- Salinas *et al.*, 2001). En estudios previos en población mestiza mexicana, la variante R230C se asoció a niveles bajos de HDL-C, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2, mayor IMC y obesidad (Villarreal-Molina *et al.*, 2007; Villarreal-Molina *et al.*, 2008). En nuestra población de controles, como era esperado, la variante R230C se asoció a niveles bajos de HDL-C (aunque no alcanzó significancia probablemente por el tamaño de la muestra), y a síndrome metabólico (P= 0.029). Algo muy interesante es que en nuestra población la variante no estuvo asociada con obesidad, IMC y circunferencia de cintura, lo cual podría deberse a que los factores ambientales juegan un papel más importante en el desarrollo de estos fenotipos.

Algo que es importante mencionar es que al observar el grupo de casos, los sujetos portadores de la variante R230C presentaron mayores niveles de colesterol total, LDL y colesterol no-HDL que los no portadores. Aunque este no es un estudio diseñado para estudiar diferencias en el efecto de fármacos hipolipemiantes, llama la atención esta diferencia, ya que no se ha reportado que la variante R230C afecte los niveles de colesterol en la población general, y el 93% de los casos están en tratamiento farmacológico hipolipemiante. Este hallazgo sugiere que la variante podría estar afectando la respuesta al tratamiento. Para analizar este posible efecto debe diseñarse un estudio específico de farmacogenómica.

7.5 Asociación de rs5370 del gen *EDN-1* con la EAC

La *EDN-1* es el vasoconstrictor más potente en el cuerpo y esta íntimamente relacionado con el endotelio vascular. Como resultado, se ha implicado a la *EDN-1* con diversos rasgos como niveles de lípidos en la sangre, hipertensión,

enfermedad cardiovascular y resistencia a la insulina (Shah, 2007). Se ha encontrado que el polimorfismo K198N (rs5370) del gen *EDN-1* se asocia con hipertensión y presión arterial sistólica en interacción con el IMC (particularmente obesos) en población Europea (Tiret *et al.*, 1999) y en japoneses (Asai *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2003), con resistencia a la insulina y deterioro del transporte de glucosa (Irving *et al.*, 2001; Strawbrige y Elmendorf, 2005-2006), síndrome metabólico y enfermedad arterial coronaria (Shah 2007; Kanaya *et al.*, 2007), y en población Australiana Occidental el alelo menor fue marginalmente asociado con un aumento en el grosor de la Íntima media carótida (IMT) (Wiltshire *et al.*, 2007). En población canadiense, el análisis de 103 genes candidato para la enfermedad arterial coronaria mostró asociación de rs5370 con niveles bajos de HDL-C, menores niveles de adiponectina e hipertensión arterial (Paré *et al.*, 2007).

Por estar asociado a diferentes factores de riesgo para la EAC en diversas poblaciones, consideramos necesario analizar el polimorfismo rs5370 como alelo de susceptibilidad para la EAC prematura. Sin embargo el alelo N198 no mostró asociación a la EAC prematura o a la AS (P=0.401 y P=0.232 respectivamente).

Al comparar los parámetros clínicos y bioquímicos en el grupo de controles de acuerdo al genotipo rs5370, solamente los niveles séricos de glucosa fueron significativamente menores en los portadores del alelo 198N (89.55 ± 14.55 vs 94.99 ± 28.27 , P=0.028), aún después de ajustar por sexo, IMC y edad. En el grupo de casos, también los niveles de glucosa fueron menores en portadores del alelo 198N, aunque sin alcanzar significancia estadística (P=0.077). Estos hallazgos son compatibles con la evidencia tanto clínica como experimental del papel de la *EDN-1* en la resistencia a la insulina previamente reportada en la literatura (Irving *et al.*, 2001; Strawbridge y Elmendorf, 2005-2006; Strawbridge *et al.*, 2005; Strawbridge y Elmendorf, 2006; Shin-Pei *et al.*, 2008). A pesar de toda esta evidencia, no se ha estudiado el papel de variantes polimórficas del gen *EDN-1* en la resistencia a la insulina, excepto en la población Australiana (Wiltshire *et al.*, 2007) donde no se encontró asociación. Por este motivo, es necesario confirmar estos resultados ampliando el tamaño de muestra y

realizar mediciones de insulina y HOMA-IR que es un parámetro más confiable para valorar la resistencia a la insulina.

Por otro lado, aunque hay evidencia de que la variante rs5370 se asocia a niveles bajos de HDL-C, síndrome metabólico, niveles de presión arterial y obesidad (Tirer *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2001; Jian *et al.*, 2003; Paré, 2007), el polimorfismo rs5370 no se asoció de manera estadísticamente significativa a niveles de HDL, LDL, triglicéridos, síndrome metabólico o diabetes mellitus. Sin embargo puede observarse que, aunque ninguno de los parámetros alcanzó significancia estadística, los portadores de la variante 198N tuvieron menor frecuencia de hipoalfa-lipoproteinemia (43.3 vs 51.6%), hipertrigliceridemia (37.3 vs 46.8%), hipercolesterolemia (29.9% vs 34.6%), colesterol no-HDL elevado (19.4% vs 29.3%), índice TG/HDL elevado (41.8% vs 52.1%), dislipidemia aterogénica (23.9 vs 34.6%), y menor promedio de la relación TG/HDL que es un factor de riesgo coronario bien establecido, el cual mostró una tendencia a la significancia estadística ($P=0.089$). Así, los portadores de la variante presentan menores niveles de glucosa, y aparentemente menor frecuencia de perfiles lipídicos aterogénicos. A pesar de que no alcanzan significancia estadística, es posible que el alelo 198N tenga un efecto menor en el perfil de lípidos, el cual podría evidenciarse al aumentar el tamaño de la muestra. Los posibles efectos metabólicos de esta variante también podrían estar enmascarados por el efecto más importante de R230C del gen *ABCA1* sobre las HDL-C. Por todo lo anterior, consideramos que debe seguirse estudiando el posible efecto de este polimorfismo en los parámetros metabólicos en la población mexicana.

VIII. CONCLUSIONES

- I. La aterosclerosis subclínica tiene una frecuencia alta (25%) en adultos mayores de 30 años aparentemente sanos en la población de la Ciudad de México.
- II. La variante R230C del gen *ABCA1* no confiere mayor riesgo de EAC prematura, ya que la frecuencia del alelo menor en pacientes con EAC prematura es baja. El alelo menor fue significativamente más frecuente en individuos con AS, aunque no se puede descartar la posibilidad de que estos individuos desarrollen un evento coronario futuro.
- III. En el grupo de controles, el alelo C230 mostró una tendencia estadística a la asociación con menores niveles de HDL-C, sin alcanzar la significancia probablemente porque la muestra es reducida.
- IV. No se observó asociación del alelo C230 con mayor IMC y obesidad, como estaba previamente reportado.
- V. La variante rs5370 del gen *EDN-1* no se asoció a niveles bajos de HDL-C, obesidad o síndrome metabólico.
- VI. El alelo menor de la variante rs5370 mostró asociación estadísticamente significativa a menores niveles de glucosa en ayuno, tanto en el grupo de controles como en el de casos.

IX. PERSPECTIVAS.

- I. El presente estudio aporta evidencia de que la variante R230C del gen *ABCA1* podría proteger a los individuos con lesión ateromatosa a desarrollar infarto al miocardio. Por lo tanto, será importante comprobar dicho efecto aumentando el tamaño de la muestra, buscando la frecuencia de la variante R230C en individuos con EAC no prematura, y evaluando la función plaquetaria de pacientes homocigotos C230C y heterocigotos R230C tanto *in vivo*, como *in vitro*.
- II. Al existir fármacos que regulan los niveles plasmáticos de colesterol, será necesario valorar si existen diferencias en la respuesta al tratamiento en individuos con genotipos homo y heterocigotos.
- III. Es necesario continuar evaluando el posible efecto de la variante rs5370 del gen *EDN-1* en la EAC y la AS aumentando el tamaño de la muestra.
- IV. Es de gran interés evaluar el efecto del polimorfismo rs5370 del gen *EDN-1* en los niveles de insulina y HOMA-IR plasmáticos, ya que los portadores de la variante presentaron niveles más bajos de glucosa por lo que podría estar jugando un papel importante en la resistencia a la insulina.

X. GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS.

ALELO: Es cada una de las formas alternativas que puede tener un gen; es decir, se presenta en diversas formas dentro de una población de individuos. Los organismos diploides poseen dos alelos de cada gen, uno de ellos procedente del padre y el otro de la madre. Cada par de alelos se ubica en igual locus o lugar del cromosoma.

En función de su expresión en el fenotipo se dividen en:

- Alelos dominantes: aquellos que aparecen en el fenotipo de los individuos heterocigotos o híbridos para un determinado carácter.
- Alelos recesivos: los que quedan enmascarados del fenotipo de un individuo heterocigoto y sólo aparecen en el homocigoto.

ALELO MAYOR: Aquel alelo que se presenta con mayor frecuencia en una población.

ALELO MENOR: Aquel alelo que es menos frecuente en una población.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO: Es la asociación no aleatoria de diferentes alelos en 2 o mas loci. Dichos loci indican que no segregan de forma independiente, es decir, que poseen frecuencia de recombinación menor del 50%. Esto suele deberse a que los loci implicados se encuentran muy cercanos.

DISLIPIDEMIA: Alteraciones en los niveles de lípidos y/o lipoproteínas en suero.

EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG (EHW): Establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural o algún otro factor, y no se produzca ninguna mutación. La ley de HW afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. También especifica que esas

frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus.

Un locus con dos alelos **A** y **a**, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el EHW predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante **AA** es p^2 , la del heterocigoto **Aa** es $2pq$ y la del homocigoto recesivo **aa** es q^2 ; cumpliendo la expresión $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ para una población que esta en equilibrio genético.

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN CASO CONTROL: Estudio comparativo de dos muestras, una de ellas constituida por sujetos que representan el suceso (casos) y la otra por sujetos que no tienen el suceso (controles), comparando la proporción de sujetos que tiene el factor cuya asociación se investiga.

EXÓN: Parte de un gen que permanece en el RNAm maduro. En los genes que codifican una proteína, son los exones los que contienen la información para producir la proteína codificada. Cada exón codifica una porción específica de la proteína completa, de manera que el conjunto de exones forma la región codificante del gen.

FRECUENCIA ALÉLICA: Frecuencia de un alelo específico en una población.

FRECUENCIA GENOTÍPICA: Frecuencia de cada genotipo (combinación de alelos) en una población. Para una variante autosómica que es bialélica (que existen sólo 2 alelos diferentes en la población), existirán 3 diferentes genotipos cuyas frecuencias sumadas deben ser = 1.

GEN: Es la unidad de información hereditaria que esta formada por un secuencia o segmento de DNA siendo la unidad genética capaz de mutar (Bruce, 2000). Estructuralmente es una secuencia determinada de nucleótidos, la cual puede llegar a formar proteínas. Estos nucleótidos se almacenan en fibras o hebras cuya estructura global forma lo que se conoce como ADN, el cual por procesos de transcripción y traducción dará lugar a una proteína.

HAPLOTIPO: Se define como la combinación de alelos en múltiples loci para un mismo cromosoma. Es el conjunto de SNPs en una sola cromátida que se encuentran estadísticamente asociados.

HDL Lipoproteínas de alta densidad (High density lipoproteins): Son aquellas lipoproteínas que transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado. Están compuestas principalmente de colesterol esterificado unidas a la apoproteína A1.

Estudios epidemiológicos muestran que altas concentraciones de HDL (superiores a 60 mg/dL) tienen un carácter protector contra las enfermedades cardiovasculares (como la cardiopatía isquémica e infarto de miocardio). Bajas concentraciones de HDL (por debajo de 35mg/dL) suponen un mayor riesgo de estas enfermedades.

HETEROCIGOTOS: individuos cuyos cromosomas tienen diferentes alelos en un locus específico.

HIPERCOLESTEROLEMIA: Niveles de colesterol total en suero > 200mg/dL en ayuno.

HIPERTRIGLICERIDEMIA: Niveles de triglicéridos en suero > 150mg/dL en ayuno (12hrs).

HIPOALFALIPOPROTEINEMIA: Niveles de HDL en suero < 35mg/dL en ayuno.

HOMOCIGOTOS: Individuos cuyos cromosomas tienen el mismo alelo en un locus específico.

INTRÓN: Parte del gen que se encuentra entre 2 exones y que es cortado en el proceso de maduración del RNAm. Son regiones no codificantes. Estos pueden contener información antigua, es decir; fragmentos de genes que probablemente se expresaban pero que ya no se expresan actualmente, o bien secuencias reguladoras.

ÍNTIMA: Capa más interna de la arteria, recubierta por células endoteliales y tejido conectivo.

LDL Lipoproteínas de baja densidad (Low density lipoproteins): Son macromoléculas circulantes derivadas del procesamiento lipolítico de las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), por acción de diversas lipasas extracelulares, principalmente la lipasa lipoproteica. Contienen partículas de colesterol unidas principalmente a la apoproteína B.

Estudios realizados en animales han demostrado que niveles elevados de colesterol en la fracción LDL ("colesterol LDL" o "colesterol malo") se asocian fuertemente al desarrollo de enfermedad aterosclerótica.

LIGAMIENTO: Es la asociación física entre dos loci, esto es, su cercanía en una misma hebra de ADN, lo que repercute en una baja frecuencia de recombinación entre ellos durante la meiosis y por lo tanto a una mayor probabilidad de herencia conjunta. Esto se debe a que los quiasmas, estructuras de entrecruzamiento generadas durante la recombinación, se producen al azar a lo largo de un cromosoma. Así a menor distancia entre dos loci, menor probabilidad de que se forme un quiasma y por lo tanto, se generen variantes recombinantes.

LOCUS: (del latín *locus*, lugar; plural *loci*) es una posición de un gen o un marcador genético sobre un cromosoma.

MEDIA ARTERIAL: Capa media de una arteria, formada principalmente por tejido muscular.

MUTACIÓN: Es una alteración o cambio en la información genética de un ser vivo, produciendo un cambio en el fenotipo que se presentan súbita y espontáneamente y que se puede transmitir o heredar a la descendencia.

PLACA DE ATEROMA: Degeneración y engrosamiento de la pared de arterias de gran y mediano calibre, dada por depósitos de colesterol, células inflamatorias y células musculares lisas, formando estrías grasas en el subendotelio.

RM, Razón de momios (OR- ODDS RATIO): Es el cociente entre la probabilidad de que un evento suceda y la probabilidad de que no suceda. Es una medida utilizada en los estudios epidemiológicos, sobre todo en los estudios de cohorte, asociación caso-control y meta-análisis.

SÍNDROME-METABÓLICO: Trastorno del metabolismo relacionado a la obesidad y la resistencia a la insulina que se presenta cuando un individuo cumple al menos de 3 de los 5 criterios establecidos en la Tabla 3.

SNP, Polimorfismo de un Solo Nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism): Es una variación en la secuencia de DNA que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)). Una de estas variaciones debe darse al menos en un 1% de la población para ser considerada como un SNP. Los SNP forman hasta el 90% de todas las variaciones genómicas y aparecen cada 100 a 300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano. Estas variaciones en la secuencia del DNA pueden afectar la susceptibilidad de los individuos a enfermedades.

Los SNPs pueden ocurrir en partes codificantes o no codificantes de un gen. La mayoría de los SNPs ocurren en los intrones (intrónicos). Los SNPs que causan un cambio de aminoácido en la proteína resultante se denominan SNPs codificantes no sinónimos. Un cambio en un solo aminoácido puede no ser importante si es conservador y ocurre fuera del sitio activo de la proteína. Los SNPs codificantes sinónimos son los que alteran la base situada en la tercera posición del codón pero no causa sustitución aminoacídica debido a la redundancia del código genético.

VARIABILIDAD GENÉTICA: Se refiere a la variación en el material genético de una población o especie. Esta variabilidad puede ser causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). Se dice que los procesos que eliminan la variabilidad genética son la selección natural y la deriva génica.

ABREVIATURAS

ABCA1	Proteína transportadora de colesterol dependiente de ATP (ATP- binding cassette A-1)
ADN	Acido desoxirribonucleico
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
<i>EDN-1</i>	Gen endotelina-1
HDL-C	Lipoproteínas de alta densidad (High density lipoprotein)
IMC	Índice de masa corporal
INCICH	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
ARN	Acido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
AHF	Antecedentes Heredo-familiares
NCEP	National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III [ATP-III])
RM	Razón de momios
AS	Aterosclerosis Subclínica
Ln	Logaritmo Natural
NS	No significativo
iCAC	Índice de Calcio Arterial Coronario

XI. REFERENCIAS.

1. Aguilar-Salinas CA, Olaiz G, Valles V, Torres JM, Pérez FJ, Rull JA, Rojas R, Franco A, Sepúlveda J. High prevalence of low HDL cholesterol concentrations and mixed hyperlipidemia in a Mexican nationwide survey. *Journal of Lipid Research*. 2001; 42:1298-307.
2. Asai T, Ohkubo T, Katsuya T, Higaki J, Fu Y, Fukuda M, Hozawa A, Matsubara M, Kitaoka H, Tsuji I, Araki T, Satoh H, Hasamichi S, Imai Y, Ogihara T. Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study. *Hypertension*. 2001; 38: 1321-1324.
3. Ashley EA, Niebauer J. Coronary artery disease. *Cardiology explained*, 2004.
4. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002; 105:310–315.
5. Assman G, Brewer HB Jr, von Eckardstein A. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases* (Scriver , C. R., Sly, W. S., Childs, B., Beaudet, A. L., Valle, D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., eds.). McGraw-Hill, New York 2000; 205: 2072,.
6. Baltazares M, Rodriguez H, Ortega J, Sotres A, Baltazares M. Sistema endotelina. *Rev. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Mex* 2005; 18: 308-320.
7. Barath A, Endreffy E, Bereczki C, Gellén B, Szucs B, Németh I, Túri S. Endothelin-1 gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in adolescents with juvenile and obesity-associated hypertension. *Acta Physiol Hung Journal Articles*. 2007 94; (1-2): 49-66.
8. Benton JL, Ding J, Tsai MY, Shea S, Rotter JI, Burke GL, Post W. Associations between two common polymorphisms in the ABCA1 gene and subclinical atherosclerosis: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. 2007; 193:352-60.
9. Bis JC, Heckbert SR, Smith NL, Reiner AP, Rice K, Lumley T, Hindorff LA, Marcianti KD, Enquobahrie DA, Monks SA, Psaty BM. Variation in inflammation-related genes and risk of incident nonfatal myocardial infarction or ischemic stroke. *Atherosclerosis*. 2008; 198: 166–173.
10. Blankenhorn DH. Coronary calcification, a review. *The American Journal of the Medical Sciences*. 1961; 242:1-9.

11. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics*. 1999; 22:347-51.
12. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature Genetics*. 1999; 22:336-45.
13. Brousseau ME, Bodzioch M, Schaefer EJ et al. Common variants in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 in men with low HDL cholesterol levels and coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2001; 154:607-611.
14. Brunham LR, Singaraja RR, Pape TD, Kejariwal A, Thomas PD, Hayden MR. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the ABCA1 gene. *PLoS Genetics*. 2005; 1:739-47.
15. Buhler K, Ufer M, Muller-Marbach A, Brinkman U, Laule M, Stangl V, Roots I, Stangl K, Cascorbi I. Risk of coronary artery disease as influenced by variants of the human endothelin and endothelin-converting enzyme genes. *Pharmacogenet Genomics*. 2007; 1:77-83.
16. Cenarro A, Artieda M, Castillo S, Mozas P, Reyes G, Tejedor D, Alonso R, Mata P, Pocoví M, Civeira F. A common variant in the ABCA1 gene is associated with a lower risk for premature coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *Journal of Medical Genetics*. 2003; 40:163-8.
17. Chou Y, Perng J, Juan C, *et al.*, Endothelin-1 inhibits insulina-stimulated glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1994;202: 688-693.
18. Christensen K, Murray JC. What genome-wide association studies can do for medicine. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 356: 1094-1097.
19. Clee SM, Zwinderman AH, Engert JC, et al. Common genetic variation in ABCA1 is associated with altered lipoprotein levels and a modified risk for coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 103: 1198-1205.
20. Cossrow N, Falkner B: Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities. *The Journal Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004; 89: 2590–2594.

21. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición ENSANUT 2006 del Instituto Nacional de Salud Pública www.insp.mx/ensanut2006
22. Evans D, Beil FU. The association of the R219K polymorphism in the ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) gene with coronary artery disease and hyperlipidemia. *Journal of Molecular Medicine*. 2003; 81:264-70.
23. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995; 92:657-671.
24. Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ES, Kastelein JJ, Duriez P. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation*. 2004; 109:II15-19.
25. Fuster V, Stein B, Ambrose JA. Atherosclerosis plaque rupture and thrombosis involving concepts. *Circulation*. 1990;82:SI147-59.
26. Gibson NJ, The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2006; 363(1-2): 32-47.
27. Goodarzi MO, Taylor KD, Guo X, Quiñones MJ, Cui J, Li Y, Saad MF, Yang H, Hsueh WA, Hodis HN and Rotter JI. Association of the diabetes gene calpain-10 with subclinical atherosclerosis. The Mexican-American coronary artery disease study. *Diabetes*. 2005;54: 1228-1232.
28. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79:8-15.
29. Grundy SM, Hansen B, Smith SC, Cleeman JI, Kahn RA; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Diabetes Association. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*. 2004; 109: 551-556.
30. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani MF, Toti F, Chaslin S, Freyssinet JM, Devaux PF, McNeish J, Marguet D, Chimini G. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biology*. 2000; 2:399-406.
31. Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, Zhou Z, Chimini G. Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. *PLoS ONE*. 2006; 1:e120.
32. Harmon JT, Tandon NH, Hoeg JM, Jamieson GA. Thrombin binding and response in platelets from patients with dyslipoproteinemias: increased

33. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 1985; 248(5 Pt1): 550-556.
34. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R, Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*. 1993; 11:10026-1023.
35. Huertas-Vázquez A, Aguilar-Salinas C, Lasis AJ, Cantor RM, Canizales-Quinteros SS, Lee JC, Mariana-Núñez L, Riba-Ramírez RM, Jokiaho A, Tusié-Luna T, Pajukanta P. Familial combined hiperlipidemias in Mexicans: association with upstream transcription factro 1 and linkage on chromosome 16q24.1. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology*. 2005; 9: 1985-1991.
36. Irving RJ, Noon JP, Watt GC, Webb DJ, Walker BR. Activation of the endothelin system in insulin resistance. *QJM*. 2001; 94: 321-326.
37. Ishibashi K, Imamura T, Sharma P, Huang J, Ugi S, Olefsky J, Chronic endothelin-1 treatment leads to heterologous desensitization of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;107: 1193-1202.
38. Jiang Z, Zhou Q, Chatterjee A, , Feener EP, Myers MG Jr, White MF, King GL. Endothelin-1 modulates insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase pathway in vascular smooth muscle cells, *Diabetes*. 1999;48: 1120-1130.
39. Jin JJ, Nakura J, Wu Z, Yamamoto M, Abe M, Tabara Y, Yamamoto Y, Igase M, Kohara K, Miki T. Association of endothelin-1 gene variant with hipertensión. *Hypertension*. 2003; 41: 163-167.
40. Juan G, Fang V, Huang Y, Kwok C, Hsu Y, Ho L. Endothelin-1 induces insulina resistance in conscious rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;227: 694-699.
41. Kaetsu A, Kishimoto T, Osaki Y, Okamoto M, Fukumoto S, Kurozawa Y. The lack of relationship between an endothelin-1 gene polymorphism (Ala228ser) and incidence of hypertension: a retrospective cohort study among Japanese Workers. *Journal of Epidemiology*. 2004; 4: 129-136.
42. Kanaya AM, Barret-Connort E, Wassel Fyr Cl. Endothelin-1 and prevalent coronary heart disease in older mend and women (the rancho Bernardo Study). *American Journal Cardiology*. 2007; 4: 486-490.
43. Knoblauch H, Bauerfeind A, Toliat MR, Becker C, Luganskaja T, Gunther UP, Rahde K, Schuster H, Junghans C, Luft FC, Nurnberg P and Reich JG. Haplotypes and SNPs in 13 lipid relevant genes explain most of the

- genetic variance in high density lipoprotein and low- density lipoprotein cholesterol. *Human Molecular Genetics*. 2004; 13: 993-1004.
44. Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C>T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2002; 288: 2023– 2031.
 45. Kyriakou T, Pontefract DE, Viturro E, Hodgkinson CP, Laxton RC, Bogari N, Cooper G, Davies M, Giblett J, Day INM, Simpson IA, Albrecht C, Ye S. Functional polymorphism in ABCA1 influences age of symptom onset in coronary artery disease patients. *Human Molecular Genetics*. 2007;16: 1412-1422.
 46. Prospective studies collaboration. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *The Lancet*. 2007; 370: 1829-1839.
 47. Lee J, Cheong SS, Kim J. Association of endothelin-1 gene polymorphism with variant angina in Korean patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008; 11: 1575-1580.
 48. Li H, Louey JW, Choy KW, Liu DT, Chan WM, Chan YM, Fung NS, Fan BJ, Baum L, Chan JC, Lam DS, Pang CP. END-1 Lys198Asn is associated with diabetic retinopathy in type 3 diabetes. *Molecular Vision*. 2008;14:1698-704.
 49. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420: 868-874.
 50. Libby Peter. Enfermedades Cardiovasculares. In: Harrison Principios de Medicina, 16a Edición. Mc Graw Hill Interamericana Eds. Chile 2005. pps 1576-1583.
 51. Liu S, Schmitz C, Stampfer MJ, Sacks F, Hennekens CH, Lindpaintner K, Ridker PM. A prospective study of TaqIB polymorphism in the gene coding for cholesteryl ester transfer protein and risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2002; 161: 469–474
 52. Lloyd-Jones DM et al. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2004;291: 2204–2211.
 53. Loannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-loannidis DG. Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *The Lancet*. 2003; 361: 567-571.
 54. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirshhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of

55. López AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murria CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*. 2006;367: 1747-57.
56. Lusis Aldons J. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407: 233-240.
57. Maeda S, Jesmin S, Iemitsu M, Otsuki T, Matsuo T, Ohkawara K, Nakata Y, Tanaka K, Goto K, Miyauchi T. Weight loss reduces plasma endothelin-1 concentration in obese men. *Experimental Biolgy and Medicine*. 2006;231: 1044-1047.
58. Malarstig A, Wallentin L Siegbahn A. Genetic variation in the interleukin-6 gene in relation to risk and outcomes in acute coronary syndrome. *Thrombosis Research*. 2007; 119: 467–473.
59. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *The New England Journal of Medicine*. 1994;330: 1041-6.
60. McGuigan FE, Ralston SH. Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan. *Psychiatric Genetics*. 2002; 12(3): 133-136.
61. Myers, R. H., Kiely, D. K., Cupples, L. A. & Kannel, W. B. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease:the Framingham study. *American Heart Journal*. 1990;120: 963–969.
62. National Center for Biotechnology Information. Pubmed Home [en línea] 2009 [28 Marzo 2009] URL disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
63. Nofer JR, Herminghaus G, Brodde M, Morgenstern E, Rust S, Engel T, Seedorf U, Assman G, Bluethmann H and Kehrel E. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier Disease). *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279(32): 34032-34037.
64. Oram JF, Heinecke JW. ATP- binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiological Reviews*. 2005; 85: 1343-1372.
65. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit W, Diedrich A, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lanckner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abca1- deficient mice. *Nature Genetics*. 2000; 24: 192-196.

66. Ottosson-Seeberger A, Lundberg JM, Alvestrand A, Ahlberg G. Exogenous endothelin-1 causes peripheral insulin resistance in healthy humans. *Acta Physiologica. Scan.* 1997; 161: 211-220.
67. Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Ohnishi Y, Sekine A, Sato H, Odashiro K, Nobuyoshi M, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T. Functional SNPs in the lymphotoxin-a gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature Genetics.* 2002; 32: 650–654.
68. Panoulas VF, Douglas KM, Smith JP, Taffè P, Stavropoulos-Kalinoglou A, Toms TE, Elisaf MS, Nightingale P, Kitas GD. Polymorphism of the endothelin-1 gene associated with hypertension in patients with rheumatoid arthritis. *Endothelium.* 2008;4:203-12.
69. Paré G, Serre D, Brisson D, Anand S, Montpetit A, Tremblay G, Engert J, Hudson T, Gaudet D. Genetic analysis of 103 candidate genes for coronary artery disease and associated phenotypes in a founder population reveals a new association between endothelin-1 and high-density lipoprotein cholesterol. *The American Journal of Human Genetics.* 2008;80: 673-682.
70. Popov A, Schulz E, Hinz J, Schmitto J, Seipelt R, Koziolok M, Rosenberger A, Schoendube F, Muller G. Impact of endothelin-1 Lys 198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives. *Coronary artery disease.* 2008; 7: 429-434.
71. Ross R. Atherosclerosis --an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine.* 1999;340: 115-126.
72. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics.* 1999; 22:352-5.
73. Shah R. Endothelins in health and disease. *European Journal of Internal Medicine.* 2007; 18: 272-282.
74. Schroeder KB, Schurr TG, Long JC, Rosenberg NA, Crawford MH, Tarskaia LA, Osipova LP, Zhadanov SI, Smith DG. A private allele ubiquitous in the Americas. *Biology Letters.* 2007;3: 218-233.
75. Schmitz G, Schambeck C. Molecular defects in the ABCA1 pathway affect platelet function. *Journal of Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 2006; 17: 166-174.
76. Schmitz F, Mevissen V, Krantz C, Kimmel M, Erdman J, Hoffmann R, Zerres K, Ortlepp JR. Robust association of the APOE e4 allele with premature myocardial infarction especially in patients without hypercholesterolemia: the Aachen study. *European Journal of Clinical Investigation.* 2007; 37(2): 106-108.

77. Shastri KM, Carvalho ACA, Lees RS. Platelet function and platelet lipid composition in the dyslipoproteinemias. *Journal of Lipid Research*. 1980; 21: 467-472.
78. Shioji K, Nishioka J, Naraba H, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Kawano Y, Miyara T, Miyazaki S, Goto Y, Nonogi H, Tago N, Iwai N. A promoter variant of the ATP-binding cassette transporter A1 gene alters the HDL cholesterol level in the general Japanese population. *The American Journal of Human Genetics*. 2004; 49:141-7.
79. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and Atherosclerosis: The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2003; 23:720-7.
80. Schmidt RF, Nordestgaard BG, Stene M, Sethi A, Remaley AT, Schnohr P, Grande P, Tybjaerg-Hansen A. Association of Loss-of-Function Mutations in the ABCA1 Gene with High-Density Lipoprotein cholesterol levels and risk of Ischemic Heart Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2008;299(21): 2524-2532.
81. Schmidt RF. Genetic variation in the ABCA1 gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Atherosclerosis* 2009; 10967: 1-12.
82. Srinivasan SR, Li S, Chen W, Boerwinkle E, Berenson G. R219K polymorphism of the ABCA1 gene and its modulation of the variations in serum high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides related to age and adiposity in white versus black young adults. *The Bogalusa Heart Study. Metabolism*. 2003; 52:930-4.
83. Strawbrige AB, Elmenfort JS. Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate reverse endothelin-1 induced resistance via an actin- dependent mechanism. *Diabetes*. 2005; 54: 1698-1705.
84. Strawbrige AB, Elmenfort JS. Endothelin-1 impairs glucose transporter trafficking via a membrane-based mechanism. *The Journal of Cell Biology*. 2006; 97: 849-856.
85. Tan JHH, Low PS, Tan YS, Tong MC, Saha N, Yang H, Heng CK. ABCA1 gene polymorphisms and their associations with coronary artery disease and plasma lipids in males from three ethnic populations in Singapore. *Human Genetics*. 2003; 113:106-17.
86. Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, Miyata T. Evaluation of the Lys198Asn and 134delA genetic polymorphism of the endothelin-1 gene. *Hypertension Research*. 2004;27:367-371.

87. Tatsuguchi M, Furutani M, Hinagata J, Tanaka T, Furutani Y, Imamura S, Kawana M, Masaki T, Kasanuki H, Sawamura T, Matsuoka R. Oxidized LDL receptor gene (OLR1) is associated with the risk of myocardial infarction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003; 303: 247–250.
88. Tiret L, Poirier O, Hallet V, McDonagh TA, Morrison C, McMurray JJV, Dargie HJ, Arveiler D, Ruidavets J-B, Luc G, Evans A, Cambien F. The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people. *Hypertension*. 1999; 33: 1169-1174.
89. Tousoulis D, Briasoulis A, Papageorgiou N, Antoniadis C, Stefanadis C. Candidate gene polymorphism and the 9p21 locus in acute coronary syndromes. *Trends in Molecular Medicine*. 2008; 10: 441-449.
90. Tregouet DA, Ricard S, Nicaud V, Arnould I, Soubigou S, Rosier M, Duverger N, Poirier O, Macé S, Kee F, Morrison C, Deneffe P, Tiret L, Evans A, Deleuze JF, Cambien F. In-depth haplotype analysis of ABCA1 gene polymorphisms in relation to plasma ApoA1 levels and myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24:775-81.
91. Vergani CG, Plancher AC, Zuin M, Cattaneo M, Tramaloni C, Maccari S, Roma P, Catapano AL. Bile lipid composition and haemostatic variables in a case of high density lipoprotein deficiency (Tangier disease). *European Journal of Clinical Investigation*. 1984; 14: 49-54.
92. Villarreal-Molina MT, Aguilar-Salinas C, Rodríguez-Cruz M, Riaño D, Villalobos-Comparan M, Coral-Vázquez R, Menjivar M, Yescas-Gómez P, Konisberg-Fainstein M, Tusie-Luna T, Canizales-Quinteros S and The Metabolic Research Group. The ABCA1 R230C Variant Affects HDLcholesterol Levels and Body Mass Index in the Mexican Population: Association with Obesity and Obesity-Related Comorbidities. *Diabetes*. 2007; 56: 1881-1887.
93. Villarreal-Molina MT, Flores-Dorantes MT, Arellano-Campos O, Villalobos-Comparán M, Rodríguez-Cruz M, Ramirez-Campuzano R, Huertas-Vazquez R, Menjivar M, Wachter NH, Tusié-Luna MT, Cruz-López M, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S and The Metabolic Study Group. Association of the ABCA1 R230C Variant with Early-Onset Type 2 Diabetes in the Mexican Population. *Diabetes*. 2008;57: 509-513.
94. Wang D, Yang H, Quiñones MJ, Bulnes-Enríquez I, Jiménez X, De La Rosa R, Modilevsky T, Yu K, Li Y, Taylor KD, Hsueh WA, Hodis HN, Rotter JI. A genome-wide scan for carotid artery intima-media thickness: The Mexican- American coronary artery disease family study. *Stroke*. 2005 (a); 36: 540-545.

95. Wang WYS, Barrat BJ, Cayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: Theoretical and practical concerns. *Nature Reviews*. 2005 (b); 6: 109-118.
96. Wiltshire S, Powell BL, Jennens M, McCaskie PA, Carter KW, Palmer LJ, Thompson. Investigating the association between K198N coding polymorphism in END-1 and hypertension, lipoprotein levels, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Human Genetics*. 2008;123 :307-13.
97. Wittrup HH, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Lipoprotein lipase mutations, plasma lipids and lipoproteins, and risk of ischemic heart disease: a meta-analysis. *Circulation*. 1999; 99: 2901–2907.
98. Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu YX, Endo K, Arinami T, Hamaguchi H. Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein AI levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. *Metabolism*. 2004; 53:182-6.
99. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332: 411-415.
100. Yusuf, S. et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*. 2004;364: 937–952.
101. Zravkovic, S. et al. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20,966 Swedish twins. *Journal of Internal Medicine*. 2002;252: 247–254.
102. Zha X, Gauthier A, Genest J, McPherson R. Secretory vesicular transport from the Golgi is altered during ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)-mediated cholesterol efflux. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:10002-5.
103. Zhu G, Carlsen K, Lenney W, Silverman M, Whyte M, Hosking L, Helms P, Roses A, Hay D, Barnes M, Anderson W, Pillai S. Polymorphism in the endothelin-1 are associated with asthma in two populations. *Genes and immunity*. 2008;9: 23-29.
104. Ziv E, Burchard EG. Human population structure and genetic association studies. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 431-441.