



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Hospital General Regional No.1 Dr Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro

Frecuencia de polimorfismos genéticos (PAI-1 4G/5G, ENOS G894T, MTHFR C677T) en pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus tipo 2 con y sin complicaciones macrovasculares

TESIS

que para optar por el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA

Megan Carolina Cerda Mancillas

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Irma Isordia Salas

Instituto Mexicano del Seguro Social, HGR. No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Abraham Salvador Majluf Cruz

Instituto Mexicano del Seguro Social, HGR. No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis.

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, División de Medicina Genómica y Genética Clínica.

Ciudad de México, Enero 2019



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.

DEDICATORIAS

A Manuel por impulsarme a seguir adelante con amor incondicional, por nunca dejar de soñar y por acompañarme día a día en este trayecto.

A mi hermana por seguir iluminando mi vida con su recuerdo y permanecer en mi corazón.

A mis padres y a mi hermano Ivan por su cariño y apoyo constante y por el ejemplo que representan.

A Alex, por traer mayor felicidad a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme iniciar este proyecto de vida y cumplir una meta más.

A la Dra. Irma Isordia por su apoyo como tutora durante la Maestría.

A mis profesores y compañeros, por hacer más franqueable el camino y disfrutar del mismo.

A mis amigos y colegas y a todos los pacientes quienes con su colaboración hicieron posible el desarrollo y culminación del protocolo.

ÍNDICE

Glosario de Abreviaturas	4
Resumen	5
Marco de Referencia y Antecedentes	
- Diabetes Mellitus tipo 2	7
- Fisiopatología	9
- Polimorfismos genéticos	11
- El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en Diabetes Mellitus 2	15
- Posibles mecanismos que condicionen una sobreexpresión de PAI-1	16
- El polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 y Diabetes Mellitus 2	17
- Disfunción endotelial en Diabetes Mellitus 2	20
- El polimorfismo G894T en el gen de la enzima sintetasa de óxido nítrico (eNOS), como posible factor de riesgo de disfunción endotelial en DM2	21
- El polimorfismo en el gen de la enzima 5,10 MTHFR	25
Justificación	28
Planteamiento del problema	28
Pregunta de investigación	29
Hipótesis	30
Objetivos	30
Sujetos, material y método	32
Criterios de selección	32
Variables de estudio	33
Tamaño de muestra	36
Descripción general del estudio	38
Análisis estadístico	39
Aspectos éticos	40
Resultados	41
Discusión	50
Conclusiones	55
Referencias bibliográficas	56
Anexos	75

ABREVIATURAS

UIMTHA	Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis
DM2	Diabetes Mellitus 2
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno tisular tipo 1 eNOS Óxido nítrico sintasa endotelial
MTHFR	Metilentetrahidrofolatoreductasa
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción
OMS	Organización Mundial de la Salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
HbA1c	Hemoglobina Glucosilada
EVC	Enfermedad vascular cerebral
EAP	Enfermedad arterial periférica
ECV	Enfermedad cardiovascular
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
IAM	Infarto agudo de Miocardio
tPA	Activador del plasminógeno tisular
pb	pares de bases
HDL	lipoproteínas de alta densidad
LDL	lipoproteínas de baja densidad
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

Frecuencia de polimorfismos genéticos (PAI-1 4G/5G, ENOS G894T, MTHFR C677T) en pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus tipo 2 con y sin complicaciones macrovasculares

Introducción. La Diabetes Mellitus 2 (DM2) representa un problema de salud mundial. Según la ENSANUT de MC 2016 la prevalencia en México oscila en 9.4%. Las complicaciones cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en este grupo de pacientes. Como enfermedad multifactorial, la influencia genética y ambiental contribuyen a su desarrollo y al de sus complicaciones. Algunas de las más importantes giran en torno a la enfermedad cardiovascular cuya etiopatogenia involucra diversas vías fisiopatológicas entre las cuales se han descrito la disfunción endotelial y alteraciones del sistema de coagulación favoreciendo el desarrollo de un estado protrombótico. Este último ocasionado en parte por la hipofibrinólisis secundaria al aumento en los niveles de PAI-1, así como de factores de coagulación; hiperhomocisteinemia y el desbalance en la generación de óxido nítrico como factores contribuyentes al desarrollo de disfunción endotelial. Se han descrito variantes genéticas que codifican para estas proteínas involucradas (PAI-1, homocisteína, óxido nítrico) y que pueden alterar su expresión tanto en sus niveles y/o actividad por lo que pueden ser considerados factores de riesgo en el desarrollo de las complicaciones previamente comentadas. Es necesario determinar el papel de dichas variantes genéticas en el desarrollo de la enfermedad aterotrombótica en nuestra población para reconocer individuos con mayor riesgo cardiovascular que se beneficien de intervenciones más estrictas y oportunas.

Objetivo. Determinar la frecuencia de los alelos de riesgo de los polimorfismos 4G/5G en el gen del PAI-1 (rs1799889), el G894T en el gen de eNOS (rs1799983) y el C677T en el gen de 5,10 MTHFR (rs1801133) en pacientes con DM2 con y sin enfermedad cardiovascular sintomática.

Material y métodos. Estudio observacional, transversal, analítico en pacientes con DM2. El estudio incluyó a 167 pacientes con DM2 quienes no habían presentado complicaciones macrovasculares y 167 pacientes con DM2 con complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (enfermedad vascular cerebral y/o enfermedad arterial coronaria). Se obtuvieron muestras de sangre periférica para determinar la presencia de los diferentes genotipos y alelos de los polimorfismos 4G/5G en el gen del PAI-1 (rs1799889), el G894T

en el gen de eNOS (rs1799983) y el C677T en el gen de 5,10 MTHFR (rs1801133) mediante técnica de PCR-RFLP. Se analizó si las variantes genéticas consideradas de riesgo se relacionan con la presencia de complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas, así como otros factores tradicionales de riesgo cardiovascular incluyendo sexo, edad, hipertensión, tabaquismo, dislipidemia, y antecedentes familiares de ECV.

Resultados. La mediana de edad global fue de 63 (57-70) años, más del 50% de los pacientes tenían diagnóstico de DM2 de larga evolución (>10 años). Dentro del grupo de pacientes con complicaciones macrovasculares, 100 pacientes (59.9%) correspondieron al subgrupo de EAC, 82 sujetos presentaron evidencia de enfermedad vascular cerebral isquémica y 17 (10.2%) cursaron con ambas patologías.. El polimorfismo PAI-1 4G/5G no presentó diferencia en la frecuencia alélica ni distribución genotípica entre los grupos, el alelo 4G se encontró 23.3% de pacientes sin complicaciones vs 27.8% de los sujetos con ECV ($p = 0.931$). Para el polimorfismo ENOS G894T la frecuencia del alelo T fue mayor en pacientes que ya habían tenido manifestaciones de ECV comparado con el grupo sin complicaciones (9 vs 20%, $p < 0.001$) estimando un riesgo 2.5 veces mayor para la presencia del compuesto de complicaciones macrovasculares. La distribución genotípica también mostró diferencias entre ambos grupos en los modelos de herencia dominante (G/G vs G/T + G/G) con una frecuencia del alelo de riesgo de 35.3% para los casos complicados vs 17.4% en aquellos con ausencia de complicaciones ($p < 0.001$); en el modelo recesivo (G/G + G/T vs T/T) la frecuencia fue de 4.8% vs 0.6% respectivamente mostrando también diferencia significativa. Para el MTHFR C677T, los alelos y genotipos de riesgo se distribuyeron de manera similar en ambos grupos. En la regresión logística múltiple el alelo 894T de eNOS permanece como factor de riesgo independiente (OR 2.19 [1.26-3.8], $p=0.005$), así como edad (OR 1.03 [1.006-1.05], $p=0.014$), tiempo de evolución de DM2 (OR 2.03 [1.24-3.33], $p=0.005$), e hipertensión arterial (OR 2.38 [1.43-3.94], $p=0.001$).

Conclusiones. Los factores clínicos como edad, tiempo de evolución de DM2 e hipertensión arterial se mantienen como elementos predominantes en el desarrollo de ECV. En nuestra población observamos una mayor frecuencia del alelo T de *ENOS* G894T y la combinación de los 3 alelos de riesgo en los casos de pacientes diabéticos con complicaciones. Estos resultados sugieren el posible rol de factores genéticos en la susceptibilidad a desarrollar dichas complicaciones cardiovasculares.

Palabras clave.

DM2, ECV, Polimorfismos genéticos, *PAI-1* 4G/5G, *eNOS* G894T, *MTHFR* C677T

MARCO DE REFERENCIA Y ANTECEDENTES.

Diabetes Mellitus tipo 2.

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) representa un grave problema de salud en todo el mundo con un incremento en dimensiones epidémicas. Según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diagnóstico de DM2 en 2014, frente a los 108 millones en 1980. La prevalencia mundial en adultos casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4.7% al 8.5%, incrementándose en países de ingreso medio y bajo. (1)

La DM2 es más frecuente en adultos y en ciertos grupos étnicos: afroamericanos, hispanos, americanos, asiáticos, americanos en las islas del Pacífico y amerindios. En México, según la ENSANUT 2016, la prevalencia aumentó a 9.4% (esto con base en un diagnóstico previo de la enfermedad). Entre esta población las mujeres reportan mayores índices de diabetes (10.3%), y el grupo de edad con mayor prevalencia incluye a los de 60 a 69 años (2).

Según el INEGI y la Organización Mundial de la Salud (OMS), la DM2 ocupó el segundo lugar en mortalidad sólo precedida por enfermedades cardiovasculares (3).

La diabetes puede ser clasificada en forma general en las siguientes categorías (4):

- Diabetes tipo 1 (por destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, llevando usualmente a la deficiencia absoluta de insulina).
- Diabetes tipo 2 (por pérdida progresiva de la secreción de insulina por las células β del páncreas frecuentemente sobre la base de resistencia a la insulina).
- Diabetes mellitus gestacional (diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo que no fue diabetes claramente manifiesta previo a la gestación).
- Tipos específicos de diabetes secundarios a otras causas (síndromes monogénicos de diabetes [como diabetes neonatal, MODY–maturity onset diabetes of the Young-

], diabetes por enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística), diabetes inducida por químicos o fármacos (como uso de glucocorticoides, en el tratamiento de VIH/SIDA, o después de algún trasplante).

La diabetes puede diagnosticarse basado en criterios de glucosa plasmática como glucemia en ayuno o glucosa plasmática 2 horas después de una prueba de tolerancia oral con 75g de glucosa o hemoglobina glucosilada (HbA1c). (Tabla 1)

Tabla 1. Criterios diagnósticos de diabetes

- Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL (7.0mmol/L). Ayuno se define como ingesta no calórica por al menos 8 horas.*
ó
- Glucosa ≥ 200 mg/dL (11.1mmol/L) 2 horas después de una prueba de tolerancia oral de glucosa. La prueba debe realizarse como se describe por la OMS, usando una carga de glucosa equivalente a 75g de glucosa anhidra disuelta en agua.*
ó
- HbA1c $\geq 6.5\%$ (48mmol/mol). La prueba debe realizarse en un laboratorio que utilice un método certificado por NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) y estandarizado por el ensayo DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*)*
ó
- En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, glucosa plasmática al azar de ≥ 200 mg/dL (11.1mmol/L)

*En ausencia de hiperglucemia inequívoca los resultados deben confirmarse con la repetición de la prueba en momentos diferentes. *Diabetes Care Volume 40, Supplement 1, January 2018. (4)*

Muchos de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 no logran un adecuado control glucémico, presentando complicaciones asociadas de tipo macrovascular incluyendo enfermedad coronaria, enfermedad vascular cerebral (EVC) y enfermedad arterial periférica; asimismo la microangiopatía como retinopatía, neuropatía y nefropatía merman la calidad de vida y sobrevida de los pacientes.

Los pacientes con DM2 tienen un riesgo 2 a 3 veces mayor de desarrollar cardiopatía isquémica y EVC isquémica comparados con individuos sin diabetes. Las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en este grupo de pacientes (5–7).

El porcentaje de pacientes con DM2 que cursan con complicaciones macrovasculares no es del todo certero, a nivel mundial las cifras varían de acuerdo a cada población y el tipo de complicación específica.

Según Fang en el período de 2006 a 2010 la prevalencia de cardiopatía isquémica en Estados Unidos (sin considerar el diagnóstico de DM2) fue de 11.6% en amerindios, 6.5% en afroamericanos, 6.1% en hispanos, 5.8% en caucásicos y 3.9% en asiáticos (8). Mohammed refiere que del total de pacientes con enfermedad coronaria la proporción de pacientes con diabetes difiere en los ensayos clínicos y en los registros generales desde 15.1-21.4%, aunque en India los números se elevan hasta 39.1% (9).

Es difícil conocer la prevalencia global de las complicaciones cardiovasculares no sólo debido al infrarreporte de los datos sino también a la naturaleza letal de estas condiciones en muchos de los casos.

O'Connell evaluó las diferencias bioétnicas en la presentación de complicaciones en pacientes con DM2 encontrando una prevalencia de EVC de 6.9% en amerindios vs 5.5% en caucásicos; cardiopatía isquémica en 5.5% vs 7.2%; y en general de cualquier tipo de complicación cardiovascular en 13.7 vs 15% (10).

En México en 2011, se realizó una estimación de la incidencia de complicaciones cardiovasculares relacionadas a DM2 usando el modelo UKPDS determinando una esperanza de vida promedio de 10.9 años (IC 95% de 10.7-11.2%) y la incidencia a 20 años de complicaciones crónicas por cada 1000 individuos de: cardiopatía isquémica 112, infarto de miocardio 260, insuficiencia cardíaca 113, EVC 101 y amputación 62 (11).

Fsiopatología

La DM2 es una enfermedad metabólica compleja resultado de la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales. Sin embargo, en la última década los trabajos de investigación han demostrado un patrón hereditario de la enfermedad, en donde familiares de pacientes con DM2 presentan un riesgo 2-6 veces mayor comparado con los sujetos sin antecedentes familiares (12,13).

La DM2 se caracteriza por resistencia a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas (pérdida progresiva de la secreción de insulina), cuyo balance varía ampliamente en los individuos.

Estudios previos han demostrado que en los pacientes con DM2 existe una disminución en la función del sistema fibrinolítico y disfunción endotelial lo que favorece la aparición de micro y macroangiopatía con incremento consecuente en la morbimortalidad.

Existen diversas líneas fisiopatológicas involucradas en el desarrollo de las complicaciones de DM2 principalmente de la enfermedad cardiovascular: el metabolismo lipídico, inflamación, disfunción endotelial, trombosis y hemostasia lideran los estudios.

En este caso la DM2 y enfermedades cardiovasculares se han asociado con un estado protrombótico caracterizado por múltiples cambios en cuanto a niveles y actividad de factores involucrados en coagulación y fibrinólisis. Es así que la generación de trombina se ve incrementada, la expresión y actividad de factor tisular, FVII, FVIII, factor de von Willebrand, FXII y fibrinógeno se encuentran elevados. El estado hipofibrinolítico se ve reflejado principalmente con niveles elevados de PAI-1.

La activación plaquetaria también forma parte del proceso de aterosclerosis con aumento en la producción de tromboxano A2 y en la expresión de receptores GPIIb/IIIa (14–17).

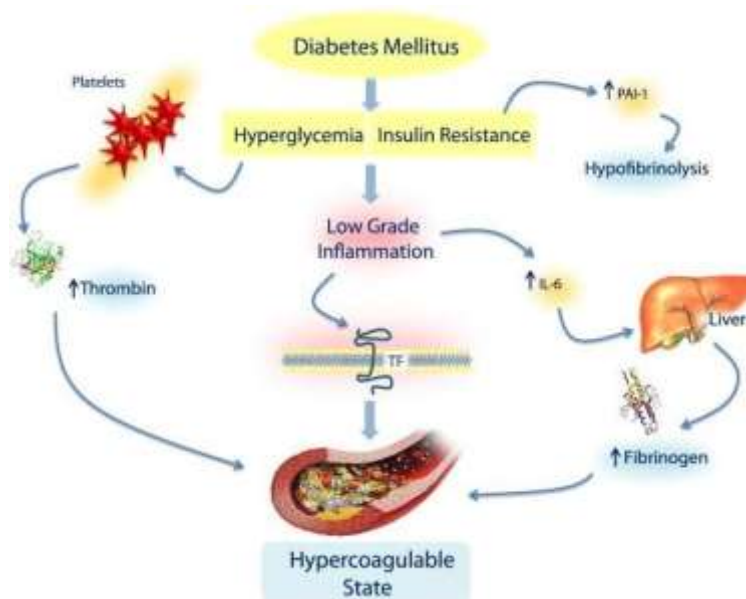


Figura 1. Mecanismos protrombóticos en DM2. Tomado de Vazzana et al. *Thrombosis Research* 2012. (14)

Dado que el proceso aterosclerótico puede iniciar años antes de presentar manifestaciones clínicas, debe aprovecharse esta oportunidad para instaurar medidas preventivas y evitar o retrasar su aparición (18).

Polimorfismos genéticos

Se cree que variaciones genéticas comunes pueden contribuir a la susceptibilidad a enfermedades, progresión de las mismas y variabilidad en la respuesta a tratamiento.

Existen pequeñas variaciones, en forma abundante, responsables de la mayoría de la diversidad de rasgos hereditarios en la población general. Estas variaciones conocidas como polimorfismos se presentan en más del 1% de la población e incluyen diferentes tipos: polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) llamados también SNV (variantes de nucleótido único), inserciones y deleciones (indels), variaciones en el número de copias y repeticiones cortas en tándem.

Los SNP constituyen la forma más abundante de variación genética, estimándose

aproximadamente entre 2.8 y 3.9 millones de las mismas por individuo (19).

Los polimorfismos indel incluyen sitios polimórficos de ganancia o pérdida de 1 o más nucleótidos (generalmente uno solo), y representan aproximadamente el 10% de la variación del ADN humano. Asimismo, se ha establecido su relación en 25% de las variantes asociadas a enfermedad en la base de datos de mutaciones genéticas humanas (20).

La capacidad de cierta variación genética de contribuir a la patogénesis de una enfermedad está determinada por su impacto funcional en la expresión genética o la función de la proteína. En forma general se han clasificado como patogénicas, probablemente patogénicas, de significado incierto, benignas y probablemente benignas (21).

Existen polimorfismos que modifican la actividad de proteínas, aumentándola o disminuyéndola, alterando su expresión y estabilidad, y por lo tanto modificando el equilibrio metabólico y homeostasis del organismo en sus diferentes sistemas.

Se ha estimado influencia hereditaria en 40-50% de los casos de enfermedad coronaria (22) y más de 40 locus asociados se han identificado como potenciales candidatos (23,24). Si bien hasta el momento se cuenta con scores que predicen el riesgo cardiovascular principalmente determinados por variables clínicas y bioquímicas, el avance científico exige involucrar la parte genética para mejorar las herramientas de predicción de riesgo e incluso proponer nuevos blancos terapéuticos.

Scores de riesgo genéticos basados en SNP asociados con enfermedad cardiovascular han demostrado asociación con futuros eventos cardiovasculares en estudios de casos y controles y prospectivos (25–29). Uno de los primeros en demostrarlo fue Ripatti *et al.* en un estudio de casos y controles, así como en una cohorte de 30 725 participantes en donde genotipificaron 13 SNP y encontraron que al utilizar este score es posible identificar 20% de individuos (con ancestría Europea) con un 70% de riesgo incrementado de presentar un primer evento cardiovascular (29).

Algunos sugieren que la adición de un mayor número de polimorfismos determina una mejor predicción de riesgo cardiovascular como lo reportado por Tada *et al.* en donde se observó que al agregar 23 SNP al GRS27 (genetic risk score 27 SNP) se encontró asociación con ECV con un HR 1.7 (1.48-1.94) y HR de 1.92 (1.67-2.2) para el GRS27 y GRS50 respectivamente. Así como al combinar este último score con factores de riesgo establecidos, la reclasificación de individuos con un score genético alto confirió un riesgo 2.3 veces mayor (1.85-3.12) comparado con quienes obtuvieron un score genético bajo (30).

Sin embargo, no todos los resultados son similares. En un estudio del consorcio UCLEB en población europea se calculó un score genético con 53 SNP relacionados a enfermedad cardiovascular evaluando su utilidad al agregar la información genética a la información fenotípica dada por un score de riesgo cardiovascular (QRISK-2). El score genético produjo un incremento mínimo en cuanto a utilidad poblacional comparado con la predicción de riesgo fenotípico dado por el QRISK-2. Al aplicar la información genética en quienes tienen riesgo calculado intermedio (10-20% por QRISK-2) algunos de estos individuos se reclasifican como de alto riesgo, implementando de esta manera intervenciones tempranas como uso de estatinas sugiriendo que el factor genético puede prevenir 1 evento cardiovascular adicional por cada 462 personas evaluadas (31).

En el estudio CoRDia se evaluaron 19 SNP en un grupo de pacientes con DM2 e individuos sanos en quienes el score genético no difirió en ambos grupos (32).

Al ser enfermedades multifactoriales, la interacción ambiente-genotipo puede determinar el desarrollo y progresión del estado patológico, a través de mecanismos dinámicos, reguladores, epigenéticos que confluyen en un fenotipo específico.

La consecuencia de estas interacciones a exposiciones ambientales a través del tiempo y espacio pueden condicionar un factor protector a un individuo con un genotipo de riesgo y viceversa (33).

Existen diversas variantes genéticas localizadas en los genes que codifican para las proteínas de la coagulación del sistema fibrinolítico, favoreciendo un desequilibrio en el sistema hemostático como son: la inserción/delección 4G/5G en

gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1, el polimorfismo G894T en el gen de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), C677T en el gen de la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y que han sido demostrados como factores de riesgo para nuestra población.

Entre los estudios realizados en el grupo de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA) se ha encontrado que la presencia del polimorfismo 4G/5G de PAI-1 presenta en la población mestizo-mexicana una frecuencia alélica 4G de aproximadamente 28-34%, dicho alelo es considerado como factor de riesgo independiente para infarto agudo de miocardio en jóvenes (OR 2.29 [1.12-4.68]) (34). Sin embargo, para el caso de C677T en el gen de MTHFR no pudo replicarse dicho resultado, en donde la frecuencia del alelo T se presentó entre 52 a 55% de casos y controles sin establecer asociación con IAM en menores de 45 años (35). Lo contrario pudo ser observado en un grupo de pacientes jóvenes con EVC isquémico en donde se evidenciaron 4 factores de riesgo independientes incluyendo el alelo T (OR 2.56 [1.54-4.24]), tabaquismo (OR 1.79 [1.06-3.01]), hipertensión (OR 2.53 [1.08-5.90]) e historia familiar de ECV (OR 1.82 [1.02-3.23]) (36).

En el caso de G894T (Glu987Asp) en el gen de eNOS la frecuencia del alelo T es variable, en el estudio realizado en 2010 se encontró su presencia en 13.8-25% asociándose positivamente al desarrollo de IAM en menores de 45 años (OR 2.13 [1.33-3.41]) así como en infarto cerebral en jóvenes mexicanos (OR 1.75 [1.0-2.14]) (37).

En cuanto al polimorfismo R353Q del factor VII de coagulación, la frecuencia del alelo Q se ha estimado entre 7-11% en nuestra población en donde no se ha logrado demostrar el efecto protector del alelo Q para infarto de miocardio (38).

Es esperado que cada población tenga una distribución diferente de frecuencias genotípicas e historias ambientales. Es por eso que la susceptibilidad genética individual a una enfermedad en una población particular depende del número de genes de segregación susceptibles, los alelos de cada gen y sus frecuencias relativas y la correlación entre los alelos de dichos genes y otros genes diferentes

(39).

A pesar de que se ha demostrado influencia genética en la DM2, no se han investigado las variantes genéticas del sistema fibrinolítico y de coagulación que pudieran ser factores relevantes que contribuyan en el desarrollo de aterotrombosis en este grupo especial de la población en nuestro país.

El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en Diabetes Mellitus

2.

El inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1 por sus siglas en inglés) de la familia de proteasas de serina es una glicoproteína compuesta por 379 aminoácidos (aa), con un peso molecular de 50kDa secretado principalmente por adipocitos, células endoteliales y hepatocitos, aunque también por plaquetas, placenta, células de músculo liso vascular y monocitos/macrófagos; constituye un regulador clave negativo de la fibrinólisis a través de su rol como inhibidor primario del activador del plasminógeno tisular (tPA). Se une al tPA de una y dos cadenas, pero no reacciona con el uPA (activador del plasminógeno urinario) de cadena sencilla. Circula en su forma activa formando un complejo con la glicoproteína vitronectina, la cual estabiliza su conformación activa e incrementa su vida media. Es almacenado únicamente por plaquetas. El PAI-1 se elimina de la circulación por las células hepáticas. Exhibe un ritmo circadiano por lo que la concentración plasmática es mayor en la mañana y más baja durante la tarde y noche (40).

Existen estudios en ratones y en humanos, que han reportado niveles elevados de PAI-1 en individuos con obesidad (41,42), resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y DM2 (43,44). Las concentraciones plasmáticas de PAI-1 se correlacionan también con niveles de triglicéridos plasmáticos e insulina (45,46). Otros estudios han indicado que el aumento en los niveles de PAI-1 se relaciona no sólo con la incidencia de DM2 (47,48), sino también con sus complicaciones, principalmente retinopatía diabética, nefropatía y enfermedad coronaria (49,50).

PAI-1 disminuye con la reducción de peso y con mejoría en la respuesta a la insulina (51). Además, se ha demostrado que medicamentos hipoglucemiantes como la metformina disminuyen también las cifras de PAI-1 en sujetos con DM2 y sujetos

El polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 y Diabetes Mellitus 2

En el humano el gen del *PAI-1* está localizado en el cromosoma 7 tiene 16kb de longitud y contiene 9 exones y 8 intrones. Se han descrito múltiples SNP en el gen del *PAI-1*, el más estudiado es el polimorfismo 4G/5G (rs1799889), caracterizado por la inserción/delección de un nucleótido de guanosina a - 675pb (pares de bases) del promotor del *PAI-1*, lo cual incrementa la concentración o su actividad en el plasma sin alterar la vida media de la proteína (54).

El incremento en la transcripción génica del *PAI-1* está asociado con 4 bases de guanina (el alelo 4 G), lo cual da como resultado la unión a una proteína del activador de transcripción del *PAI-1*, mientras que el de 5 bases de guanina (el alelo 5 G), se une a una proteína represora que disminuye la unión del activador. Los individuos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G genotipo) tienen concentraciones 25% más altas de PAI-1 que los sujetos que son homocigotos para el alelo 5G (5G/5G genotipo). Los estudios llevados a cabo in vitro, han permitido identificar diferencias en la capacidad de unión a este sitio de las proteínas reguladoras de la transcripción (55,56).

En el estudio realizado por Al-Hamodi et al (43) se determinó asociación entre los niveles antigénicos de PAI-1 y t-PA así como de su actividad en pacientes con DM2 y síndrome metabólico. Esto refleja un estado hipofibrinolítico, lo cual a su vez ha sido relacionado con eventos cardiovasculares (57,58).

Xu y cols corroboraron que el genotipo homocigoto 4G presenta niveles mayores de PAI-1 y que la ocurrencia de nefropatía diabética (ND) se asoció a la presencia del alelo 4G reportándose 35% de casos de ND en el genotipo 4G/4G, 30.2% en el 4G/5G y 21.4% en el 5G/5G (59).

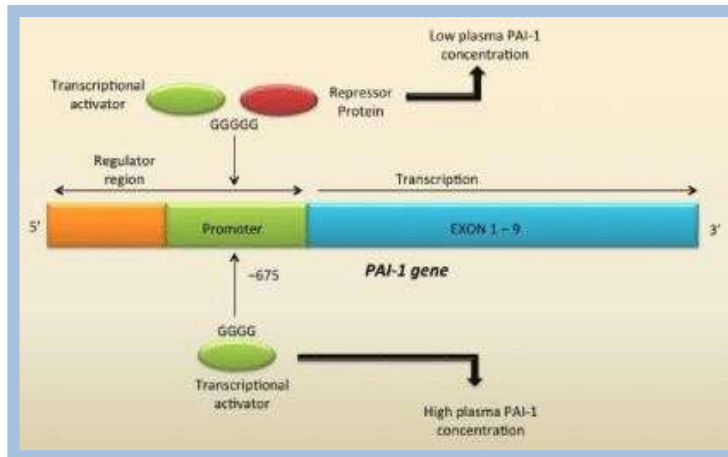


Figura 3. Polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1. Del Rosario M and Tsai H. *The Case of a Late Bleeder Plasminogen Activator Inhibitor 1 Deficiency. Ann Hematol Oncol.* 2015; 2(10): 1068

Además, se ha visto que el incremento en la concentración de PAI-1 es aún mayor en presencia de hipertrigliceridemia (60,61). También se ha demostrado que las proteínas de muy baja densidad (VLDL) inducen un aumento en los niveles de la transcripción del promotor del *PAI-1* a nivel de las células endoteliales, cuyo mecanismo se debe a la existencia de un elemento de respuesta de las VLDL denominado (VLDLRE), localizado en la región promotora del gen y su actividad se incrementa por la presencia del polimorfismo 4G/5G, debido a su localización en un sitio adyacente a la región corriente arriba del sitio de unión del factor de transcripción de inducción de las VLDL. Estos hallazgos dan una explicación molecular entre la asociación de las VLDL y el incremento en la actividad plasmática de PAI-1, así como para la interacción entre el polimorfismo 4G/5G y los niveles plasmáticos de triglicéridos (62).

Algunos medicamentos hipoglucemiantes producen una disminución variable en la expresión del *PAI-1* en las células adiposas, protegiéndolas de la resistencia a la insulina promoviendo la diferenciación del adipocito mediante un decremento en la expresión del receptor gamma peroxisomal activado (63,64).

Si bien la asociación del polimorfismo 4G/5G no es concluyente, se han encontrado estudios con la presencia del alelo 4G asociados a mayor riesgo cardiovascular

(60,65–69), algunos demuestran simplemente un discreto incremento en el riesgo de ECV como el metaanálisis de Nikolopoulos en donde se encontró un OR 1.088 para IAM (70). Mientras que en otros estudios no se ha encontrado diferencia (71–73). Existe un metaanálisis realizado por Xu *et al.* en 2013 en donde no pudo establecerse asociación entre la presencia del polimorfismo y la susceptibilidad a DM2 y sus complicaciones (74).

Una de las razones para esta discrepancia podría explicarse por las diferentes poblaciones estudiadas, es decir la influencia étnica y ambiental de diversos factores que al interaccionar determinan la expresión fenotípica (75). Un ejemplo de esto se encuentra en investigaciones realizadas en China en donde la asociación de tabaquismo y polimorfismo 4G/5G de *PAI-1* difiere en el riesgo de enfermedad coronaria (76).

Katakami *et al* sugieren que la presencia de un solo polimorfismo no determina mayor riesgo de trombosis principalmente en EVC isquémico, sin embargo, la suma de varios alelos incluyendo 4G/5G de *PAI-1* se relaciona con la ruptura de la placa ateromatosa y formación de trombo en pacientes con DM2. En dicho estudio se observó que quienes presentaban un solo alelo de riesgo tuvieron una prevalencia de EVC en 6.7%, en los portadores de 2-5 alelos el riesgo de EVC se elevaba (OR 1.61 [1.03-2.51]) y para quienes tenían 6 o más alelos el riesgo era aún mayor (2.72 [1.30-5.69]) (77).

Tabla 2. Estudios del polimorfismo 4G/5G del gen del PAI-1

Estudio	Población	Resultados
Al Hamodi (2011)	Malasia	DM2 ↑ niveles y actividad de PAI-1
Xu y cols (2016)	China	Nefropatía diabética 35% 4G/4G; 30.2% 4G/5G; 21.4% 5G/5G
Nikolopoulos (2014) Metaanálisis	EUA, Alemania, Finlandia, Japón, Sudáfrica, Suecia, Italia, Francia, Eslovenia, Turquía, España, China, Brasil, Pakistan, UK	4G OR 1.088 para IAM

Xu y cols (2013) Metaanálisis	China	Sin asociación
Katakami (2010)	Japón	Riesgo aditivo 4G/5G + otros polimorfismos ↑ EVC en DM2 (OR 2.72)

DM2, diabetes mellitus tipo 2; cols, colaboradores; OR, razón de momios; EVC, enfermedad vascular cerebral.

Disfunción endotelial en diabetes mellitus 2

El endotelio es considerado como el regulador más importante de la homeostasis manteniendo un balance entre vasodilatación y vasoconstricción, inhibición y estimulación del crecimiento y migración de las células musculares lisas y la trombogénesis y la fibrinólisis. Cuando este equilibrio se rompe, produce lo que se le denomina “disfunción endotelial”, causando daño de la pared endotelial (78).

La disfunción endotelial origina un desequilibrio en la producción endotelial de los factores que produce, como son: adhesión plaquetaria, agregación y trombogenicidad sanguínea, liberación de citocinas y factores de crecimiento iniciando una respuesta inflamatoria. Después de la primera respuesta inflamatoria, se ha postulado que el colesterol de las LDL es más activo produciéndose un incremento en la oxidación del mismo lo que da origen a la formación de la placa. Además, las células musculares lisas participan en el proceso mediante la migración dentro de la íntima, proliferando e incrementando la producción de las proteínas de la matriz extracelular. La suma de estos procesos da origen a la formación de la placa aterosclerótica (79). Algunos estudios han demostrado que existe una disminución de la función endotelial en los individuos con disminución en la tolerancia a la glucosa, diabetes o en sujetos con síndrome metabólico (80). Es por eso que otra de las vías implicadas en el desarrollo de aterosclerosis es la del estrés oxidativo, en donde la producción de óxido nítrico se ve afectada.

El polimorfismo G894T en el gen de la enzima sintetasa de óxido nítrico (eNOS), como posible factor de riesgo de disfunción endotelial en diabetes mellitus 2

El gen de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (*eNOS*) se localiza en el cromosoma 7 (7q35- q36) y consiste de 26 exones y 25 intrones. Codifica a la enzima que genera óxido nítrico en el endotelio vascular a partir de la conversión de L-arginina a L-citrulina. El óxido nítrico (ON) media vasodilatación en el endotelio, inhibe la adhesión de plaquetas y leucocitos y limita la oxidación de LDL aterogénicas en el endotelio. La alteración de la vasodilatación dependiente de endotelio es una característica común de vasos ateroscleróticos, lo cual puede deberse en parte a la disminución en la producción de eNOS. Dado su rol importante en la fisiología de la vasculatura, las variaciones genéticas pueden alterar la expresión y actividad de eNOS, contribuyendo al desarrollo de enfermedad cardiovascular (81).

Diversos estudios han demostrado que la presencia de un polimorfismo en el gen de la enzima endotelial óxido nítrico sintetasa producida por el cambio de una base de guanina por una de timina G894T, traduce una sustitución de un aminoácido de glutamina por un aminoácido de asparagina en la posición 298: Glu298Asp (rs1799983) en la molécula de dicha proteína. Esta sustitución promueve el rompimiento de la enzima en este sitio disminuyendo la función de eNOS (82).

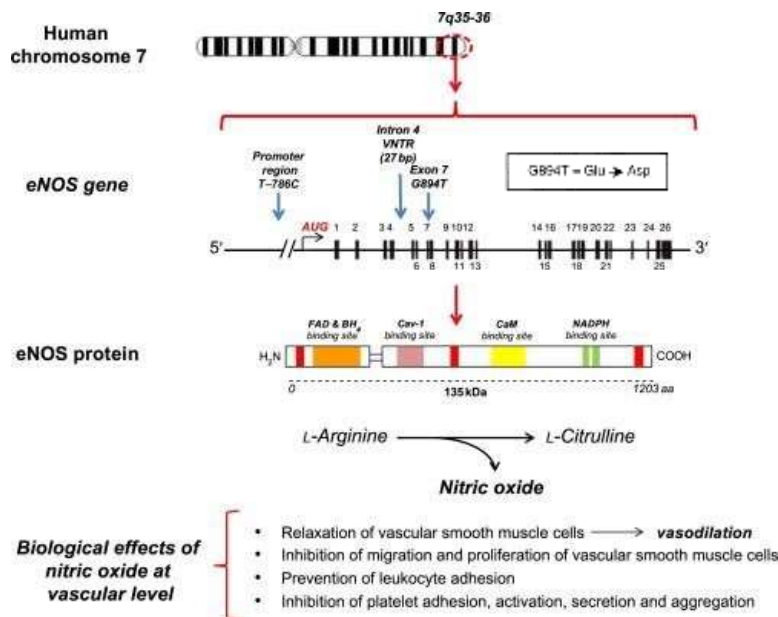


Figura 4. Polimorfismo G894T (Glu298Asp) en el gen de eNOS. (Cecilia Vecoli. *Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms in Cardiovascular Disease. Vitamins and Hormones, Vitam Horm.* 2014;96:387-406.

En el caso de DM2 y resistencia a la insulina, la actividad de eNOS se ve alterada, ya que la activación de eNOS mediada por insulina vía PI3K/Akt se encuentra inhibida (83). Además, en DM2 se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), resultando en menor generación de ON y disfunción vascular (84).

Recientemente se evidenció una interacción significativa entre 2 genotipos específicos de eNOS (G894T y T786C) y una molécula angiogénica: el factor de crecimiento vascular endotelial en pacientes con DM2. Estos hallazgos proveen más información acerca de los mecanismos que afectan la angiogénesis y la disfunción endotelial en DM2, indicando el rol importante de eNOS en este proceso (85).

El polimorfismo Glu298Asp (G894T) eNOS se ha propuesto por algunos como parte de los factores de susceptibilidad genética en la génesis de hiperinsulinemia,

resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus 2 (84,86). Asimismo, se ha visto implicado en el desarrollo de infarto de miocardio en Japoneses con DM2, encontrando una frecuencia mayor del alelo Asp (17%) comparado con controles (6%) (87). Dicho riesgo se ha visto incrementado al presentar una combinación de más variaciones alélicas de la misma vía involucrada, como en la cohorte diseñada por Katakami *et al.* en donde los portadores de 8 o más alelos de riesgo incluyendo Asp tuvieron un HR de 2.92 (IC 1.5-5.67) para enfermedad arterial coronaria (88). Gran parte de la literatura aporta resultados no concluyentes respecto a la participación de Glu298Asp (G894T) eNOS en el desarrollo de infarto de miocardio y enfermedad vascular cerebral, la mayoría de los estudios en población asiática (81).

Un metaanálisis reciente evaluó los tres principales polimorfismos de eNOS incluyendo G894T, encontrando asociación positiva (OR 1.58 [1.3-1.91]) entre la presencia de éste y el riesgo de EVC isquémico también en Asiáticos (89).

Otro metaanálisis realizado por Rai *et al* determinó también la asociación de 3 polimorfismos del gen eNOS en este caso con enfermedad coronaria. Incluyó estudios realizados en distintas poblaciones (Asia, India, Medio-Oriente, Europa, África) y encontró que el Glu298Asp demostró la asociación más fuerte (OR 1.28-1.52), seguido del T786C (1.34-1.42) y el 4b/a (OR 1.19- 1.41) (90).

De la misma forma Yao *et al* observaron en su metaanálisis que la presencia del alelo Asp confería mayor riesgo de EVC isquémico (OR 1.6 [1.38-1.79]) en la población asiática pero no en los caucásicos (91).

Szabó *et al.* evidenciaron, en un grupo que incluía pacientes con Diabetes Mellitus 2, dicho polimorfismo como un factor de riesgo mayor (4 veces más en homocigotos Asp) para enfermedad arterial carotídea e infarto de miocardio, y de la misma forma el C677T MTHFR se asoció también a infarto miocárdico (genotipo TT 17% vs 11% en controles) (92).

En Suecia, Odeberg *et al* demostraron la presencia del polimorfismo G894T eNOS como un factor independiente para infarto de miocardio en pacientes con DM2 (OR 3.12 [1.49- 6.56]), especialmente en mujeres, esto probablemente por la interacción

hormonal y el estímulo derivado de la producción de ON (93).

La asociación se ha intentado establecer incluso con complicaciones microvasculares como nefropatía y retinopatía (94–96).

Tabla 2. Estudios del polimorfismo G894T del gen de eNOS

Estudio	Población	Resultados
Tamemoto (2008)	Japón	Alelo Asp 6% vs 17% IAM
Katakami (2014)	Japón	Enfermedad coronaria >8 alelos OR 2.92
Kumar (2017)	Asia	EVC isquémico OR 1.58
Rai (2014)	Australia, Turquía, España, Alemania, UK, Irlanda, Italia, Austria, EUA, Brasil, Chile...	Enfermedad coronaria en distintas poblaciones OR 1.28- 1.52
Odeberg (2008)	Suecia	IAM en mujeres OR 3.12

eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; IAM, infarto agudo de miocardio; OR, razón de momios

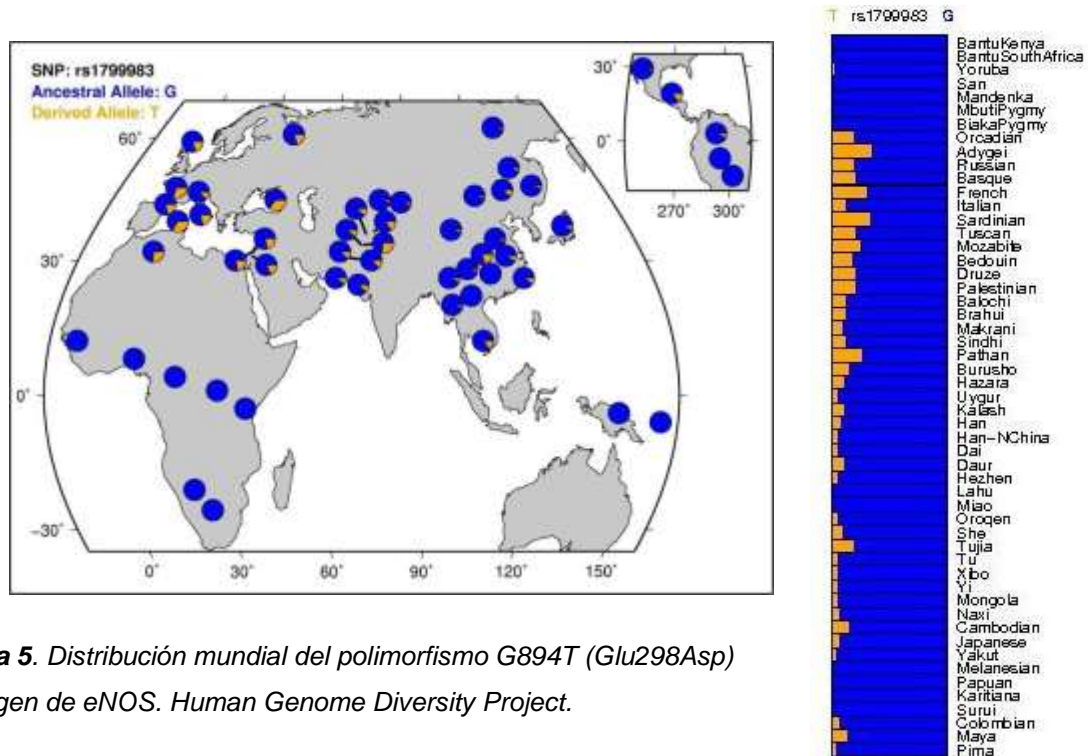


Figura 5. Distribución mundial del polimorfismo G894T (Glu298Asp) en el gen de eNOS. Human Genome Diversity Project.

El polimorfismo en el gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofoloreductasa (MTHFR)

La homocisteína es un aminoácido (AA) con contenido de azufre producido por la desmetilación del AA esencial metionina, y la metilentetrahidrofoloreductasa (MTHFR) un determinante principal de los niveles séricos de homocisteína.

La enzima metilentetrahidrofolato reductasa cataliza en forma irreversible la conversión de 5,10 metiltetrahidrofolato a 5- metiltetrahidrofolato, el cual sirve como donador de un grupo metilo en la reacción para la conversión de cisteína a metionina (97). El gen de la MTHFR se encuentra en el cromosoma 1p36.3. La mutación en la enzima responsable en el metabolismo de la homocisteína particularmente la 5, 10 metiltetrahidrofoloreductasa (MTHFR) produce una forma severa de hiperhomocisteinemia (HHcy). Es producida por una mutación puntual (C677T) (rs1801133) en la región que codifica para el sitio de unión de la MTHFR, permitiendo una sustitución del AA alanina por uno de valina.

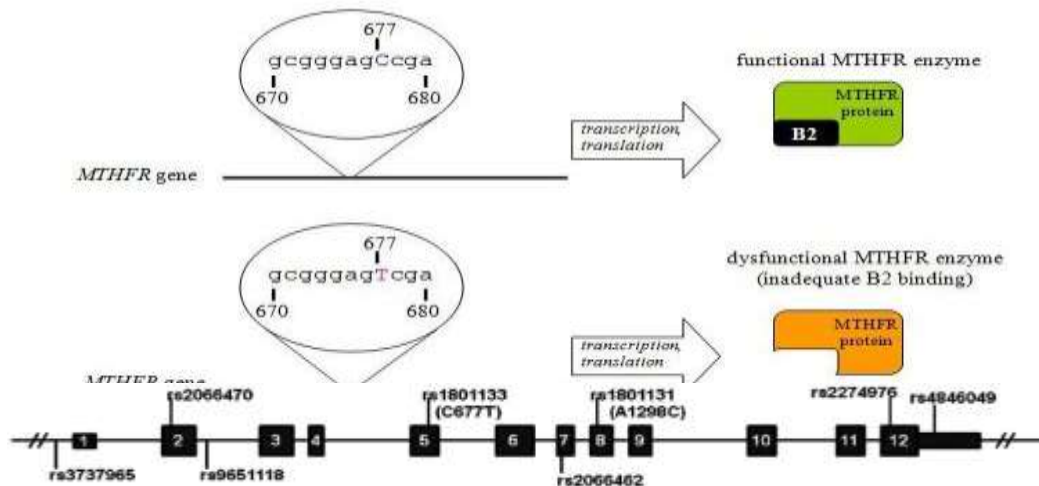


Figura 6. Polimorfismo C677T en el gen de MTHFR. (Spellicy CJ, Northrup H, Fletcher JM, Cirino PT, Dennis M, et al. (2012) Folate metabolism gene 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in myelomeningocele patients. PLoS One 7 (12) e51330)

Se ha demostrado que los portadores homocigotos para la variación genética TT

están asociados con niveles incrementados de homocisteína debido a la generación de una enzima termolábil con actividad reducida (aproximadamente 30%), los heterocigotos presentan un 65% de actividad de la enzima. Se ha propuesto que la hiperhomocisteinemia induce estrés oxidativo de las células endoteliales, vasoconstricción arteriolar, disfunción renal y aumento en la reabsorción tubular de sodio. Por lo que se ha identificado al genotipo TT como un factor de riesgo para enfermedad cardiovascular (98).

Algunos estudios sugieren que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para enfermedades cardiovasculares (99,100), y que se relaciona con complicaciones de DM2 (101). Araki *et al.* encontraron niveles más elevados de homocisteína en pacientes con DM2 y macroangiopatía comparados con aquellos que no presentaban esta última (10.8+/- 3.8 nmol/ml vs 8.3 +/- 3.1nmol/ml) (102).

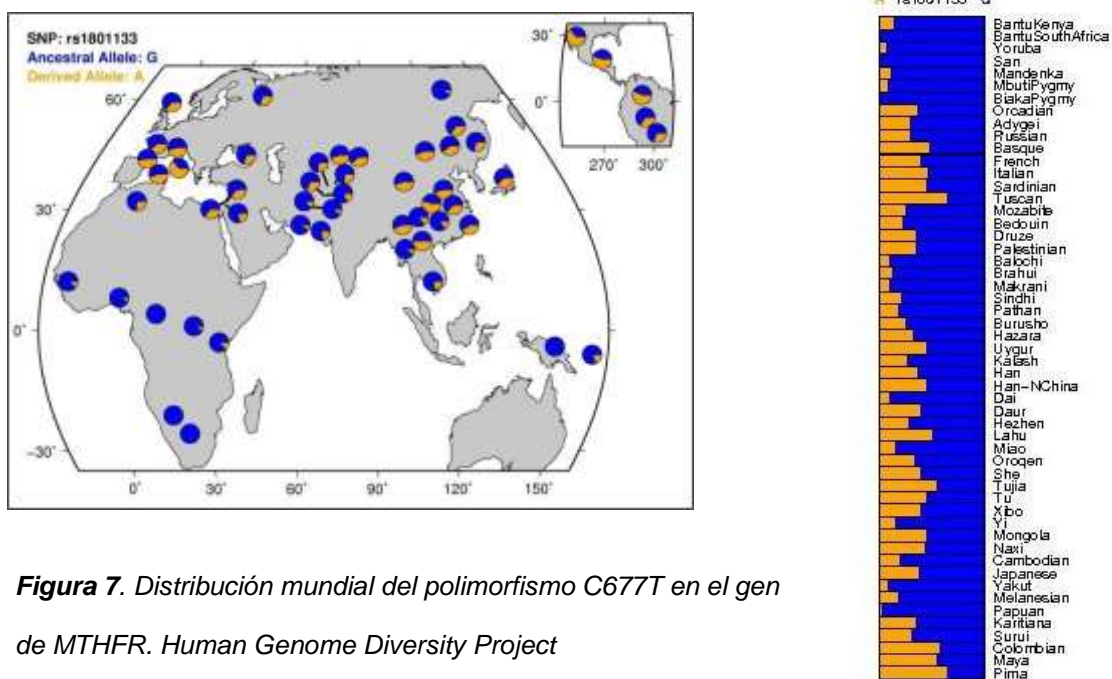


Figura 7. Distribución mundial del polimorfismo C677T en el gen de MTHFR. Human Genome Diversity Project

El polimorfismo C677T de la *MTHFR* puede condicionar la presentación de enfermedades cardiovasculares en pacientes con DM2 (103,104), un metaanálisis realizado en China por Zhang ha determinado la positividad de la asociación en dicha población (OR 1.71 [1.47- 1.99] con base en la frecuencia alélica para macroangiopatía y OR 1.85 [1.63-2.1] para microangiopatía) (105).

En el grupo estudiado por Sun, la frecuencia alélica 677T prevaleció no sólo en el grupo de pacientes con DM2, sino que además en el subgrupo de diabéticos con macroangiopatía la asociación fue mayor (OR 1.94 [1.31-2.89]) (106). Más tarde el mismo Sun identificó el C677T *MTHFR* como un marcador predictivo en pacientes con Diabetes Mellitus 2 para presentar infarto cerebral isquémico. (OR 4.04 [1.95-8.34]) (104); con resultados similares a los obtenidos por Hermans en 2006 (107).

En aborígenes canadienses el mismo alelo estableció un riesgo mayor para enfermedad arterial periférica en pacientes con DM2 (OR 3.54 [1.01-12.4]) (103).

En el estudio de Zhao *et al.* se encontró que en pacientes de China hipertensos, el efecto de la homocisteína en el primer EVC se modificó notablemente por la presencia de C677T *MTHFR* y la suplementación de ácido fólico reduciendo el riesgo de EVC en los portadores del alelo C de un HR de 3.1 (IC 1.1-9.2) a 0.73 (IC 0.55-0.97) con el uso de folatos, lo cual ayuda a predecir el riesgo de EVC y determina la necesidad de llevar a cabo intervenciones con ácido fólico con base en el panorama genético y estado nutricional de cada individuo (108).

Sin embargo, existen también múltiples estudios en donde no ha podido encontrarse asociación entre el polimorfismo y la presencia de enfermedad cardiovascular (109–113).

Bentley *et al* llevaron a cabo un metaanálisis donde compararon variantes genéticas relacionadas con enfermedad vascular cerebral y coronaria, evidenciando asociaciones positivas para ambas en el caso de Factor V de Leiden, enzima convertidora de angiotensina *ECA I/D*, *MTHFR* C677T y protrombina G20210A. Sin embargo, *PAI-1* 4G/5G sólo pudo relacionarse con enfermedad coronaria. Asimismo, se correlacionaron los desenlaces clínicos con los niveles bioquímicos de las sustancias intermedias, observando asociación positiva para *MTHFR* C677T más no en el caso de *PAI-1* el cual sólo se encontró elevado en los casos de infarto

de miocardio. En el caso de los polimorfismos de Factor VII y eNOS la asociación no se consideró consistente debido a tamaños de muestra más pequeños (114).

JUSTIFICACIÓN

Consideramos relevante identificar de forma inicial la diferencia en la presentación de variantes genéticas del sistema fibrinolítico y función endotelial en pacientes con DM2 con antecedente de enfermedad cardiovascular sintomática (clínicamente manifiesta) y sin dicho antecedente como parte de la evaluación de la fisiopatología de la enfermedad y sus complicaciones.

Esto nos permitirá reconocer principalmente individuos con mayor riesgo cardiovascular al conjuntar algunos de los factores genéticos, clínicos y bioquímicos para poder realizar una mejor estimación del riesgo de complicaciones en nuestra población y de esta forma implementar intervenciones tempranas más estrictas que puedan incidir en el manejo principalmente preventivo.

Al realizar este estudio esperamos ampliar el conocimiento actual respecto a factores involucrados en el desarrollo de complicaciones macrovasculares en los pacientes con DM2 así como a determinar la necesidad de contar con tratamientos individualizados no sólo en cuanto a control glucémico sino también respecto al perfil trombotico de cada paciente el cual no es comúnmente evaluado en la práctica clínica diaria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Diabetes Mellitus 2 se caracteriza por ser una enfermedad multifactorial, en la que interviene la interacción de factores genéticos y ambientales no sólo en su desarrollo y progresión sino también en la aparición de las complicaciones asociadas.

Su importancia radica en el incremento gradual de su prevalencia, mortalidad y costos generados por su atención, incluyendo el de sus complicaciones. Algunas

de las más importantes giran en torno a la enfermedad cardiovascular cuya etiopatogenia involucra diversas vías fisiopatológicas entre las cuales se han descrito la disfunción endotelial y alteraciones del sistema de coagulación favoreciendo el desarrollo de un estado protrombótico. Este último ocasionado en parte por la hipofibrinólisis secundaria al aumento en los niveles de PAI-1, así como de factores de coagulación, hiperhomocisteinemia y el desbalance en la generación de óxido nítrico como factores contribuyentes al desarrollo de disfunción endotelial. Se han descrito variantes genéticas que codifican para estas proteínas involucradas (PAI-1, homocisteína, óxido nítrico) y que pueden alterar su expresión tanto en sus niveles y/o actividad por lo que pueden ser considerados factores de riesgo en el desarrollo de las complicaciones previamente comentadas.

En la literatura existen estudios con resultados no concluyentes e incluso contradictorios llevados a cabo en diversas poblaciones y grupos étnicos.

En nuestra población no han sido estudiadas dichas alteraciones genéticas específicamente en DM2 por lo que consideramos relevante determinar su influencia en el origen y desarrollo de la enfermedad aterotrombótica.

Por esta razón nos planteamos la siguiente pregunta:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de los alelos de riesgo del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (*PAI-1*) (rs1799889), de Glu298Asp (G894T) en el gen de la enzima sintetasa del óxido nítrico (*eNOS*) (rs1799983) y de C677T en el gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato reductasa (rs1801133) en pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus 2 con y sin complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (enfermedad vascular cerebral y/o enfermedad arterial coronaria)?

HIPÓTESIS

En pacientes mestizo-mexicanos con DM2 y complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (enfermedad vascular cerebral y/o enfermedad arterial coronaria), los alelos de riesgo de los polimorfismos 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo- 1 (*PAI- 1*) (rs1799889), del G894T en la enzima sintetasa del óxido nítrico (*eNOS*) (rs1799983) y el C677T en la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato reductasa (rs1801133) son más frecuentes que en pacientes con DM2 sin enfermedad cardiovascular sintomática (alelo 4G 57% vs 43%; alelo T 80% vs 67%; alelo Asp 47% vs 28%).

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la frecuencia de los alelos de riesgo del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (*PAI-1*) (rs1799889), de Glu298Asp (G894T) en el gen de la enzima sintetasa del óxido nítrico (*eNOS*) (rs1799983) y de C677T en el gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato reductasa (rs1801133) en pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus 2 con y sin complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (enfermedad vascular cerebral y/o enfermedad arterial coronaria).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la frecuencia de los diferentes genotipos del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo-1 (*PAI-1*) (rs1799889), de Glu298Asp (G894T) en el gen de la enzima sintetasa del óxido nítrico (*eNOS*) (rs1799983) y de C677T en el gen de la enzima 5,10 Metilentetrahidrofolato reductasa (rs1801133) en pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus 2 con y sin complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (enfermedad vascular cerebral y/o enfermedad arterial coronaria).
- Identificar la relación entre los polimorfismos de interés y el desarrollo de enfermedad cardiovascular en pacientes mestizo-mexicanos con DM2.
- Evaluar la potencial interacción de los polimorfismos de interés y el desarrollo

- de enfermedad cardiovascular en pacientes mestizo-mexicanos con DM2.
- Identificar los factores clínicos relacionados con el desarrollo de enfermedad cardiovascular en pacientes mestizo-mexicanos con DM2.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio: Transversal, comparativo.

Por el control de la maniobra: Observacional

Por la recolección de la información: Retrolectivo

Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal

Por el tipo de muestreo: No probabilístico de casos consecutivos

Por el número de grupos: Comparativo

Dirección: transversal

Por la búsqueda de inferencias: Analítico

Por el espectro de la enfermedad en la población: Heterodémico (contempla todo el espectro de la enfermedad).

Universo de trabajo

Población diana: Pacientes mestizo-mexicanos con Diabetes Mellitus 2 con y sin complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas.

Población accesible: Pacientes mestizo-mexicanos con DM2 atendidos en la consulta externa de Medicina Interna y Cardiología del HGR 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro.

Muestra: Pacientes mestizo-mexicanos con diagnóstico de DM2 preexistente con y sin complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas en tratamiento farmacológico.

Tipo de muestreo: No probabilístico de casos consecutivos. Se incluyeron todos los pacientes con DM2 que se captaron consecutivamente de la población accesible.

Período de reclutamiento: De mayo 2017 a agosto 2018.

Lugar donde se desarrolló el estudio: La investigación se realizó en la Consulta externa de Medicina Interna y Cardiología, así como en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del HGR 1 Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Criterios de selección

Inclusión

- Pacientes de cualquier género.
- Mayores de 18 años.
- Con diagnóstico de Diabetes Mellitus 2.
- Ancestría mexicana de al menos 2 generaciones.

Se asignaron a 2 grupos con base en la ausencia (grupo 1) o presencia (grupo 2) de diagnóstico de complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas.

Exclusión

- Quienes decidan no ingresar al estudio
- Embarazo
- Neoplasias
- Trastornos hematológicos
- Insuficiencia hepática crónica o aguda
- Arritmias cardíacas
- Enfermedad renal crónica en etapa 4 o 5 KDIGO
- Infarto de miocardio o isquemia silente para el grupo 1.

Eliminación

- Quienes retiren consentimiento informado
- Pacientes que no cuenten con datos clínicos y/o resultados genéticos completos.

VARIABLES DE ESTUDIO

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	UNIDADES DE MEDICION
DE RESULTADO					
COMPLICACIONES MACROVASCULARES CLINICAMENTE MANIFIESTAS	<p>Según la OMS la enfermedad cardiovascular incluye un grupo de trastornos/enfermedades del corazón y vasos sanguíneos. Los tipos de enfermedad cardiovascular engloban enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular cerebral (EVC), cardiopatía reumática, tromboembolismo venoso, y cardiopatías congénitas.¹¹⁶</p> <p>Enfermedad arterial coronaria: patología causada por aterosclerosis en arterias coronarias que lleva a la restricción del flujo sanguíneo al tejido miocárdico. Dependiendo de la obstrucción luminal y características de la placa, los pacientes pueden presentar angina estable o síndrome coronario agudo (angina inestable, IAM CEST, IAM SEST).¹¹⁷</p> <p>Enfermedad vascular cerebral: Las 2 principales categorías incluyen hemorragia e isquemia, ésta última secundaria a la disminución en el aporte sanguíneo de oxígeno y nutrientes al tejido cerebral. La EVC isquémica se subclasifica según su etiología en trombosis, embolismo e hipoperfusión sistémica. La isquemia cerebral transitoria (AIT) se define clínicamente por la temporalidad de los síntomas neurológicos los cuales duran menos de 24 horas.^{118, 119}</p>	<p>Antecedente documentado en el expediente clínico de:</p> <p>- Diagnóstico de enfermedad arterial coronaria clínicamente sintomática (incluyendo infarto de miocardio con o sin elevación del ST, angina estable o inestable, cirugía de revascularización miocárdica) y que cuente con pruebas inductoras de isquemia positivas (SPECT, prueba de esfuerzo, ecoestrés dobutamina) y/o coronariografía con evidencia de obstrucción.</p> <p>- Enfermedad vascular cerebral clínicamente manifiesta (infarto cerebral, isquemia cerebral transitoria) con estudio de neuroimagen que evidencie la lesión estructural.</p>	No dimensional, categórica	Nominal, dicotómica	Sí/No; Enfermedad arterial coronaria y/o EVC.
VARIABLE DESCRIPTIVA					
DIABETES MELLITUS 2	<p>Elevación de la glucosa sérica igual o mayor de 126 mg/dL en ayuno de al menos 8 horas, o bien 200 mg/dL o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas,⁴ o Hemoglobina glucosilada $\geq 6.5\%$.</p>	<p>Es la presencia del diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de glicemia igual o mayor de 126 mg/dL en ayuno de al menos 8 horas, o bien 200 mg/dL o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas, Hemoglobina glucosilada $\geq 6.5\%$, o bien cifras normales de glucemia bajo tratamiento hipoglucemiante.</p>	No dimensional, categórica	Nominal, dicotómica	Sí/No

VARIABLE DE EXPOSICIÓN					
PRESENCIA DEL POLIMORFISMO 4G/5G EN EL GEN DEL INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1 (PAI-1) (rs1799889)	Variación en la secuencia de ADN en el gen del PAI-1, el cual consiste en una inserción/delección de un nucleótido de Guanina en la posición -675 antes del promotor. ¹²⁰	Es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por una inserción/delección de un nucleótido de Guanina en la posición -675 antes del promotor identificado por PCR-RFLP.	No dimensional, categórica	Nominal	4G/4G, 4G/5G, 5G/5G
PRESENCIA DEL POLIMORFISMO C677T EN EL GEN DE LA ENZIMA 5,10 MTHFR (rs1801133)	Variación en la secuencia de ADN en el gen de la enzima 5,10 MTHFR el cual consiste en el cambio de una base de Citosina por una Timina en el nucleótido 677. ¹²¹	Es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por la sustitución de una base de Citosina por una de Timina en la posición 677 identificado por PCR-RFLP.	No dimensional, categórica	Nominal	C/C, C/T, T/T
PRESENCIA DEL POLIMORFISMO GLU298ASP EN EL GEN DE LA ENZIMA SINTASA DE ÓXIDO NÍTRICO DEL ENDOTELIO (ENOS) (rs1799983)	Variación en la secuencia de ADN en el gen de la enzima eNOS, la cual consiste en el cambio del aminoácido Ac. Glutámico por Asparagina en la posición 298. ¹²²	Es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por la sustitución de un aminoácido de Ac. Glutámico por uno de Asparagina en la posición 298 identificado por PCR-RFLP.	No dimensional, categórica	Nominal	T/T (Asp/Asp), G/T (Glu/Asp), G/G (Glu/Glu)
COVARIABLES					
HIPERTENSION ARTERIAL SISTEMICA	Elevación de la tensión arterial sistólica \geq de 140 mmHg o de la tensión arterial diastólica \geq 90 mmHg en al menos 2 mediciones, o bien cifras de tensión arterial normal bajo tratamiento antihipertensivo. ¹²³	Presencia de diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de tensión sistólica igual o mayor a 140 mmHg o diastólica igual o mayor a 90 mmHg en mediciones repetidas o bien cifras de tensión arterial normales pero bajo tratamiento antihipertensivo.	No dimensional, categórica	Nominal	Sí/No
OBESIDAD	Peso corporal secundario al acúmulo de tejido adiposo que confiere un índice de masa corporal \geq 30kg/m ² superficie corporal. ¹²⁴	medición de índice de masa corporal \geq a 30kg/m ²	No dimensional, categórica	Nominal, dicotómica	Sí/No

TABAQUISMO	Consumo de cigarrillos de tabaco en cualquier época de la vida. ¹²⁵	Fumador actual: persona que haya fumado por lo menos 100 cigarrillos de tabaco durante toda su vida y que en la actualidad fuma (incluye al fumador diario y ocasional) Exfumador: quien declare haber fumado por lo menos 100 cigarrillos durante toda su vida y que en el presente no fume. No fumador: quien declare haber fumado menos de 100 cigarrillos en su vida o que nunca haya fumado.	No dimensional, categórica	Nominal	Sí: Fumador actual y/o Exfumador No: No fumador
DISLIPIDEMIA	Condiciones patológicas caracterizadas por una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre. ¹²⁶	Colesterol total igual ó mayor a 200 mg/dl, triglicéridos igual ó mayores a 150 mg/dl, LDL \geq 100mg/dL, HDL \leq 40mg/dL. ¹²⁶	No dimensional, categórica	Nominal	Sí, No
VARIABLES MODIFICADORAS DE EFECTO					
EDAD	Medida del tiempo transcurrido desde el nacimiento de una persona.	Años reportados por el paciente al momento de la entrevista inicial.	Dimensional	Continua	Años
SEXO	Características físicas, biológicas, anatómicas y fisiológicas de los seres humanos, que los definen como hombre y mujer.	El fenotipo identificado al momento de la entrevista.	No dimensional, categórica	Nominal, dicotómica	Femenino/ Masculino
HISTORIA FAMILIAR DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	Presencia en los familiares de primer grado del diagnóstico de cualquiera de las siguientes: enfermedad coronaria, enfermedad vascular cerebral, enfermedad arterial periférica.	Antecedente de cualquiera de los diagnósticos previos referidos por el paciente.	No dimensional, categórica	Nominal	Sí/No
CONTROL DE DIABETES MELLITUS	Cumplimiento de las metas terapéuticas de acuerdo a los estándares de la ADA (2017): glucemia preprandial 80-130mg/dL; glucemia postprandial <180mg/dL; HbA1c <7% ⁴	DM2 controlada: Niveles de HbA1c menores de 7%; DM2 descontrolada: HbA1c >7%	No dimensional	Nominal, dicotómica	Controlada/ Descontrolada
TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE DM2	Período de tiempo transcurrido desde el diagnóstico de DM2 hasta la actualidad.	Tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico de DM2 hasta la fecha de la inclusión al protocolo de estudio	Dimensional	Continua	Años
OTRAS VARIABLES					
PRESIÓN ARTERIAL	Fuerza que ejerce la sangre sobre la pared de las arterias.	Promedio de la 2ª y 3ª toma de presión arterial con baumanómetro electrónico Omron certificado.	Dimensional	Continua	Mm/Hg
ÍNDICE DE MASA CORPORAL	Razón matemática que asocia la masa y talla de un individuo conocido también como índice de Quetelet. Calculado como la	Se medirá y pesará al paciente con una báscula electrónica calibrada y se realizará el cálculo de Kg/m ²	Dimensional	Continua	Kg/m ²

	división del peso en kilogramos entre la talla medida en metros al cuadrado. (kg/m ²).				
GLUCOSA CENTRAL EN AYUNO	Concentración de glucosa en ayuno en sangre periférica en mg/dL	Valores séricos de glucosa en mg/dL en sangre periférica en el último mes	Dimensional	Continua	mg/dL
HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HBA1C)	Heteroproteína de la sangre que resulta de la unión de la hemoglobina (Hb) con glúcidos unidos a cadenas carbonadas con funciones ácidas en el carbono 3 y el 4.	Niveles de HbA1c reportados por el laboratorio en el último mes.	Dimensional	Continua	%
COLESTEROL TOTAL	Esterol (lípidos) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Esencial en las membranas celulares. Hormonas y ácidos biliares.	Valores séricos de colesterol total de sangre periférica en el último mes.	Dimensional	Continua	mg/dL
TRIGLICÉRIDOS	Principal forma de almacenamiento de energía en las células. Son lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos	Valores séricos de triglicéridos en sangre periférica en el último mes.	Dimensional	Continua	mg/dL

Cálculo del tamaño de muestra

Para las variantes alélicas de los diferentes polimorfismos: se consideró para el alelo 4G (115) del gen del *PAI-1* en pacientes con DM2 y EAC (72.4% vs 57.8% en controles); del alelo T(106) en pacientes con DM2 y macroangiopatía vs sin complicaciones (44.6 vs 29.3%); del alelo T en pacientes con DM2 y EAC vs pacientes con DM2 sin EAC (87) (17 vs 6%) el tamaño de la muestra se calcula con base en **diferencia de proporciones** para el alelo 4G: 165 individuos para cada grupo, para el alelo T: 147 de cada grupo y para el alelo T: 165 de cada grupo. Por lo tanto se calcula un mínimo de 165 individuos para cada grupo con un nivel de error alfa de 5%, intervalo de confianza de 95% y poder estadístico de 80% (1-β).

$$n = \left[\frac{Z\alpha\sqrt{2\pi_1(1-\pi_1)} - Z\beta\sqrt{\pi_1(1-\pi_1) + \pi_2(1-\pi_2)}}{\pi_1 - \pi_2} \right]^2$$

$$Z_{\alpha} = (\alpha = 0.05) 1.96$$

$$Z_{\beta} = (\beta = 0.20) -0.84$$

π_1 = proporción de grupo 1 π_2 = proporción de grupo 2

$\pi_1 - \pi_2$ = diferencia entre proporción de grupo 1 y 2

En el caso de *PAI-1*:
$$\left(\frac{1.96\sqrt{2(0.72)(0.28)} - (-0.84)\sqrt{(0.72)(0.28) + (0.58)(0.42)}}{0.72 - 0.58} \right)^2$$

n = 165

En el caso de C677T de *MTHFR*: n = 147

$$\left(\frac{1.96\sqrt{2(0.45)(0.55)} - (-0.84)\sqrt{(0.45)(0.55) + (0.29)(0.71)}}{0.45 - 0.29} \right)^2$$

En el caso de Glu298Asp de *eNOS*: n = 165

$$\left(\frac{1.96\sqrt{2(0.17)(0.83)} - (-0.84)\sqrt{(0.17)(0.83) + (0.06)(0.94)}}{0.17 - 0.06} \right)^2$$

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se incluyeron pacientes que acudieron de forma consecutiva a la Consulta Externa de Medicina Interna/Cardiología con diagnóstico de DM2. Se les invitó a participar en el estudio informándoles acerca de los beneficios y el riesgo mínimo del estudio, así como de la logística del protocolo. Se les comentó que independientemente de su decisión, su tratamiento y atención no se verían afectados.

Previa firma del consentimiento informado se llevó a cabo el llenado de la hoja de recolección de datos por la Dra. Megan Carolina Cerda Mancillas, quien se encargó de recabar los datos clínicos y antropométricos así como de registrar los resultados de laboratorio general. En caso de no contar con resultados de laboratorio recientes (vigencia de 1 mes) se actualizaron el día de la toma de la muestra.

Posteriormente se agendó cita en la Unidad de Investigación Médica de Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis para realizar la toma de muestra de sangre periférica la cual se llevó a cabo en ayuno de 12 horas por parte del personal de químicos que labora en dicha unidad.

Se extrajeron aproximadamente 16ml de sangre total de la vena antecubital, los cuales se colectaron en 2 tubos con EDTA, 2 con citrato de sodio y 2 con gel separador o sin anticoagulante. De forma inmediata se centrifugaron las muestras a 2500 g (fuerza centrífuga relativa) durante 15 minutos. Posteriormente, la capa superior (plasma) se retiró cuidadosamente tratando de no perturbar la siguiente capa, en donde se localiza el contenido de células mononucleares (buffy coat), la cual se transfirió con una pipeta de transferencia de plástico estéril a un tubo eppendorf de 1.5mL libre de enzimas (RNasas y DNasas). Finalmente, el contenido eritrocitario se desechó en un contenedor destinado para material infectocontagioso (residuos peligrosos). Se asignó un folio alfanumérico para la identificación de las muestras.

Para la extracción de DNA se utilizó un kit comercial de la marca Qiagen (QIamp DNAMini Kit, Hilden Alemania) de acuerdo a las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el DNA se procedió a su conservación en un

ultracongelador a -70°C hasta su utilización para la amplificación de los segmentos correspondientes.

Mediante espectrofotometría se determinó la pureza del DNA considerando la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Se consideró un valor de pureza aceptable la relación de al menos $260/280 > 1.6$ y $A_{260}/230 < 1.5$. La integridad del DNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%.

Para la determinación de los diferentes genotipos de los polimorfismos de interés se utilizó la técnica PCR-RFLP (ver descripción en manual de procedimientos).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se muestran mediante estadística descriptiva con frecuencias, medidas de tendencia central y dispersión para las variables numéricas. Se determinó la forma de distribución de las variables cuantitativas mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las variables categóricas se analizaron con la prueba de chi cuadrada. La comparación de las variables continuas entre los pacientes con y sin complicaciones macrovasculares se hizo con U de Mann Whitney de acuerdo a su distribución. Para estimar la asociación se determinó la prevalencia de la razón de momios (PRM) entre los genotipos y alelos de riesgo de los polimorfismos de interés con la presencia o ausencia de complicaciones macrovasculares, dicha medida de asociación se muestra como OR.

Para determinar la independencia de las variantes genéticas en la ocurrencia de enfermedad cardiovascular se realizó un ajuste por medio de un análisis de regresión logística con las covariables y aquellas que mostraron diferencias en el análisis bivariado. Se consideró significancia estadística $p < 0.05$. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico IBM SPSS versión 22.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio cumple con los aspectos éticos de investigación en seres humanos de acuerdo a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los Principios Éticos para la Investigación Médica adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki Finlandia 1964, modificada en Tokio, Japón 1975 y revisada en Fortaleza, Brasil 2013.

Esta investigación se considera de riesgo mínimo de acuerdo a la Ley General de Salud contenida en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Investigación para la salud en seres humanos, título segundo, capítulo I, artículo 17, publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de enero de 1987.

Los datos personales y los resultados de los participantes son estrictamente confidenciales. Únicamente están accesibles al investigador principal y colaboradores. No se hará divulgación de los mismos o intercambio de datos.

Se les hizo invitación a participar en el protocolo a cada uno de los sujetos que fueron integrados al mismo. Se les explicó en forma detallada en qué consistía el procedimiento y que no afectaría o modificaría su tratamiento en caso de no aceptar su inclusión. Se les dio a leer y firmar carta de consentimiento informado previa aceptación a su inclusión en el protocolo a cada uno de los participantes, así como se les proporcionó una copia del mismo.

Por el momento los participantes no obtuvieron un beneficio directo de la realización del estudio, los beneficios tienen un carácter estrictamente científico.

RESULTADOS

Del total de 405 pacientes con DM2 reclutados se excluyeron 44 por la presencia de isquemia silente en estudios paraclínicos, enfermedad renal crónica en etapa 4-5 de KDIGO, cáncer y trombofilia. Una vez incluidos 361 sujetos, 27 de ellos fueron eliminados por no contar con datos clínicos y/o genéticos completos. Por lo tanto, la muestra total consistió en 334 pacientes, de los cuales el 50% se distribuyó en cada uno de los grupos. En todos los casos los pacientes contaban con diagnóstico previo de DM2 y se encontraban bajo tratamiento farmacológico para dicha patología.

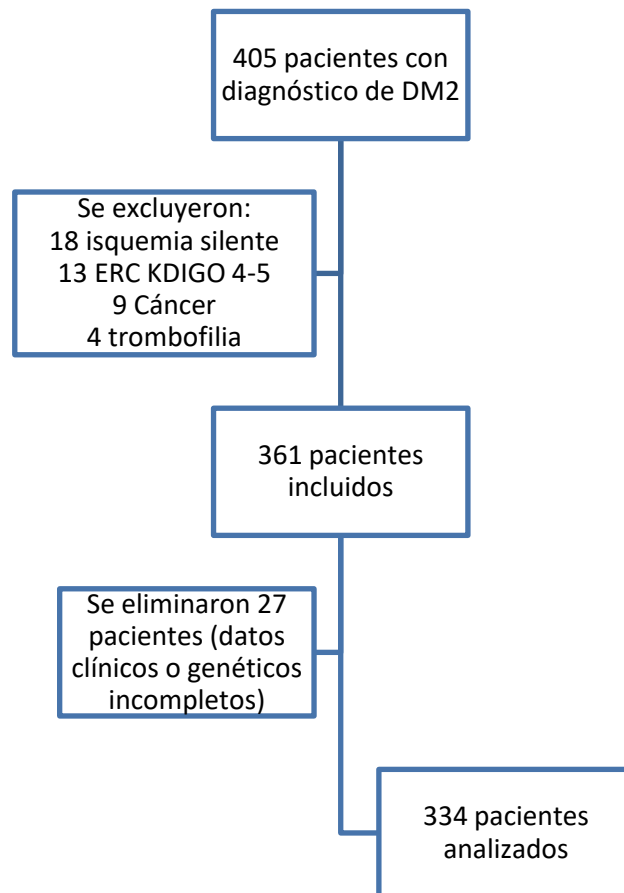


Figura 8. Flujograma para la selección de pacientes.

La comparación de las características clínicas y bioquímicas entre los grupos de pacientes que desarrollaron complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas (desenlace compuesto) y en quienes no las presentaron se resumen en la **Tabla 4**. De forma global la mediana de edad fue de 63 (56-71) años y más de la mitad de los pacientes presentaban larga evolución de la enfermedad de base (>10 años).

Tabla 4. Características clínicas y bioquímicas en pacientes con DM2 de acuerdo con la presencia de complicaciones macrovasculares.

Variable	Complicaciones macrovasculares		Valor de P
	No (n= 167)	Sí (n= 167)	
Edad (años)	61 (54-67)	66 (58-73)	<0.001*
Sexo (hombres/mujeres)	86/81	92/75	0.511
IMC (kg/m ²)	28.4 (25.3-31.9)	27.7 (24.9-31.2)	0.320
- 18.5-24.9, n (%)	35 (21)	42 (25.1)	0.535
- 25-29.9, n (%)	67 (40.1)	60 (35.9)	
- 30-34.9, n (%)	46 (27.5)	53 (31.7)	
- 35-39.9, n (%)	13 (7.8)	9 (5.4)	
- ≥40, n (%)	6 (3.6)	3 (1.8)	
TAS (mmHg)	128 (116-142)	130 (117-142)	0.820
TAD (mmHg)	79 (71-84)	75 (70-81)	0.025*
Glucosa (mg/dL)	128 (99-172)	133 (106-192)	0.171
HbA1c (%)	7.2 (6.2-8.8)	7.2 (6.7-7.9)	0.987
Control de DM2, n (%)	80 (47.9)	94 (56.3)	0.125
TG (mg/dL)	154 (117-217)	146 (97-162)	<0.001*
Colesterol total (mg/dL)	172 (144-202)	155 (118-165)	<0.001*
HDL (mg/dL)	41 (34-49)	41.5 (34-44)	0.381
LDL (mg/dL)	95 (71-118)	86 (58-90)	<0.001*
Circunferencia de cintura (cm)	Mujeres 99 (89-106)	Mujeres 101 (98-112)	0.010*
	Hombres 100 (95-109)	Hombres 100 (93-104)	
Actividad física, n (%)	56 (33.5)	34 (20.4)	0.007*
AHF ECV, n (%)	122 (73.1)	107 (64.1)	0.077

Tabaquismo, n (%)	63 (37.7)	48 (28.7)	0.081
Duración de DM2 (años)	10 (3-15)	11 (5-19)	0.026*
<10 años	74 (44.3)	42 (25.1)	<0.001*
≥10 años	93 (55.7)	125 (74.9)	
Dislipidemia, n (%)	135 (80.8)	108 (64.7)	0.001*
Hipertensión arterial crónica, n (%)	89 (53.3)	130 (77.8)	<0.001*

DM2, diabetes mellitus tipo 2, IMC, índice de masa corporal; TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; HbA1c, hemoglobina glucosilada; TG, triglicéridos; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; AHF ECV, antecedentes heredofamiliares de enfermedad cardiovascular, EAC, enfermedad arterial coronaria; EVC, enfermedad vascular cerebral.

Las variables cuantitativas se muestran como medianas y rangos intercuartílicos (RIC), las variables cualitativas están representadas como números totales y porcentajes.

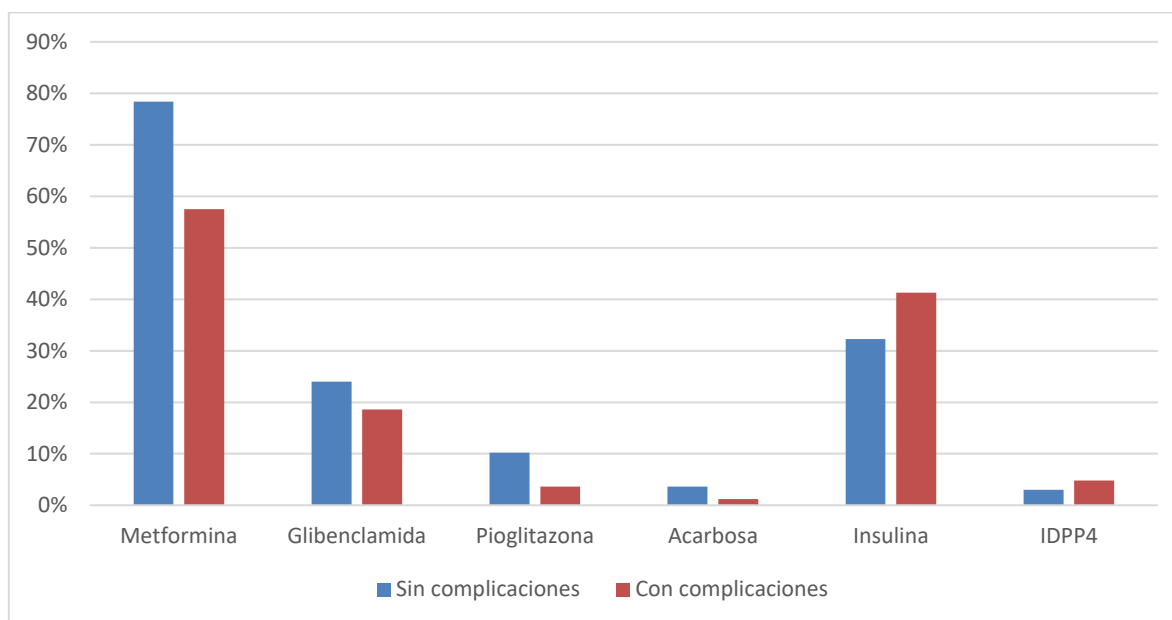
*valor de p significativo. Prueba de X^2 para variables categóricas y U de Mann Whitney para variables continuas

Se observaron alteraciones significativas en el perfil lipídico con una mayor afectación en pacientes sin complicaciones cardiovasculares. Las cifras de glucosa en ayuno y hemoglobina glucosilada fueron similares en ambos grupos correspondiendo con un regular control glucémico en aproximadamente el 50% de los casos. Dicho criterio de control fue considerado en el caso de observar <7% de hemoglobina glucosilada en forma general, aunque se individualizó para los pacientes >65 años y con múltiples comorbilidades, siendo en ese caso el punto de corte <8%. Al considerar un control estricto (HbA1c <7%) independiente del resto de factores individuales, se evidenció que un mayor porcentaje de pacientes sin complicaciones cardiovasculares lograban mantener cifras menores de 7% (42.5% vs 35.3%).

Como parte del manejo farmacológico reportado, metformina y pioglitazona fueron mayormente prescritos en el grupo de pacientes sin complicaciones cardiovasculares (78.4 vs 57.5%, $p < 0.001$; y 10.2 vs 3.6%, $p = 0.017$ respectivamente). Ver **Gráfica 1**.

El uso de estatinas, fibratos y antiagregantes plaquetarios fue mayor en el grupo de pacientes con diagnóstico de enfermedad cardiovascular, aunque resultó estadísticamente significativo únicamente para antiagregantes (21 vs 44.3%, $p < 0.001$).

Gráfica 1. Tipo de tratamiento hipoglucemiante utilizado. (n=334)



IDPP4: Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4

Respecto a factores de riesgo cardiovascular, hubo mayor índice de tabaquismo activo o exfumadores en el grupo de pacientes sin complicaciones (37.7 vs 28.7%). La diferencia en la frecuencia de antecedentes familiares de ECV referidos por los pacientes en el interrogatorio no mostró significancia estadística.

La prevalencia de dislipidemia fue más alta ($p= 0.001$) en quienes no han manifestado eventos cardiovasculares, esto con base en el diagnóstico previo de la enfermedad, uso actual de fármacos para su tratamiento o cifras alteradas en los estudios de laboratorio realizados durante el estudio.

La comorbilidad con hipertensión arterial sistémica fue considerablemente mayor (77.8 vs 53.3%) en pacientes complicados; al momento de la evaluación clínica las cifras tensionales detectadas se observaron dentro de rangos de control en ambos grupos.

En relación a sobrepeso y obesidad, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, sin embargo, menos del 25% de los sujetos tienen un IMC considerado normal, así como prevalece la obesidad abdominal principalmente en las mujeres. Los sujetos sin diagnóstico de ECV refirieron realizar algún tipo de

actividad física (33.5% vs 20.4%) durante al menos 150 minutos por semana distribuidos en diferentes días.

Cabe señalar que del total de los casos del grupo de complicaciones macrovasculares, 85 pacientes (51%) correspondieron al subgrupo de EAC, 63 sujetos presentaron evidencia de enfermedad vascular cerebral isquémica y 19 (11%) cursaron con ambas patologías.

Al hacer una evaluación de las características basales entre los diferentes genotipos de los 3 polimorfismos estudiados, para el caso de PAI-1 4G/5G no hubo diferencias en los 3 grupos. En MTHFR C677T, existe tendencia positiva para la presencia de hipertensión arterial en los genotipos C/T (71%) y T/T (60.5%) vs el homocigoto C/C (56.9%) con $p = 0.062$. ENOS G894T muestra mayor frecuencia de sexo masculino e hipertensión en los genotipos G/T y T/T considerados de riesgo; alcanzando significancia estadística en ambos casos ($p = 0.001$ y $p = 0.009$ respectivamente).

Polimorfismos PAI-1 4G/5G, ENOS G894T y MTHFR C677T y la presencia de complicaciones macrovasculares.

Se identificó la amplificación de los fragmentos polimórficos del rs1799889, rs1801133 y rs1799983, mediante el corrimiento electroforético en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y se visualizaron usando un transiluminador de luz ultravioleta.

Con respecto al polimorfismo PAI-1 4G/5G tanto la distribución alélica como genotípica fue equiparable en ambos grupos, el alelo 4G se encontró en 23.3% de pacientes sin complicaciones vs 27.8% de los sujetos con ECV ($p = 0.931$). Las diferentes variantes genotípicas se muestran en la **Tabla 5** evaluando diferentes modelos de herencia y efecto.

Tabla 5. Polimorfismo 4G/5G en el gen del PAI-1 en pacientes con DM2 y el riesgo de ECV.

SNP	Distribución genotípica ^a		Modelo Aditivo	P	Modelo dominante	P	Modelo recesivo	P
	DM2 N=167	DM2 +ECV N=167	OR (95% IC)		OR (95% IC)		OR (95% IC)	
PAI-1								
4G/4G	10 (6)	14 (8.4)	0.8 (0.33-1.94)	0.425	0.69 (0.30-1.61)	0.397	0.76 (0.49-1.18)	0.225
4G/5G	58 (34.7)	65 (38.9)	0.63 (0.26-1.5)		5G/5G vs 4G/5G + 4G/4G		4G/4G vs 4G/5G + 4G/4G	
5G/5G	99 (59.3)	88 (52.7)	1 (referencia)					
^b Alelo 4G	78 (23.3)	93 (27.8)	1.26 (0.89-1.79)	0.214				
Alelo 5G	256 (76.6)	241 (72.2)						

DM2, diabetes mellitus 2; ECV, enfermedad cardiovascular; OR, razón de momios

^aLos datos se muestran como números totales de sujetos (%)

^bLas frecuencias alélicas se calculan 2N

Para el polimorfismo *ENOS* G894T la frecuencia del alelo T fue mayor en pacientes que ya habían tenido manifestaciones de ECV comparado con el grupo sin complicaciones (9 vs 20%, $p < 0.001$) estimando un riesgo 2.5 veces mayor para la presencia del compuesto de complicaciones macrovasculares. La distribución genotípica también mostró diferencias entre ambos grupos en los modelos de herencia dominante (G/G vs G/T + G/G) con una frecuencia del alelo de riesgo de 35.3% para los casos complicados vs 17.4% en aquellos con ausencia de complicaciones ($p < 0.001$); en el modelo recesivo (G/G + G/T vs T/T) la frecuencia fue de 4.8% vs 0.6% respectivamente mostrando también diferencia significativa (**Tabla 6**).

Tabla 6. Polimorfismo G894T en el gen de *ENOS* en pacientes con DM2 y el riesgo de ECV.

SNP	Distribución genotípica ^a		Modelo Aditivo		Modelo dominante		Modelo recesivo	
	DM2 N=167	DM2 +ECV N=167	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
ENOS								
G/G	138 (82.6)	108 (64.7)	1.0 (referencia)					
G/T	28 (16.8)	51 (30.5)	2.32 (1.37- 3.93)	<0.001*	2.6 (1.56- 4.3) CC vs CT+TT	<0.001*	8.35 (1.03- 67.5) TT vs CT+CC	0.037*
T/T	1 (0.6)	8 (4.8)	10.2 (1.25- 82.9)					
^b Alelo G	304 (91)	267 (80)	2.54 (1.6- 4.03)	<0.001*				
Alelo T	30 (9)	67 (20)						

DM2, diabetes mellitus 2; ECV, enfermedad cardiovascular; OR, razón de momios

^aLos datos se muestran como números totales de sujetos (%)

^bLas frecuencias alélicas se calculan 2N

*valor de p significativo. Prueba de X² o exacta de Fisher

Los resultados obtenidos del polimorfismo *MTHFR* C677T no mostraron diferencias significativas en la frecuencia del alelo de riesgo (T) al distribuirse prácticamente en 50% en cada uno de los grupos. Los diferentes modelos de herencia tampoco evidenciaron diferencias entre genotipos. El resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Polimorfismo C677T en el gen de *MTHFR* en pacientes con DM2 y el riesgo de ECV.

SNP	Distribución genotípica ^a		Modelo Aditivo		Modelo dominante		Modelo recesivo	
	DM2 N=167	DM2 +ECV N=167	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
MTHFR								
C/C	36 (21.6)	29 (17.4)	1.0 (referencia)		1.3 (0.75- 2.25) CC vs CT+TT	0.333	1.28 (0.78- 2.1) TT vs CT+CC	0.317
C/T	92 (55.1)	91 (54.5)	1.22 (0.69- 2.16)	0.472				
T/T	39	47	1.49 (0.78-					

	(23.4)	(28.1)	2.85)	
^b Alelo	164	149		
C	(49.1)	(44.6)	1.19 (0.93-	0.277
Alelo	170	185	1.29)	
T	(50.8)	(55.4)		

DM2, diabetes mellitus 2; ECV, enfermedad cardiovascular; OR, razón de momios

^aLos datos se muestran como números totales de sujetos (%)

^bLas frecuencias alélicas se calculan 2N

Al realizar el análisis de regresión logística para estimar asociación entre la presencia de las variantes genéticas (específicamente eNOS G894T) y el desarrollo de complicaciones macrovasculares se observa que el alelo T permanece como factor de riesgo independiente (OR 2.19 [1.26-3.8], p=0.005) de edad (OR 1.03 [1.006-1.05], p=0.014), tiempo de evolución de DM2 (OR 2.03 [1.24-3.33], p=0.005), e hipertensión arterial (OR 2.38 [1.43-3.94], p=0.001) (**Tabla 8**). El resto de variables no fueron incluidas en el modelo debido a que aunque se observa diferencia en su distribución entre los grupos, no existe un sustento biológico que justifique su participación en el análisis, p.ej la mayor frecuencia observada de tabaquismo, dislipidemia, AHF ECV en el grupo de pacientes sin complicaciones.

Tabla 8. Modelo de regresión logística no condicional del polimorfismo G894T en el gen de *ENOS* en pacientes con DM2 y el riesgo de ECV

1	2	3	4
2.6 (1.56-4.3), <0.001	2.57 (1.51-4.38), 0.001	2.45 (1.43-4.21), 0.001	2.19 (1.26-3.8), 0.005

Modelo 1: crudo

Modelo 2: ajustado por edad y sexo

Modelo 3: ajustado por edad, sexo, tiempo de evolución de DM2

Modelo 4: ajustado por edad, sexo, tiempo de evolución de DM2 e Hipertensión arterial

Los resultados se muestran como OR (intervalo de confianza 95%), valor de p.

Al realizar una evaluación de la interacción entre los diferentes alelos de riesgo de los 3 polimorfismos, se observó que la presencia concomitante de al menos 2 de

ellos aumentó la frecuencia de riesgo de complicaciones macrovasculares (excepto en el caso de *PAI-1* 4G + *MTHFR* T), identificándose un riesgo 3.38 veces mayor para la combinación de los 3 alelos (4G, T y T) (**Tabla 9**). Dicho riesgo se mantuvo significativo en el modelo multivariado al ajustar por otras variables como edad, sexo, tiempo de evolución de DM2 e hipertensión.

Tabla 9. Interacción entre los alelos de riesgo de *PAI-1*, *ENOS* y *MTHFR* en complicaciones cardiovasculares.

<i>PAI-1</i> 4G	<i>ENOS</i> T	<i>MTHFR</i> T	DM2 (%)	DM2 + ECV (%)	OR (IC 95%)	Valor p
-	-	-	2 (1.2)	0	-	0.498
+	+	+	9 (5.4)	27 (16.2)	3.38 (1.54-7.44)	0.001*
+	-	+	52 (31.1)	63 (37.7)	2.57 (1.12-5.93) ^a	0.026*
+	+	-	12 (7.2)	34 (20.4)	1.34 (0.85-2.1)	0.205
-	+	+	21 (12.6)	50 (29.9)	1.32 (0.81-2.16) ^a	0.260
+	+	-	12 (7.2)	34 (20.4)	3.3 (1.64-6.63)	<0.001*
-	+	+	21 (12.6)	50 (29.9)	2.75 (1.32-5.74) ^a	0.007*
-	+	+	21 (12.6)	50 (29.9)	2.97 (1.68-5.22)	<0.001*
-	+	+	21 (12.6)	50 (29.9)	2.35 (1.28-4.3) ^a	0.006*

*valor de p significativo

^aAjustado por edad, sexo, tiempo de evolución de DM2 e hipertensión arterial

DISCUSIÓN

Nuestro estudio incluyó una población diana considerada de alto riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). El objetivo fue evaluar la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de 3 polimorfismos (*PAI-1* 4G/5G, *eNOS* G894T y *MTHFR* C677T) en pacientes con Diabetes Mellitus 2 y su efecto en la presencia de complicaciones macrovasculares. El espectro clínico de la Diabetes fue amplio en los participantes considerando variables como la edad, duración de la enfermedad, comorbilidades. El desenlace compuesto de complicaciones macrovasculares clínicamente sintomáticas nos permitió identificar diferencias en cuanto a factores genéticos, clínicos y bioquímicos presentes en ambos grupos. Respecto a la medición de la variable de desenlace es importante mencionar que todos los pacientes con EVC contaron con el diagnóstico clínico y tomográfico de infarto cerebral o isquemia cerebral transitoria, sin embargo, para los casos de enfermedad arterial coronaria los métodos diagnósticos utilizados variaron (coronariografía, SPECT, ecocardiograma, etc.) de acuerdo al síndrome clínico presentado lo cual podría estar sujeto a sesgo de medición.

Dentro de las variables identificadas con asociación en el análisis bivariado para la presencia de complicaciones macrovasculares se encuentran la edad, antecedente de hipertensión arterial crónica, el tiempo de evolución de DM2 mayor a 10 años, así como el alelo de riesgo del polimorfismo *eNOS* G894T.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para otras variables como dislipidemia, tabaquismo, antecedentes familiares de ECV los cuales se muestran con efecto protector para la presencia del desenlace que son las complicaciones macrovasculares, sin embargo, es importante considerar que dicha información puede estar sujeta a sesgo de memoria al haber sido obtenido por interrogatorio de los pacientes. Los resultados de estudios de laboratorio realizados durante el estudio evidencian también peor control en el perfil lipídico en el caso de los pacientes que no han presentado complicaciones, no obstante, son paraclínicos

que evalúan el estado actual de los participantes. De esta forma podría explicarse que exista un probable efecto de mayor apego al tratamiento una vez establecidas las complicaciones y el uso de fármacos como estatinas como indicación de prevención secundaria de un nuevo evento, además, los pacientes pueden ser sometidos a un seguimiento clínico más estrecho que influya favorablemente en su control.

De acuerdo a las características basales, la mediana de edad se encuentra en los 63 años lo cual concuerda con las estadísticas reportadas por ENSANUT MC 2016 (2), aunque es notorio que los pacientes de edad más avanzada presentan mayor frecuencia de ECV. El tiempo de evolución de la enfermedad al clasificarse como menor o mayor a 10 años demostró que el segundo grupo era el más afectado por las complicaciones sintomáticas, dicho resultado es similar a lo reportado por Rana et al en una cohorte de 1,586,061 adultos de 30 a 90 años en California, EUA durante 2002-2011 donde la sola presencia del diagnóstico de DM2 era insuficiente para ser considerado como equivalente de cardiopatía isquémica en pacientes con menos de 10 años de diagnóstico de la enfermedad, una vez superando dicho período de tiempo el riesgo puede llegar a ser equiparable. Una de las limitaciones de dicho estudio fue que la determinación de la presencia de enfermedad coronaria se realizó a través de expediente electrónico mediante la búsqueda del diagnóstico referido como enfermedad coronaria por la clasificación del CIE-9, por lo que se pudo haber incurrido en sesgo de medición (128).

Para el antecedente de tabaquismo no logró identificarse como factor de riesgo, antes bien su presencia fue mayor en los casos no complicados, esto difiere con la mayoría de los estudios en donde claramente se ha evidenciado el riesgo establecido por ser fumador activo como también lo es para exfumadores; un ejemplo de ello son los resultados del metaanálisis de Pan et al (129) en el que se incluyeron 89 estudios de cohorte con el objetivo de establecer la relación existente entre tabaquismo en pacientes con DM2 y mortalidad global y asociada a ECV así como la presencia de eventos cardiovasculares. El RR ajustado para mortalidad

global fue de 1.55 (1.46-1.64) y de 1.49 (1.29-1.71). El RR no ajustado para la presencia de ECV fue de 1.51 (1.41-1.62), siendo más significativo para el desarrollo de EAP 2.15 (1.62-2.85). El hecho de no haber incluido en nuestro estudio a pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad arterial periférica, pudo incidir en el porcentaje de tabaquismo encontrado.

De igual forma, la inclusión de un mayor número de casos prevalentes y por lo tanto sobrevivientes en nuestro trabajo genera una de las principales limitaciones para estimar asociaciones, ante lo cual los hallazgos deben ser tomados con reserva.

Respecto al efecto de los diferentes polimorfismos genéticos de interés, destaca el posible rol de la variante de riesgo de eNOS en pacientes con y sin complicaciones macrovasculares.

La hipofibrinólisis ocasionada por la elevación de los niveles de PAI-1 puede ser resultado de múltiples interacciones con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el TGF- β , metabolismo lipídico que condicionan mayor riesgo de eventos cardiocerebrovasculares.

Se ha descrito que en pacientes con resistencia a la insulina los niveles plasmáticos de PAI-1 se encuentran elevados incluso que condiciona riesgo para el desarrollo de DM2 de forma más temprana, sin embargo, la influencia genética ha sido variable en diferentes poblaciones. En Asia se ha encontrado la mayor frecuencia del alelo de riesgo incluyendo a la población específica de DM2 sin embargo la asociación ha sido significativa en complicaciones microvasculares (59). El grupo de Katakami et al (77) también encontró una mayor frecuencia del alelo 4G en pacientes con DM2 y EVC e incluso observó un riesgo aditivo con otras variantes de riesgo incluyendo Factor de von Willebrand. En el presente estudio la frecuencia alélica y la distribución genotípica no difirió en ambos grupos siendo consistente con lo publicado en el metaanálisis de Xu et al en 2013 en donde no logró demostrar influencia genética en enfermedad arterial coronaria al evaluar 20 estudios realizados en diferentes poblaciones (71).

La disfunción endotelial es otra de las características patogénicas presentes en

pacientes con DM2, una de las moléculas involucradas en esa alteración es la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial. La presencia del alelo T del polimorfismo G894T en su gen ha sido asociado con el desarrollo de DM2 y sus complicaciones cardiovasculares. Los resultados obtenidos muestran una mayor frecuencia alélica y de los genotipos de riesgo en pacientes con DM2 que ya han presentado algún desenlace cardiovascular. Esta información concuerda con los resultados de Szabó et al quien observó mayor porcentaje del alelo T en pacientes con DM2 y enfermedad arterial coronaria en Budapest (92). De forma semejante Odeberg et al en Suecia evidenció el mismo polimorfismo como factor independiente para IAM en pacientes con Diabetes Mellitus 2 con un OR 3.12 (1.49-6.56). Uno de los estudios más recientes realizado en Egipto por El-Lebedy evaluó la frecuencia e interacción entre 3 polimorfismos incluyendo G894T, ANGPTL8 c194C>T y CETP Taq1B en 3 grupos de pacientes (controles sanos, DM2 sin complicaciones cardiovasculares y DM2 con complicaciones). El polimorfismo de *eNOS* se asoció a la presencia de DM2 con un OR de 3.08 (1.7-5.6), al evaluar su influencia de forma aislada en el grupo de DM2 con y sin complicaciones no logró establecer una asociación, sin embargo, al interactuar con los alelos de riesgo de los otros 2 polimorfismos se sumó el efecto de riesgo con OR de 13.8 (1.63-116.5).

De forma contraria existen autores que no han encontrado asociación del mismo polimorfismo en diferentes desenlaces cardiovasculares (130-132).

Al identificar los fragmentos polimórficos del C677T del gen de *MTHFR* los resultados no muestran diferencias para el alelo T o los genotipos de riesgo y la presencia de complicaciones macrovasculares en pacientes con DM2 mestizo-mexicanos. Esta alteración puede contribuir a la presencia y persistencia de un estado inflamatorio crónico y mayor remodelación vascular en los pacientes con DM2. Existen resultados en donde se ha identificado la variante de riesgo en pacientes con DM2 comparado con controles, así como en el desarrollo de ECV en el subgrupo de pacientes con complicaciones micro y macrovasculares. Un estudio de casos y controles realizado en Egipto por el grupo de Settin et al estableció la relación del polimorfismo con retinopatía diabética OR 3.47 (1.5-8.2), neuropatía

diabética OR 5.2 (2.1-12.99) y enfermedad arterial coronaria OR 2.9 (1.3-7) coincidiendo con lo evaluado en otras poblaciones: Polonia (133), República Checa (134), China (135) y Japón (136).

Los estudios con ausencia de asociación del polimorfismo también se han reportado en diferentes poblaciones incluyendo individuos con DM2 y micro y macroangiopatía. Tal es el caso de pacientes de origen caucásico (137), finlandés (138) y francés (139) en quienes la enfermedad arterial coronaria fue establecida como variable de desenlace.

Al evaluar la potencial sinergia entre los alelos 4G, T y T de los 3 polimorfismos, se evidenció un mayor riesgo (OR 2.57) para la presencia de complicaciones macrovasculares en los pacientes con DM2, lo cual confirma la participación de más de un gen en el desarrollo de las alteraciones mencionadas.

Es necesario hacer hincapié en que las enfermedades en cuestión son multifactoriales y no se pretende considerarlas como monogénicas, más bien se requiere de continuar la búsqueda de factores genéticos, epigenéticos, ambientales, involucrados en el desarrollo y progresión de esta enfermedad metabólica compleja así como de sus complicaciones. La genética humana puede revelar nuevos blancos de intervención al demostrar alteraciones en la expresión y/o función proteica que tenga efecto en el desarrollo de complicaciones, puede aproximarnos a potenciales biomarcadores que resulten útiles en la predicción y/o control de individuos con mayor riesgo de presentar complicaciones o una progresión acelerada de la enfermedad en la que se abarquen la mayoría de las vías fisiopatológicas involucradas incluyendo la de trombosis, hemostasia y aterogénesis.

Con lo anterior se hace evidente la necesidad de ampliar el estudio de variables involucradas en el desarrollo de complicaciones no solo macrovasculares sino también a nivel microangiopático y que pueden ser determinantes en la evolución y pronóstico de los pacientes. Asimismo, sería conveniente la realización de un

estudio prospectivo de casos incidentes que pudiera fortalecer el aspecto metodológico de los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

En este proyecto evaluamos la frecuencia e influencia de 3 variantes genéticas con la presencia de complicaciones macrovasculares clínicamente manifiestas en pacientes mestizo-mexicanos con diagnóstico de DM2. Los factores clínicos como edad, tiempo de evolución de DM2 e hipertensión arterial se mantienen como elementos predominantes en el desarrollo de ECV. Encontramos una mayor frecuencia del alelo de riesgo T de *ENOS* G894T y de la combinación de los 3 alelos de riesgo en los casos de pacientes con diabetes tipo 2 con complicaciones. Estos resultados sugieren el posible rol de factores genéticos en la susceptibilidad a desarrollar dichas complicaciones cardiovasculares las cuales constituyen la principal causa de muerte en pacientes con DM2.

REFERENCIAS

1. Roglic G, Varghese C, Riley L. Global Report on Diabetes [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2016. p. 1–88. Available from: apps.who.int/iris/bitstream/10665/.../1/9789241565257_eng.pdf%0A
2. Hernández Ávila M, Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Cuevas Nasu L, Gómez Acosta LM, Gaona Pineda EB, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 [Internet]. Secretaria de Salud. 2016. p. 1–151. Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>
3. INEGI. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido [Internet]. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2016 [cited 2017 May 20]. Available from: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
4. American Diabetes Association. Standards of Medical care in diabetes - 2018. *J Clin Appl Res Educ*. 2018;40(January):1–142.
5. UK D. Diabetes facts and stats [Internet]. Diabetes UK. 2014 [cited 2017 May 20]. Available from: <https://www.diabetes.org.uk/Documents/AboutUs/Statistics/Diabetes-key-stats-guidelines-April2014.pdf>
6. Skyler JS, Bergenstal R, Bonow RO, Buse J, Deedwania P, Gale EAM, et al. Intensive glycemic control and the prevention of cardiovascular events: Implications of the ACCORD, ADVANCE, and VA diabetes trials. *Diabetes Care*. 2009;32(1):187–92.
7. Domingueti CP, Dusse LMS, Carvalho MDG, Gomes KB, Fernandes a P. Hypercoagulability and cardiovascular disease in diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2013;415:279–85. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84870494300&partnerID=40&md5=ad5ec1cf248f761bdc9a593b986314f1>
8. Jing F, Shaw KM, Keenan NL. Prevalence of Coronary Heart Disease --- United States, 2006-- 2010 [Internet]. Centers for Disease Control and Preventiom. 2011.

p.1377–81.

Available

from:

<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6040a1.htm>

9. Ali MK, Narayan KMV, Tandon N. Diabetes & coronary heart disease: current perspectives. *Indian J Med Res.* 2010;132(5):584–97.
10. O'Connell J, Yi R, Wilson C, Manson SM, Acton KJ. Racial Disparities in Health Status: A comparison of the morbidity among American Indian and U.S. adults with diabetes. *Epidemiol Serv Res.* 2010;33(7):1463–70.
11. Reynoso-Noverón N, Mehta R, Almeda-Valdes P, Rojas-Martinez R, Villalpando S, Hernández-Ávila M, et al. Estimated incidence of cardiovascular complications related to type 2 diabetes in Mexico using the UKPDS outcome model and a population-based survey. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2011 Jan 7;10:1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214916>
12. Meigs JB, Cupples LA, Wilson PW. Parental transmission of type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* [Internet]. 2000 Dec;49(12):2201–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118026>
13. Weijnen CF, Rich SS, Meigs JB, Krolewski AS, Warram JH. Risk of diabetes in siblings of index cases with Type 2 diabetes: implications for genetic studies. *Diabet Med* [Internet]. 2002 Jan;19(1):41–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869302>
14. Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C, Davì G. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res* [Internet]. 2012 Mar;129(3):371–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197180>
15. Grant PJ. Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med* [Internet]. 2007 Aug;262(2):157–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17645584>
16. Hernández-Juárez J, Moreno-Hernández M, Ricardo-Moreno T, García-González A, García-Latorre EA, Hernández-López JR, et al. Valores de referencia para la actividad de los factores hemostáticos en la población mexicana. *Rev Invest Clin Rev Invest Clin Rev Invest Clin Rev Invest Clin Rev Invest Clin Investig Clínica* [Internet]. 2014;66(3):252–60. Available from: <http://paginas.facmed.unam.mx/deptos/sp/wp->

content/uploads/2015/10/U6_anexo2_ValorRef_epiclin.pdf

17. Cabot RC, Harris NL, Shepard J-AO, Kratz A, Ferraro M, Sluss PM, et al. case records of the massachusetts general hospital Laboratory Reference Values. *n engl j med* [Internet]. 2004;351:1535-1548-63. Available from: <http://in.bgu.ac.il/en/fohs/communityhealth/Family/Documents/PhysicianTrainingPres/LaboratoryReferenceValues.pdf>
18. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J* [Internet]. 2013 Mar 7;34(10):719-28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242196>
19. Durbin RM, Altshuler DL, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* [Internet]. 2010 Oct 28;467(7319):1061-73. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09534>
20. Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* [Internet]. 2000 Dec;159 Suppl 3:S173-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216894>
21. George AL, Jr. Use of contemporary genetics in cardiovascular diagnosis. *Circulation* [Internet]. 2014 Nov 25;130(22):1971-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421045>
22. Peden JF, Farrall M. Thirty-five common variants for coronary artery disease: the fruits of much collaborative labour. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Oct 15;20(R2):R198-205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875899>
23. Casas JP, Cooper J, Miller GJ, Hingorani AD, Humphries SE. Investigating the Genetic Determinants of Cardiovascular Disease Using Candidate Genes and Meta-analysis of Association Studies. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2006 Mar; 70(2):145-69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626327>
24. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* [Internet]. 2012 Dec 2;45(1):25-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23202125>

25. Ganna A, Magnusson PKE, Pedersen NL, de Faire U, Reilly M, Arnlov J, et al. Multilocus Genetic Risk Scores for Coronary Heart Disease Prediction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2013 Sep 1;33(9):2267–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685553>
26. Shah S, Casas JP, Gaunt TR, Cooper J, Drenos F, Zabaneh D, et al. Influence of common genetic variation on blood lipid levels, cardiovascular risk, and coronary events in two British prospective cohort studies. *Eur Heart J* [Internet]. 2013 Apr 1;34(13):972–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22977227>
27. Gui L, Wu F, Han X, Dai X, Qiu G, Li J, et al. A multilocus genetic risk score predicts coronary heart disease risk in a Chinese Han population. 2014; Available from: [http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(14\)01447-6/pdf](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(14)01447-6/pdf)
28. Yiannakouris N, Katsoulis M, Trichopoulou A, Ordovas JM, Trichopoulos D. Additive influence of genetic predisposition and conventional risk factors in the incidence of coronary heart disease: a population-based study in Greece. *BMJ Open* [Internet]. 2014 Feb 5;4(2):e004387. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24500614>
29. Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, Sharma A, et al. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet* [Internet]. 2010 Oct 23;376(9750):1393–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971364>
30. Tada H, Melander O, Louie JZ, Catanese JJ, Rowland CM, Devlin JJ, et al. Risk prediction by genetic risk scores for coronary heart disease is independent of self-reported family history. *Eur Heart J* [Internet]. 2016 Feb 7;37(6):561–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392438>
31. Morris RW, Cooper JA, Shah T, Wong A, Drenos F, Engmann J, et al. Marginal role for 53 common genetic variants in cardiovascular disease prediction. *Heart* [Internet]. 2016 Oct 15;102(20):1640–7. Available from: <http://heart.bmj.com/lookup/doi/10.1136/heartjnl-2016-309298>
32. Beaney KE, Ward CE, Bappa DAS, McGale N, Davies AK, Hirani SP, et al. A 19-SNP coronary heart disease gene score profile in subjects with type 2 diabetes:

the coronary heart disease risk in type 2 diabetes (CoRDia study) study baseline characteristics. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2016;15(1):141. Available from: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12933-016-0457-7>

33. Strohman R. Maneuvering in the Complex Path from Genotype to Phenotype. *Science (80-)* [Internet]. 2002 Apr 26;296(5568):701–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976445>
34. Isordia-Salas I, Leaños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* [Internet]. 2009 Apr;62(4):365–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19401121>
35. Isordia-Salas I, Trejo-Aguilar A, Valadés-Mejía MG, Santiago-Germán D, Leaños-Miranda A, Mendoza-Valdéz L, et al. C677T polymorphism of the 5,10 MTHFR gene in young Mexican subjects with ST-elevation myocardial infarction. *Arch Med Res* [Internet]. 2010 May;41(4):246–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637366>
36. Isordia-Salas I, Barinagarrementería-Aldatz F, Leaños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G, Vela-Ojeda J, García-Chávez J, et al. The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Is Associated with Idiopathic Ischemic Stroke in the Young Mexican-Mestizo Population. *Cerebrovasc Dis* [Internet]. 2010;29(5):454–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203488>
37. Isordia-Salas I, Leaños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G. The Glu298ASP polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature ST elevation myocardial infarction in Mexican population. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2010 Apr;411(7–8):553–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898110000264>
38. Valades-Mejía MG, Domínguez-López ML, Aceves-Chimal JL, Miranda AL, Majluf-Cruz A, Isordia-Salas I. [Study of the polymorphism R353Q in the coagulation factor VII gene and the N700S in the thrombospondin-1 gene in young patients with acute myocardial infarction]. *Cir Cir* [Internet] 82(6):595–606. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393858>

39. Sing CF, Stengård JH, Kardia SLR. Genes, environment, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2003 Jul 1;23(7):1190–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730090>
40. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. REVIEW: Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1): A Key Factor Linking Fibrinolysis and Age-Related Subclinical and Clinical Conditions. *Cardiovasc Ther* [Internet]. 2010 Oct;28(5):e72–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20626406>
41. Festa A, D'Agostino R, Mykkänen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, et al. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999 Mar;19(3):562–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10073958>
42. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, Henry M, Nalbone G, Juhan-Vague I. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* [Internet]. 1997 May;46(5):860–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133556>
43. Al-Hamodi Z, Ismail IS, Saif-Ali R, Ahmed KA, Muniandy S. Association of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator with type 2 diabetes and metabolic syndrome in Malaysian subjects. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2011 Mar 18;10:23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21414238>
44. Festa A, D'Agostino R, Tracy RP, Haffner SM, Insulin Resistance Atherosclerosis Study. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* [Internet]. 2002 Apr;51(4):1131–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916936>
45. Bastard JP, Piéroni L, Hainque B. Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor 1 and insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet];16(3):192–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867719>

46. Reusch JEB. Current concepts in insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* [Internet]. 2002 Sep 5;90(5A):19G–26G. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231075>
47. Yarmolinsky J, Bordin Barbieri N, Weinmann T, Ziegelmann PK, Duncan BB, Inês Schmidt M. Plasminogen activator inhibitor-1 and type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jan 27;6:17714. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813008>
48. Hernestål-Boman J, Norberg M, Jansson J-H, Eliasson M, Eriksson JW, Lindahl B, et al. Signs of dysregulated fibrinolysis precede the development of type 2 diabetes mellitus in a population-based study. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2012 Dec 18;11:152. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249721>
49. Steinberger J, Daniels SR, American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young), American Heart Association Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and . *Circulation* [Internet]. 2003 Mar 18;107(10):1448–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642369>
50. Azad N, Agrawal L, Emanuele N V., Klein R, Bahn GD, McCarren M, et al. Association of PAI- 1 and Fibrinogen With Diabetic Retinopathy in the Veterans Affairs Diabetes Trial (VADT). *Diabetes Care* [Internet]. 2014 Feb 1;37(2):501–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101699>
51. Lee CC, Lorenzo C, Haffner SM, Wagenknecht LE, Festa A, Goodarzi MO, et al. The association of inflammatory and fibrinolytic proteins with 5 year change in insulin clearance: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetologia* [Internet]. 2013 Jan 10;56(1):112–20. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-012- 2741-8>
52. Viollet B, Guigas B, Garcia NS, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and

- molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci* [Internet]. 2012 Mar 1;122(6):253–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22117616>
53. Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der Planken M, Ruige JB, Van Gaal LF. Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes* [Internet]. 2006 Aug 3;30(8):1308–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.ijo.0803189>
 54. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Bonovas S, Kopterides P, Vaiopoulos G. The effect of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism on the thrombotic risk. *Thromb Res* [Internet]. 2008 Jan 1;122(6):736–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17949795>
 55. Zhao L, Huang P. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with type 2 diabetes risk. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2013;6(8):632–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040470>
 56. Abboud N, Ghazouani L, Saidi S, Ben-hadj-khalifa S, Addad F, Almawi WY, et al. Activator Levels in Myocardial Infarction : A Case-Control Study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(1):23–7.
 57. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blombäck M. Increased Plasma Levels of a Rapid Inhibitor of Tissue Plasminogen Activator in Young Survivors of Myocardial Infarction. *N Engl J Med* [Internet]. 1985 Dec 19;313(25):1557–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3934538>
 58. Thögersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, et al. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation* [Internet]. 1998 Nov 24;98(21):2241–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826309>
 59. Xu F, Liu H, Sun Y. Association of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism and type 2 diabetic nephropathy. *Ren Fail* [Internet]. 2016 Jan 2;38(1):157–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26616527>
 60. Ossei-Gerning N, Mansfield MW, Stickland MH, Wilson IJ, Grant PJ. Plasminogen

activator inhibitor-1 promoter 4G/5G genotype and plasma levels in relation to a history of myocardial infarction in patients characterized by coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1997 Jan;17(1):33–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9012634>

61. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-Low-Density Lipoprotein Response Element in the Promoter Region of the Human Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene Implicated in the Impaired Fibrinolysis of Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1998;18(1):20–6. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.18.1.20><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9445251>
62. Nilsson L, Gåfvells M, Musakka L, Ensler K, Strickland DK, Angelin B, et al. VLDL activation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: involvement of the VLDL receptor. *J Lipid Res* [Internet]. 1999 May 1;40(5):913–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10224160>
63. Chen R, Yan J, Liu P, Wang Z. Effects of Thiazolidinedione Therapy on Inflammatory Markers of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Folli F, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Apr 2;10(4):e0123703. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0123703>
64. Ozel Demiralp D, Aktas H, Akar N. The Effect of Plasminogen Activator Inhibitor-1 –675 4G/5G Polymorphism on PAI-1 Gene Expression and Adipocyte Differentiation. *Clin Appl Thromb* [Internet]. 2008 Oct 26;14(4):438–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160587>
65. Eriksson P, Kallin B, van 't Hoof FM, Båvenholm P, Hamsten A. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Mar 14;92(6):1851–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7892190>
66. Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, et al. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1998

- Feb;18(2):152–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9484978>
67. Ye S, Green FR, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Dawson SJ, et al. The 4G/5G genetic polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene is associated with differences in plasma PAI-1 activity but not with risk of myocardial infarction in the ECTIM study. Etude CasTemoins de l'infarctus du Myocarde. *Thromb Haemost* [Internet]. 1995 Sep;74(3):837–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571307>
 68. Panahloo A, Mohamed-Ali V, Lane A, Green F, Humphries SE, Yudkin JS. Determinants of plasminogen activator inhibitor 1 activity in treated NIDDM and its relation to a polymorphism in the plasminogen activator inhibitor 1 gene. *Diabetes* [Internet]. 1995 Jan 1;44(1):37–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7813812>
 69. Parpugga TK, Tatarunas V, Skipskis V, Kupstyte N, Zaliaduonyte-Peksiene D, Lesauskaite V. The Effect of PAI-1 4G/5G Polymorphism and Clinical Factors on Coronary Artery Occlusion in Myocardial Infarction. *Dis Markers* [Internet]. 2015;2015:1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26273123>
 70. Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsangaris I, Tsiara CG, Kopterides P, Vaiopoulos A, et al. The association between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) levels, PAI-1 4G/5G polymorphism, and myocardial infarction: a Mendelian randomization meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* [Internet]. 2014 Jan 1;52(7):937–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24695040>
 71. Sampaio MF, Hirata MH, Hirata RDC, Santos FCP, Picciotti R, Luchessi AD, et al. AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2007 Feb;377(1–2):154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17126309>
 72. Sakhteh M, Poopak B, Amirizadeh N, Shamshiri A, Bagheri A, Faranoush M. Polymorphism and synergism of angiotensin-converting enzyme (ACE) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) genes in coronary artery disease. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* [Internet]. 2015 Dec 12;16(4):1168–74. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1470320314561247>
 73. Crainich P, Jenny NS, Tang Z, Arnold AM, Kuller LH, Manolio T, et al. Lack of

association of the plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism with cardiovascular disease in the elderly. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2003 Aug 1;1(8):1799–804. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1538-7836.2003.00255.x>

74. Xu K, Liu X, Yang F, Cui D, Shi Y, Shen C, et al. PAI-1 -675 4G/5G Polymorphism in Association with Diabetes and Diabetic Complications Susceptibility: a Meta-Analysis Study. Huang Q, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Nov 5;8(11):e79150. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079150>
75. Naran NH, Chetty N, Crowther NJ. The influence of metabolic syndrome components on plasma PAI-1 concentrations is modified by the PAI-1 4G/5G genotype and ethnicity. *Atherosclerosis* [Internet]. 2008 Jan;196(1):155–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17467713>
76. Su S, Chen S, Zhao J, Huang J, Wang X, Chen R, et al. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene: Selection of Tagging Single Nucleotide Polymorphisms and Association With Coronary Heart Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2006 Apr 1;26(4):948–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424345>
77. Katakami N, Takahara M, Kaneto H, Shimizu I, Ohno K, Ishibashi F, et al. Accumulation of gene polymorphisms related to plaque disruption and thrombosis is associated with cerebral infarction in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2010 Feb;33(2):390–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933990>
78. Veerasamy M, Bagnall A, Neely D, Allen J, Sinclair H, Kunadian V. Endothelial Dysfunction and Coronary Artery Disease. *Cardiol Rev* [Internet]. 2014 Nov;23(3):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420051>
79. Gutiérrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elízaga J, Lerman A, Fernández-Avilés F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *Eur Heart J* [Internet]. 2013 Nov;34(41):3175–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014385>
80. Sena CM, Pereira AM, Seíça R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2013

Dec ;1832(12):2216–31. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994612>

81. Tao H, Chen G. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis. *Neurosci Res* [Internet]. 2009 Jul 1;64(3):311–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010209000972>
82. Salimi S, Firoozrai M, Zand H, Nakhaee A, Shafiee SM, Tavilani H, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in patients with coronary artery disease. *Ann Saudi Med* [Internet]. 2010;30(1):33–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103956>
83. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Cardiovascular Actions of Insulin. *Endocr Rev* [Internet]. 2007 Aug;28(5):463–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525361>
84. Tousoulis D, Papageorgiou N, Androulakis E, Siasos G, Latsios G, Tentolouris K, et al. Diabetes Mellitus-Associated Vascular Impairment. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2013 Aug 20;62(8):667–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948511>
85. Konsola T, Siasos G, Antonopoulos AS, Kollia C, Oikonomou E, Tentolouris N, et al. The impact of T786C and G894T polymorphisms of eNOS on vascular endothelial growth factor serum levels in type 2 diabetes patients. *Int J Cardiol* [Internet]. 2016 Nov 1;222:155–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27494728>
86. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes* [Internet]. 2003 May;52(5):1270–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12716763>
87. Tamemoto H, Ishikawa S, Kawakami M. Association of the Glu298Asp polymorphism of the eNOS Gene with ischemic heart disease in Japanese diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2008 May;80(2):275–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18243394>
88. Katakami N, Kaneto H, Matsuoka T, Takahara M, Osonoi T, Saitou M, et al.

Accumulation of oxidative stress-related gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes – An 8-year prospective study. *Atherosclerosis* [Internet]. 2014 Aug;235(2):408–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24933031>

89. Kumar A, Misra S, Kumar P, Prasad K, Pandit AK, Chakravarty K, et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta- analysis. *Neurol India* [Internet]. 2017;65(1):22–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28084234>
90. Rai H, Parveen F, Kumar S, Kapoor A, Sinha N. Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease: An Updated Meta-Analysis and Systematic Review. Ai J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Nov 19;9(11):e113363. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25409023>
91. Yao Y, Chang W, Jin Y, He L. An updated meta-analysis of endothelial nitric oxide synthase gene: Three well-characterized polymorphisms with ischemic stroke. *Gene* [Internet]. 2013 Oct 10;528(2):84–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845784>
92. Szabó GV, Kunstár A, Acsády G. Methylentetrahydrofolate Reductase and Nitric Oxide Synthase Polymorphism in Patients with Atherosclerosis and Diabetes. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2009 Dec 29;15(4):631–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19330466>
93. Odeberg J, Larsson CA, Råstam L, Lindblad U. The Asp298 allele of endothelial nitric oxide synthase is a risk factor for myocardial infarction among patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. 2008 Dec 10;8(1):36. Available from: <http://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2261-8-36>
94. Dellamea BS, Pinto LCF, Leitão CB, Santos KG, Canani LHS. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med Genet* [Internet]. 2014 Dec 1;15(1):9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24433471>
95. Zhang Y, Xiao H-Q, Zeng X-T, Zuo H-X, Xu Y-C. Associations between endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: an updated

- meta-analysis. *Ren Fail* [Internet]. 2015 Nov 26;37(10):312–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489520>
96. Zhao S, Li T, Zheng B, Zheng Z. Nitric oxide synthase 3 (NOS3) 4b/a, T-786C and G894T polymorphisms in association with diabetic retinopathy susceptibility: A meta-analysis. *Ophthalmic Genet* [Internet]. 2012 Dec 17;33(4):200–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22506535>
97. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2011 Feb 4;34(1):75–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814827>
98. Burda P, Schäfer A, Suormala T, Rummel T, Bürer C, Heuberger D, et al. Insights into Severe 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency: Molecular Genetic and Enzymatic Characterization of 76 Patients. *Hum Mutat* [Internet]. 2015 Jun;36(6):611–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25736335>
99. Soinio M, Marniemi J, Laakso M, Lehto S, Rönnemaa T. Elevated plasma homocysteine level is an independent predictor of coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* [Internet]. 2004 Jan 20;140(2):94–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14734331>
100. Humphrey LL, Fu R, Rogers K, Freeman M, Helfand M. Homocysteine Level and Coronary Heart Disease Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2008 Nov;83(11):1203–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990318>
101. Buysschaert M, Dramais AS, Wallemacq PE, Hermans MP. Hyperhomocysteinemia in type 2 diabetes: relationship to macroangiopathy, nephropathy, and insulin resistance. *Diabetes Care* [Internet]. 2000 Dec;23(12):1816–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128359>
102. Araki A, Sako Y, Ito H. Plasma homocysteine concentrations in Japanese patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus: effect of parenteral

- methylcobalamin treatment. *Atherosclerosis* [Internet]. 1993 Nov;103(2):149–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8292092>
103. Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Harris SB, Hanley AJG, Hegele RA. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2005 Nov 7;4:17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274479>
104. Sun J-Z, Xu Y, Lu H, Zhu Y. Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene association with homocysteine and ischemic stroke in type 2 diabetes. *Neurol India* [Internet]. 2009;57(5):589. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934557>
105. Zhang D, Zhou Y, Han L, Ji H, Li J. The effect of MTHFR C677T polymorphism on type 2 diabetes mellitus with vascular complications in Chinese Han population: a meta-analysis. *Endocr J* [Internet]. 2014;61(7):717–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24838050>
106. Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism, homocysteine and risk of macroangiopathy in Type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* [Internet]. 2006 Oct 29;29(9):814–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114913>
107. Hermans MP, Gala J-L, Buyschaert M. The MTHFR C677T polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes. *Diabet Med* [Internet]. 2006 May;23(5):529–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16681562>
108. Zhao M, Wang X, He M, Qin X, Tang G, Huo Y, et al. Homocysteine and Stroke Risk. *Stroke* [Internet]. 2017 May;48(5):1183–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28360116>
109. Wilcken DE, Wang XL, Sim AS, McCredie RM. Distribution in healthy and coronary populations of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1996 Jul;16(7):878–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673563>
110. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic

polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. A case-control study. *Circulation* [Internet]. 1996 Oct 15;94(8):1812–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8873653>

111. Verhoef P, Kok FJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, Refsum H, Ueland PM, et al. The 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: associations with plasma total homocysteine levels and risk of coronary atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* [Internet]. 1997 Jul 11;132(1):105–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9247365>
112. van Bockxmeer FM, Mamotte CDS, Vasikaran SD, Taylor RR. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. *Circulation*. 1997;95(1):21–3.
113. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* [Internet]. 1996 Dec 15;94(12):3074–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989110>
114. Bentley P, Peck G, Smeeth L, Whittaker J, Sharma P. Causal Relationship of Susceptibility Genes to Ischemic Stroke: Comparison to Ischemic Heart Disease and Biochemical Determinants. Gwinn K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Feb 9;5(2):e9136. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009136>
115. Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1 in Caucasian patients with non- insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost* [Internet]. 1995 Sep;74(3):842–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571308>
116. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades Cardiovasculares [Internet]. 2015. Available from: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [Cited 2018 July 12].
117. Thrombosis Adviser. Introduction to coronary artery disease [Internet]. 2017. Available from: <https://www.thrombosisadviser.com/coronary-and-peripheral-artery-disease/> [Cited 2018 July 12].

118. Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: a neglected, understudied, and underused concept. *Neurology* 1989; 39:1246.
119. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke. In: *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*, 4th ed, Saunders Elsevier, Philadelphia 2009. p.22.
120. National Center for Biotechnology Information. SERPINE1 serpin family E member 1 [Homo sapiens (human)] [Internet] 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=rs1799889> [Cited 2018 July 12]
121. National Center for Biotechnology Information. MTHFR methylenetetrahydrofolate reductase [Homo sapiens (human)] [Internet] 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>. [Cited 2018 July12].
122. National Center for Biotechnology Information. NOS3 nitric oxide synthase 3 [Homo sapiens (human)] [Internet] 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846> [Cited July April 12]
123. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013 Jul;34(28):2159-219.
124. Garvey WT, Garber AJ, Mechanick JI, Bray GA, Dagogo-Jack S, Einhorn D, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology position statement on the 2014 advanced framework for a new diagnosis of obesity as a chronic disease. *Endocr Pract*. 2014 Sep;20(9):977-89.
125. Ministry of Health – Manatū Hauora. New Zealand Government. Definitions of smoking status. [Internet] 2015. Available from: <https://www.health.govt.nz/our-work/preventative-health-wellness/tobacco-control/tobacco-control-guidance-practitioners/definitions-smoking-status>. [Cited 2018 July 12]
126. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. *Endocr Pract*. 2017 Apr;23(Suppl 2):1-87.

127. Organización Mundial de la Salud. Obesidad. [Internet] 2018. Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/es/>
128. Rana JS, Liu JY, Moffet HH, Jaffe M, Karter AJ. Diabetes and prior coronary heart disease are not necessarily risk equivalent for future coronary heart disease events. *J Gen Internal Med.* 2016;31(4):387–93.
129. Pan A1, Wang Y2, Talaei M2, Hu FB3, Wu T4. Relation of active, passive, and quitting smoking with incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015 Dec;3(12):958-67. doi: 10.1016/S2213-8587(15)00316-2.
130. Liyou N, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, O’Shaughnessy K, Davis D, Johnson A. Coronary artery disease is not associated with the E298D variant of the constitutive, endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Genet.* 1998;54:528–9.
131. Andrikopoulos GK, Grammatopoulos DK, Tzeis SE, Zervou SI, Richter DJ, Zairis MN, Gialafos EJ, Sakellariou DC, Foussas SG, Manolis AS, Stefanadis CI, Toutouzas PK, Hillhouse EW. GEMIG study investigators. Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC Med Genet.* 2008;9:43.
132. Ragia G, Nikkolaidis E, Tavridou A, Arvanitidis KI, Kanoni S, Dedoussis GV, Ougioukas G, Manolopoulos VG. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms – 786 T>C and 894 G>T in coronary artery bypass graft surgery patients. *Hum Genomics.* 2010;4:375–83.
133. Dzida G, Biłan A, Golon-Siekierska P, et al. [Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with type 2 diabetes]. *Pol Arch Med Wewn* 2001; 106: 543–549.
134. Benes P, Kanková K, Muzík J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, type II diabetes mellitus, coronary artery disease, and essential hypertension in the Czech population. *Mol Genet Metab* 2001; 73: 188–195.
135. Hu S, Gan P, Li J, et al. [The relationship between the mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C→T and the diabetic

- microangiopathy]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001;18: 118–121.
136. Niu W and Qi Y. An updated meta-analysis of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C/T polymorphism with diabetic nephropathy and diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 95: 110–118.
137. Böger CA, Stubanus M, Haak T, et al. Effect of MTHFR 677 C>T genotype on survival in type 2 diabetes patients with end-stage diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 154–162.
138. Wirta V, Huang XH, Wirta O, et al. Mutation 677 C>T of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with coronary artery disease, but possibly with albuminuria, in type 2 diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 625–628.
139. Brulhart MC, Dussoix P, Ruiz J, et al. The (Ala-Val) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase as a genetic risk factor for vascular disease in non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 228–229.

ANEXO 1. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

Se extrajeron aproximadamente 16ml de sangre total de la vena antecubital, los cuales se colectaron en 2 tubos con EDTA, 2 con citrato de sodio y 2 con gel separador o sin anticoagulante. De forma inmediata se centrifugaron las muestras a 2500 g (fuerza centrífuga relativa) durante 15 minutos. Posteriormente, la capa superior (plasma) se retiró cuidadosamente tratando de no perturbar la siguiente capa, en donde se localiza el contenido de células mononucleares (buffy coat), la cual se transfirió con una pipeta de transferencia de plástico estéril a un tubo eppendorf de 1.5mL libre de enzimas (RNasas y DNasas). Finalmente el contenido eritrocitario se desechó en un contenedor destinado para material infectocontagioso (residuos peligrosos).

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó un kit comercial de la marca Qiagen (QIamp DNAMini Kit, Hilden Alemania) de acuerdo a las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el DNA se procedió a su conservación en un ultracongelador a -70°C hasta su utilización para la amplificación de los segmentos correspondientes.

Calidad del DNA

Mediante espectrofotometría se determinó la pureza del DNA considerando la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . Se consideró un valor de pureza aceptable la relación de al menos $260/280 > 1.6$ y $A_{260}/230 < 1.5$. La integridad del DNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%.

Para la determinación de los diferentes genotipos de los polimorfismos de interés se utilizó la técnica PCR-RFLP (ver descripción en manual de procedimientos).

Determinación de los diferentes polimorfismos

Genotipificación del polimorfismo 4G/5G: Posterior a la extracción de ADN, se lleva

a cabo la reacción de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (sentido) 5'-CACAGAGAGAGTCTGGCCACGT-3' (sense) y 5'-CCAACAGAGGACTCTTGGTCT-3' (antisense).

La amplificación se realiza en un volumen final de 50 µl, 0,06 mol de cada nucleótido, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1,5 mmol de MgCl₂ y 0,1 mmol de cada dNTP (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C de 30 s, una alineación a 60 por 30 s, y una extensión a 72 °C por 30 s), seguidos de una extensión lineal por 1 min a 72 °C. Se obtiene un producto amplificado de 99 pb (5G) y 98 pb (4G). El producto es restringido mediante la adición de 1 U de la enzima específica Bsl I (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos) a 25 µl del producto amplificado e incubado a 55 °C para asegurar su completa restricción.

Identificación de fragmentos polimórficos: Una vez amplificado el producto, se procede a su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 2%, y es posteriormente teñido con bromuro de etidio a una concentración de 1 ng/ml. Se visualiza usando un transiluminador de luz ultravioleta cuya imagen es grabada en un film y cada paciente es clasificado en uno de los tres genotipos: 4G/4G, 4G/5G o 5G/5G.

Genotipificación del polimorfismo G894T de la enzima sintetasa del óxido nítrico: Posterior a la extracción de ADN, se lleva a cabo la reacción de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (sentido) 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' y (contrasentido) 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGGTCAC-3', así como el uso de 200ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP, 3 mM de cloruro de magnesio, 1.0 U de pfu DNA polimerasa, en un volumen final de 50UI. Las condiciones térmicas consistirán en desnaturalización a 94°C por 30 seg., alineación a 60°C por 30 seg. y una extensión a 72°C por 30 seg., por 30 ciclos.

Identificación de fragmentos polimórficos: El producto de la PCR es sometido en partes iguales a digestión con las enzimas de restricción BanII y MboI respectivamente por 16 h a 37°C. El producto obtenido de 206pb bajo la acción de la enzima BanII produce dos fragmentos uno 124pb y uno menor de 82pb en la presencia de un nucleótido G en la posición 894 (correspondiendo al alelo Glu298), mientras que en la segunda reacción el mismo producto de 206pb con la enzima MboI generará dos fragmentos uno 119bp y uno de 87pb en la presencia de un nucleótido de T en la misma posición 894 el cual corresponde a un alelo Asp 298. Los productos obtenidos de la restricción son visualizados en un gel de agarosa al 2.5% y teñido con bromuro de etidio. El resultado se clasifica como CC, CG, o GG.

Genotipificación del gen C677T de la enzima Metilen-tetrahidrofolato reductasa. Posterior a la extracción de ADN, se lleva a cabo la reacción de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (sentido) 5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3) y (contrasentido) 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), así como el uso de 200ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP, 3 mM de cloruro de magnesio en un volumen final de 50 μ l y 1.0 U de pfu ADN polimerasa. Las condiciones térmicas consisten en desnaturalización a 94°C 94 ciclos, alineación a 62°C por 20 seg, y extensión a 72°C por 20 seg.

Identificación de fragmentos polimórficos: El producto del PCR se somete a la acción de la enzima HinfI por 16 horas a 37° C. Los productos obtenidos de la digestión se visualizan en un gel de agarosa al 2.5% y teñidos con bromuro de etidio. Cada paciente se clasifica en uno de los tres genotipos CC, CT, TT.

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta Dictamen Página 1 de 1



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorización

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD NÚM. 3609

FECHA 17/05/2010

Estimado Irma Lourdes Salas

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarte que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, con título es:

FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE UN ESTADO PROTROMBÓTICO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

Fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideramos que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de **AUTORIZADO**.

Veredicto asignado el siguiente número de registro institucional:

No. de Registro
N-2010-3609-S

[Firma manuscrita]

Dr. Carlos Alberto Castillo Herrera
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm. 3609

Empresario

IMSS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

http://sirelcia.cis.gob.mx/pl_dictamen_cis.php?idProyecto=2010-1570&id... 17/05/2010

**ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO
INFORMADO**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y
POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio: "FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON Y SIN COMPLICACIONES MACROVASCULARES"

Patrocinador externo (si aplica): N/A

Lugar y fecha:

Número de registro:

Justificación y objetivo del estudio: Lo invitamos a participar en el estudio "FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE UN ESTADO PROTROMBÓTICO EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2" el cual se llevará a cabo en el servicio de Medicina Interna y en la Unidad de Investigación en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del HGR 1 Dr Carlos MacGregor Sánchez.

Debido a que la diabetes es una enfermedad muy frecuente en nuestro país y puede ocasionar complicaciones como infartos del corazón, embolias, derrames cerebrales, amputaciones de los pies, consideramos importante investigar sobre las diferentes causas que pueden influir en que los pacientes tengan estas complicaciones. Una de las causas que se ha estudiado muy poco en nuestro país es la parte genética (los genes son como el mapa de instrucciones de nuestro cuerpo que pueden decir el tipo de color de ojos que tendrá alguien, cuanto crecerá, etcétera y también causar variaciones en las funciones de algunas sustancias del cuerpo como la formación de coágulos en la sangre). Estas variaciones genéticas o polimorfismos los tenemos desde el nacimiento y en ocasiones nos pueden dar información extra acerca de diferentes enfermedades. En este estudio investigaremos algunas variantes genéticas relacionadas con la formación de coágulos en la sangre.

Procedimientos: Si usted acepta participar en el estudio sucederá lo siguiente:

Al ir a su consulta de Medicina Interna se le invitará a participar en el estudio y se registrará su nombre y teléfono.

Se le dará una cita para acudir a la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis que está ubicada en el sótano del Hospital HGR 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez.

El día de su cita se le harán algunas preguntas acerca de su enfermedad y datos personales

Se le tomará la presión arterial, se pesará, se medirá su altura y su cintura

Se le tomará una muestra de sangre del brazo (aproximadamente 4 tubos pequeños de laboratorio o 15ml o 3 cucharaditas).

El estudio completo tardará aproximadamente 40 minutos.

Debido a que continuamente se descubren genes y sustancias en la sangre que ayudan a estudiar más a fondo las enfermedades, si usted lo permite, la muestra de sangre que se obtenga en este estudio puede utilizarse en estudios futuros (en los próximos 10 años) en los cuales no se realizarán ningún tipo de cultivos de líneas celulares inmortales.

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

ANEXO 3. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

‘FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN PACIENTES MEXICANOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 CON Y SIN COMPLICACIONES MACROVASCULARES’

FECHA		# MUESTRA			
NOMBRE					
No. AFILIACION					
LUGAR DE ORIGEN		OCUPACION		E.CIVIL	
FECHA NACIMIENTO		EDAD		SEXO	
TELEFONO/CONTACTO				ESCOLARIDAD	
TABAQUISMO		ETILISMO		CANTIDAD:	
PESO		TALLA		IMC	
C. CINTURA		C. CADERA		ACTIVIDAD FISICA	
TA 1A		2A		3A	
PROMEDIO					
ANTECEDENTES FAMILIARES					
ANCESTRIA MEXICANA (2 GENERACIONES):				SI NO	
ANTECED FAMILIARES DM2		SI NO		ANTECED FAMILIARES HAS	
¿QUIEN?		¿QUIEN?			
ANTECEDENTE FAMILIAR DE ENF CARDIOVASCULAR (Hombres <55, mujeres <65)		IAM		EVC	
ENF ARTERIAL PERIFERICA					
¿QUIEN?					
ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS					
DIABETES		SI NO		TIEMPO DE EVOLUCION	
TRATAMIENTO					
HAS		SI NO		TIEMPO DE EVOLUCION	
TRATAMIENTO					
CARDIOPATIA ISQUEMICA		SI NO		FECHA	
DETALLES					
EVC/AIT		SI NO		FECHA	
DETALLES					

ENF ARTERIAL PERIFERICA	SI	NO	FECHA	
DETALLES				

FIBRILACION AURICULAR	SI	NO	ARTRITIS REUMATOIDE	NO
DETALLES				
ERC (4 o 5)	SI	NO	FECHA	
DETALLES				
DISLIPIDEMIA	SI	NO	FECHA	
OTRAS ENFERMEDADES				
OTROS TRATAMIENTOS	(AAS) (ACO)			

ESTUDIOS DE LABORATORIO					
GLUCOSA		HBA1C		COLESTEROL TOTAL	
HDL		LDL		VLDL	
				TG	
AC URICO					
CREATININA		TFG		ALBUMINURIA	
FIBRINOGENO			HEMOGLOBINA	HEMATOCRITO	
LEUCOCITOS		PLAQUETAS			

OTROS					
-------	--	--	--	--	--

POLIMORFISMO 4G/5G EN EL GEN DEL PAI-1 (GENOTIPO)					
4G/4G		4G/5G		5G/5G	

CONCENTRACION PLASMATICA DE PAI-1					
-----------------------------------	--	--	--	--	--

GEN DE LA ENZIMA SINTETASA DEL ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) (GENOTIPO)					
--	--	--	--	--	--

GLU/GLU		GLU/ASP		ASP/ASP	
---------	--	---------	--	---------	--

7T EN EL GEN DE LA ENZIMA 5,10 MTHFR (GENOTIPO)					
---	--	--	--	--	--

C/C		C/T		T/T	
-----	--	-----	--	-----	--

