



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Biología Molecular.
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

**Estudio de asociación de los polimorfismos
de los genes que codifican para subunidades
p40 de la IL-12 y p19 de la IL-23 en individuos
con enfermedad arterial coronaria prematura.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA
CHRISTIAN ALEJANDRO VÁZQUEZ VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Facultad de Medicina, UNAM

COMITÉ TUTOR

Dr. Edmundo De Ibis Lamoyi Velázquez
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM

Dr. Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos
Facultad de Medicina, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

DICIEMBRE DE 2022



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.

Reconocimientos

Christian Alejandro Vázquez Vázquez, recibió beca de CONACYT (No. 208144).

A Dr. Gilberto Vargas Alarcón, por la guía y revisión de todo el trabajo realizado durante el doctorado.

A los miembros del comité tutor, los doctores Edmundo De Ibis Lamoyi Velázquez y Joaquín Alejandro Zúñiga Ramos, por todas sus propuestas y revisiones semestre con semestre del trabajo de investigación.

A la Dra. Rosalinda Posadas Sánchez del Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología, por el asesoramiento y apoyo brindado en los análisis de polimorfismos y variables clínico-demográficas.

A la Dra. Nonanzit Pérez Hernández de Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología, por el asesoramiento y apoyo brindado en el análisis de polimorfismos en PCR de tiempo real.

Al jurado asignado, por la revisión y correcciones realizadas al presente trabajo.

Tabla de contenido

Reconocimientos	ii
Acrónimos.....	v
Índice de tablas.....	viii
Índice de figuras.....	ix
Resumen	x
Abstract.....	xii
Introducción.....	1
I. MARCO TEÓRICO	1
1. Epidemiología.....	1
2. Etiología e inmunología de la enfermedad arterial coronaria	1
3. Factores de riesgo de la enfermedad arterial coronaria.....	6
4. Genética de la enfermedad arterial coronaria.....	7
II. ANTECEDENTES	9
1. Familia de la interleucina 12.....	9
a. Interleucina 12.....	10
b. Interleucina 23.....	10
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
Materiales y Métodos	15
1. Población de estudio	15
2. Recolección de datos demográficos	16
3. Mediciones antropométricas	16
4. Análisis bioquímico	16
Estudio de tomografía axial computarizada	17
Análisis genético	18
Aspectos éticos	19
Análisis estadístico	19
Resultados	21
Discusión	32
Conclusiones	37

Perspectivas	37
Referencias	38
Anexos	53

Acrónimos

°C:	Grado celsius
ADN:	Ácido desoxirribunucleico
ALT:	Alanina aminotransferasa
ANCOVA:	Análisis de covarianza
ANOVA:	Análisis de varianza
APC:	Antigen Presenting Cells o Células Presentadoras de Antígeno
ApoA1:	Apolipoproteína A1
ApoB:	Apolipoproteína B
ARNm:	Ácido Ribonucleico mensajero
AST:	Aspartato aminotransferasa
BAFFR:	B-cell activating factor receptor o Receptor del factor activador de células B
C no HDL:	Colesterol no HDL
C/EBP β :	CCAAT/enhancer-binding protein beta
CAC:	Calcificación arterial coronaria
CD:	Cluster of differentiation o grupo de diferenciación
CDC:	Centers for Disease Control o Centro de control de enfermedades
C-HDL:	Colesterol unido a proteínas de alta densidad
C-LDL:	Colesterol unido a proteínas de baja densidad
CML:	Célula muscular lisa
CT:	colesterol total
CTLA-4:	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 o antígeno 4 del linfocito citotóxico
D':	Desequilibrio de ligamiento
dL:	decilitro
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2
EAC:	Enfermedad Arterial Coronaria
EACp:	Enfermedad Arterial Coronaria prematura
EBI3:	Epstein-Barr Induced 3 o Proteína 3 inducida por el virus Epstein-Barr
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase o proteína cinasa regulada por señales celulares externas
ERO:	Especies reactivas de oxígeno
EUA:	Estados Unidos de América
FAM:	Frecuencia del alelo menor

FOXP3: Forkhead box P3 o Proteína P3 de cabeza de tenedor

GAS: Grasa Abdominal subcutánea

GAV: Grasa abdominal visceral

G-CSF: Granulocyte colony-stimulating factor o Factor estimulante de las colonias de granulocitos

GEA: Genética de la Enfermedad Aterosclerosa

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor o factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos

GWAS: Genome Wide Association Study o estudio de asociación de genoma completo

HOMA-RI: Homeostatic model assessment of insulin resistance o Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina

HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium o Equilibrio de Hardy-Weinberg

IC: Intervalo de confianza

ICAM1: intercelular adhesion molecule o molécula de adhesión intercelular 1

IgM: Inmunoglobulina M

IL: Interleucina

IL-12R β 1: Receptor beta 1 de la interleucina 12

IL-23R: Receptor de interleucina 23

IMC: Índice de masa corporal

INCICH: Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

INF: Interferón

iNK: Invariant natural killer cells o Células asesinas naturales invariantes

IRF: Interferon regulatory factor o Factor regulador de interferon

iTreg: Células Treg inducibles

IU: Unidades internacionales

K₂EDTA: Etilen diaminotetracético dipotásico

kDa: kilo Daltones

LDL: Por sus siglas en inglés de Low Density Lipoprotein o lipoproteínas de baja densidad.

MA: Molécula de adhesión

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimioatrayente de monocitos 1

M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor o factor estimulante de colonias de macrófagos

MEE: Membrana elástica externa

MEI: Membrana elástica interna

mg: miligramo

MHC: Major Histocompatibility Complex o Complejo Principal de Histocompatibilidad

mL: mililitro

mM: milimolar

MMP-1: Matrix metalloproteinase 1 o metaloproteínasa de matriz 1

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells o Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kapa de las células B

NK: Natural killer cells o células asesinas naturales

nTreg: Células Treg naturales

OR: Odds ratio o Razón de momios

Ox-LDL: LDL oxidadas y/o modificadas

PCR: Proteína C reactiva

PECAM1/CD31: Platelet endothelial cell adhesion molecule

r^2 : Razón de recombinación

RI: Resistencia a la insulina

ROR γ T: Retinoic Acid-related Orphan Receptor gamma T o Receptor huérfano gama T relacionado con el ácido retinóico

SNP: Single nucleotide polymorphism o polimorfismo de un sólo nucleótido

SR: Scavenger receptor o receptor carroñero

STAT2: Signal transducer and activator of transcription 2 o Transductor de señal y activador de la transcripción 2

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3 o Transductor de señal y activador de la transcripción 3

T-bet: Factor de transcripción T box expresado en células T

TCR: T cell receptor o Receptor de células T

TG: Triglicéridos

TGF- β : Transforming Growth Factor beta o Factor de crecimiento transformante beta

Th: T helper cells o células T cooperadoras

TNF: Tumor Necrosis Factor o Factor de necrosis tumoral

Tr1: Reguladores de células T de tipo 1

Treg: Células T reguladoras

UTR: Untranslated region o Región no traducida

VCAM: Vascular cell adhesion molecule o molécula de adhesión celular vascular

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Sitios polimórficos del gen IL-23A (p19) que serán analizados por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 2. Sitios polimórficos del gen IL-12B (p40) que serán analizados por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 3. Características demográficas, clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovascular de los sujetos estudiados.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4. Asociación de los polimorfismos del gen IL-23A con EACp.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 5. Asociación de los polimorfismos del gen IL-23A con la presencia de parámetros cardiometabólicos en pacientes con EACp.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabla 6. Asociación del polimorfismo rs11171806 del gen IL-23A con la presencia de parámetros cardiometabólicos en individuos control.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 7. Asociación de los haplotipos del gen IL-23A con la presencia de EACp.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 8. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en los sujetos estudiados.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 9. Asociación de los polimorfismos del gen IL-12B y la EACp.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 10. Asociación de los polimorfismos del gen IL-12B con la presencia de parámetros cardiometabólicos en individuos control.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 11. Asociación de los polimorfismos del gen IL-12B con la presencia de parámetros cardiometabólicos en pacientes con EACp.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabla 12. Frecuencia de los haplotipos del gen IL-23A en pacientes con EACp e individuos control.</i>	<i>31</i>

Índice de figuras

- Fig. 1. Ilustración esquemática de la progresión de la aterosclerosis. A.- Las LDL en el flujo sanguíneo pasan a través del endotelio dañado; causado por factores como hipertensión, colesterol elevado, hipertrigliceridemia y hábitos como fumar; hacia la túnica íntima. B.- Las células endoteliales dañadas expresan moléculas de adhesión que capturan monocitos. C.- Los monocitos entran dentro de la túnica íntima produciendo radicales libres que oxidan a las LDL presentes. D.- Las LDL oxidadas y/o modificadas, atraen más monocitos y más células inmunes al sitio. E.- los macrófagos derivados de monocitos engullen las partículas de Ox-LDL sobrecargándose y convirtiéndose en células espumosas. Las células espumosas mueren liberando su contenido que perpetua el ciclo de consumo por parte de los macrófagos lo que resultará, eventualmente, en el desarrollo de un área lesionada grande. F.- Una vez llegados a este punto, la lesión se convierte en lo que se llama placa aterosclerosa que gradualmente acumula sales de calcio, células musculares lisas (proveniente de la túnica media), colágeno y las células espumosas. G.- La placa es estable debajo del endotelio vascular hasta que este último se ve comprometido. Entonces, el endotelio dañado no puede producir más inhibidores de la coagulación haciéndolo más susceptible a la generación de un coágulo. H.- Al desencadenarse la generación de un coágulo sanguíneo en la zona de la placa, se puede desarrollar un trombo en el vaso dañado causando, en consecuencia, un infarto cardiaco. CML, célula muscular lisa; ERO, especies reactivas de oxígeno; LDL, lipoproteína de baja densidad (por las siglas en inglés de **L**ow **D**ensity **L**ipoprotein); Ox-LDL, LDL oxidadas y/o modificadas; MA, molécula de adhesión; MEE, membrana elástica externa; MEI, membrana elástica interna. Modificado de (32).* _____ 3
- Fig. 2. Desequilibrio de ligamiento (D' y r^2) del gen IL-23A (subunidad p19). Se muestran los dos polimorfismos de un solo nucleótido genotipados del gen de la IL-23A. Figura creada en Haploview 4.2. La parte superior de la figura muestra dónde se encuentran localizados los polimorfismos dentro del gen IL-23A, la parte inferior muestra los valores de desequilibrio de ligamiento (D') y razón de recombinación (r^2) calculados.* _____ 25
- Fig. 3. Gráfico de desequilibrio de ligamiento de haplotipos del gen IL-12B. Los coeficiente de desequilibrio de ligamiento pareado D' y r^2 se muestran en cada celda. En el haplotipo, el orden de los polimorfismos está de acuerdo a su posición en el cromosoma.* _____ 31

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son responsables en promedio de 17.8 millones de muertes en todo el mundo. La enfermedad arterial coronaria (EAC) cuya causa subyacente es la aterosclerosis, es una enfermedad crónica y multifactorial con fuerte componente inflamatorio. En su desencadenamiento participan factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista genético, diversos estudios han investigado la asociación entre la EAC y polimorfismos en genes que codifican para citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. A pesar de más de 20 años de esfuerzos con respecto a las asociaciones de polimorfismos genéticos de citocinas con EAC, queda mucho trabajo por hacer para aclarar la interacción entre polimorfismos genéticos y la EAC. El objetivo del presente trabajo fue establecer, si los polimorfismos de los genes que codifican para las subunidades p40 y p19 de las interleucinas 12 y 23 se asocian con el desarrollo de EAC o con algún parámetro clínico o metabólico relacionado con esta patología. Lo anterior se evaluó en individuos perteneciente a la población mestizo-mexicana del estudio GEA del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Para el estudio de los polimorfismos del gen *IL-12B*, se incluyó a 2163 personas (1133 pacientes con EAC prematura y 1030 controles sin EAC). Se genotiparon siete polimorfismos de *IL-12B* (rs1363670, rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694 y rs1368439) mediante ensayos TaqMan. Las asociaciones se evaluaron mediante regresión logística utilizando diferentes modelos de herencia ajustados por variables de confusión. El rs1363670 se asoció significativamente con un riesgo bajo de EACp (OR = 0,718, $p_{\text{dominante}} = 0,034$; OR = 0,701, $p_{\text{heterocigoto}} = 0,024$; OR = 0,702, $p_{\text{codominante1}} = 0,025$). La asociación de los polimorfismos con factores de riesgo cardiovascular se evaluó de forma independiente en cada grupo. En los controles, los polimorfismos rs3212227, rs3212220 y rs6887695 se asociaron con grasa abdominal subcutánea > p75, mientras que rs6887695 se asoció con un alto riesgo de obesidad central. En pacientes con EACp, el rs2853694 se asoció con un bajo riesgo de resistencia a la insulina; y se encontró asociación de rs3212227 y rs3212220 con un riesgo bajo de síndrome metabólico, y el polimorfismo rs6887695 se asoció nominalmente con un riesgo alto de hiperuricemia. En conclusión, el polimorfismo rs1363670 del gen *IL-12B* se asoció con un riesgo bajo de EACp, y tanto en pacientes con EACp como en controles sanos, algunos polimorfismos del gen *IL-12B* se asociaron con factores de riesgo cardiovascular.

Para el gen *IL-23A* se evaluó la asociación de dos polimorfismos. El rs11171806 (ubicado en el exón 3) y rs2066808 (ubicado en la región 3'UTR) con la presencia de EACp y con parámetros cardiometabólicos. El estudio incluyó 2249 individuos mexicanos (1160 con EACp y 1089 controles

sanos sin EAC). Utilizando modelos recesivos y codominantes, ajustados por variables de confusión, encontramos que el polimorfismo rs2066808 aumenta el riesgo genético de EAC prematura (OR = 4.567, IC 95%: 1.03-20.24, $p_{\text{recesivo}} = 0.046$ y OR = 4,606, IC 95%: 1,039-20,43, $p_{\text{codominante2}} = 0,044$). La asociación de los polimorfismos con factores de riesgo cardiovascular se evaluó por separado en pacientes con EAC prematura y controles sin EAC. En los pacientes, el polimorfismo rs2066808 disminuyó el riesgo genético de hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hipoalfalipoproteinemia, y aumentó el riesgo genético de hiperuricemia, mientras que el polimorfismo rs11171806 disminuyó el riesgo genético de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En controles sanos sin EAC, el polimorfismo rs11171806 disminuyó el riesgo genético de hiperinsulinemia. Estos hallazgos sugieren que el polimorfismo rs2066808 localizado cerca del gen *IL-23A* podría incrementar el riesgo genético de EACp y ambos polimorfismos estudiados podrían estar asociados con algunos parámetros cardiometabólicos en pacientes con EACp y en controles sanos.

Abstract

Cardiovascular diseases cause an average of 17.8 million deaths worldwide. Coronary artery disease (CAD) is an inflammatory disease that is the underlying cause of atherosclerosis. Epidemiological studies have investigated the association between CAD and genetic polymorphisms of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, but despite more than 20 years of efforts regarding the associations of genetic cytokine polymorphisms with CAD, much work remains to be done to clarify the interaction between genetic polymorphisms and CAD. The aim of this work was to assess whether the polymorphisms of the genes that encode for the subunits p40 and p19 of interleukins 12 and 23 are associated with CAD development or with some clinical or metabolic parameter related with CAD. The study was performed in individuals belonging to the Mexican mestizo population of the GEA study of the National Institute of Cardiology Ignacio Chávez.

For the polymorphisms of the *IL-12B* gene, the study included 2,163 people (1,133 patients with pCAD and 1,030 healthy controls without CAD). Seven *IL-12B* polymorphisms (rs1363670, rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694, and rs1368439) were genotyping by TaqMan assays, and associations were evaluated by logistic regression using inheritance models adjusted for confounding variables. The polymorphism rs1363670 was significantly associated with a low risk of pCAD (OR = 0.718, p_{dominant} = 0.034; OR = 0.701, $p_{\text{heterozygote}}$ = 0.024; OR = 0.702, $p_{\text{codominant1}}$ = 0.025). The association of polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated independently in each group. In controls, the polymorphisms rs3212227, rs3212220, and rs6887695 were associated with subcutaneous abdominal fat > p75, while rs6887695 was associated with a high risk of central obesity. In patients with pCAD, rs2853694 was associated with a low risk of insulin resistance; rs3212227 and rs3212220 were associated with a low risk of metabolic syndrome, and the rs6887695 polymorphism was nominally associated with a high risk of hyperuricemia. In conclusion, the polymorphism rs1363670 of the *IL-12B* gene was associated with a low risk of pCAD in patients with pCAD and in healthy controls, some polymorphisms of the *IL-12B* gene were associated with cardiovascular risk factors.

For the *IL-23A* gene, the association of two polymorphisms was evaluated. The rs11171806 (in exon 3) and rs2066808 (in the 3'UTR region) with the presence of pCAD and cardiometabolic parameters were also evaluated. The study included 2,249 Mexican individuals (1,160 with pCAD and 1,089 healthy controls without pCAD). Using recessive and codominant models adjusted for confounding variables, we found that the rs2066808 polymorphism increase the genetic risk of pCAD (OR = 4.567, 95% CI: 1.03-20.24, $p_{\text{recessive}}$ = 0.046 and OR = 4.606, 95% CI: 1.039-20.43, $p_{\text{codominant2}}$ = 0.044). The association of polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated

separately in patients with pCAD and healthy controls without pCAD. In patients, the rs2066808 polymorphism decreases the genetic risk of hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypoalphalipoproteinemia, and increase the genetic risk of hyperuricemia, while the rs11171806 polymorphism decreases the genetic risk of hyperinsulinemia and insulin resistance. In healthy controls, the rs11171806 polymorphism decreases the genetic risk of hyperinsulinemia. These findings suggest that the rs2066808 polymorphism located near the *IL-23A* gene can increase the genetic risk of pCAD and both polymorphisms studied could be associated with some cardiometabolic parameters in patients with pCAD and in healthy controls.

Introducción

I. MARCO TEÓRICO

Enfermedad arterial coronaria.

Las enfermedades cardiovasculares consisten en un grupo de enfermedades que afectan a las arterias que suministran sangre al corazón, cerebro y regiones periféricas del cuerpo (1). La enfermedad arterial coronaria (EAC) es un importante subgrupo de enfermedades cardiovasculares que requiere un diagnóstico oportuno y preciso.

1. Epidemiología

Se estima que las enfermedades cardiovasculares son responsables de 17.8 millones de muertes a nivel mundial, de las cuales, el 75% suceden en países de ingresos medios y bajos (2), correspondiendo a 330 millones de años de vida perdidos y otros 35,6 millones de años vividos con discapacidad (3). En México, según los datos más recientes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía la EAC fue la principal causa de muerte en 2019 por enfermedades cardiovasculares con un total 195,266 defunciones (4). Dentro del universo de las enfermedades cardiovasculares están las enfermedades isquémicas del corazón, que son un grupo de síndromes clínicos caracterizados por una isquemia cardiaca que conlleva a un desbalance entre el suministro de sangre al miocardio y la demanda de éste (5). En México, las muertes por enfermedades isquémicas fueron 113,653 en 2019 correspondientes al 58.2% del total de enfermedades del sistema circulatorio (4), por lo que representaron, por si solas, la segunda causa de muerte en México.

La causa principal de la isquemia al miocardio es la reducción de flujo sanguíneo debido a la EAC, una enfermedad isquémica del corazón (6). La EAC, es una enfermedad ampliamente estudiada tanto a nivel mundial como en México ya que es una enfermedad que acarrea un costo elevado tanto social como económico (7). Esta enfermedad se desarrolla cuando las arterias coronarias que proveen de sangre, oxígeno y nutrientes al corazón se obstruyen por depósitos de colesterol y otros detritos celulares, esto hace que se estrechen, disminuyendo el flujo sanguíneo al corazón (8). Eventualmente, este decremento en el flujo sanguíneo causa condiciones clínicas que son manifestadas como dolor de pecho, conocido como angina, falta de aire u otros signos y síntomas de la enfermedad (9).

2. Etiología e inmunología de la enfermedad arterial coronaria

El mecanismo subyacente de la EAC es la aterosclerosis, la cual está caracterizada por la acumulación de lípidos y elementos fibrosos en los grandes vasos (10). La aterosclerosis ha sido reconocida como una enfermedad inflamatoria progresiva crónica, que sucede en la pared arterial

(11) y que involucra mecanismos de inmunidad celular y humoral e incluye el infiltrado de leucocitos y proliferación de fibroblastos. La consecuencia final de la aterosclerosis incluye el infarto agudo de miocardio, la angina inestable, la muerte cardiaca repentina, el accidente cerebrovascular y trombosis periféricas (12).

Hay varias hipótesis acerca de cómo se inicia el proceso ateroscleroso que en su mayor parte es un proceso inmunometabólico (13). Una de las más aceptadas en la actualidad es la hipótesis del estrés oxidativo seguido de una inflamación crónica (14). De acuerdo con esta hipótesis, bajo condiciones fisiológicas normales las células mantienen una homeostasis oxido reducción que utiliza moléculas oxido reductoras, llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), como señalizadoras en muchos procesos celulares (15). En estas mismas condiciones, las lipoproteínas de baja densidad o LDL (por sus siglas en inglés de Low Density Lipoproteins) están compuestas de triglicéridos y ésteres de colesterol con una capa externa compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteína B (ApoB) que acarrea colesterol a través de la sangre (16). Sin embargo, se ha observado que al presentarse un desbalance homeostático de ERO (17) como de LDL (18) se desencadenan una serie de eventos generadores de disfunción endotelial (19). Con el endotelio disfuncional, las partículas de LDLs penetran hacia la íntima media y son oxidadas por ERO (20). En los lípidos de las lipoproteínas, la oxidación ocurre mediante el proceso de lipoperoxidación de los fosfolípidos principalmente, esto es por ser los de mayor abundancia (21). Así, la retención de las LDL en el subendotelio y su posterior modificación a Ox-LDL (LDL oxidadas y/o modificadas) induce el reclutamiento de monocitos/macrófagos, que son parte de la respuesta inmune innata, hacia la túnica íntima, donde se diferencian en macrófagos (22). La disfunción endotelial también permite la expresión de moléculas de adhesión como PECAM1/CD31 (por las siglas en inglés platelet endotelial cell adhesion molecule) (23,24), ICAM1 (intercelular adhesion molecule o molécula de adhesión intercelular 1) (25), VCAM (vascular cell adhesion molecule) (26) y quimiocinas como MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1 o proteína quimioatrayente de monocitos 1), esta última molécula produce interacción entre los monocitos circulantes y las células endoteliales (27). Posteriormente, los monocitos se diferencian a macrófagos en la íntima en respuesta al M-CSF (del inglés macrophage colony-stimulating factor) y al GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), un evento que junto con la modificación y/o oxidación de las LDL, favorece el desarrollo del llamado núcleo necrótico en la fase crónica de la aterosclerosis (28). Dentro de la respuesta inmune innata también intervienen neutrófilos y células asesinas naturales o células NK (del inglés Natural Killer) (29). Las Ox-LDL son ligandos fuertes para los receptores carroñeros (scavenger receptors en inglés) CD-36, SR-AI/II y SR-BI, que facilitan la entrada a los macrófagos (30). La fagocitosis mediada por macrófagos de estas Ox-LDL empiezan a producir diversos mediadores inflamatorios entre los que destacan el factor de necrosis tumoral (TNF por sus siglas en inglés de Tumor Necrosis Factor) que media la quimiotaxis de células B y T así como

más macrófagos dentro o cerca de la lesión, la interleucina 6, MCP-1, ICAM-1 y las selectinas endoteliales (31).

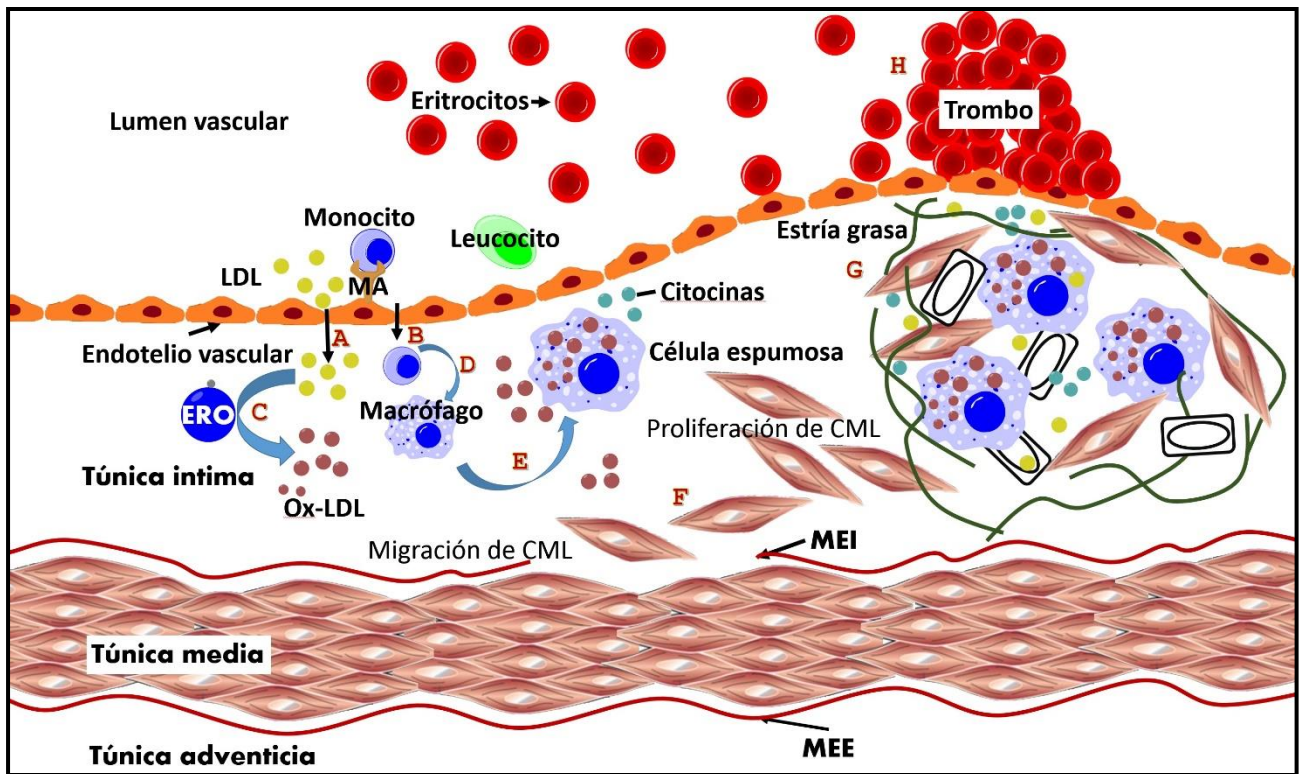


Fig. 1. Ilustración esquemática de la progresión de la aterosclerosis. **A.-** Las LDL en el flujo sanguíneo pasan a través del endotelio dañado; causado por factores como hipertensión, colesterol elevado, hipertrigliceridemia y hábitos como fumar; hacia la túnica íntima. **B.-** Las células endoteliales dañadas expresan moléculas de adhesión que capturan monocitos. **C.-** Los monocitos entran dentro de la túnica íntima produciendo radicales libres que oxidan a las LDL presentes. **D.-** Las LDL oxidadas y/o modificadas, atraen más monocitos y más células inmunes al sitio. **E.-** los macrófagos derivados de monocitos engullen las partículas de Ox-LDL sobrecargándose y convirtiéndose en células espumosas. Las células espumosas mueren liberando su contenido que perpetua el ciclo de consumo por parte de los macrófagos lo que resultará, eventualmente, en el desarrollo de un área lesionada grande. **F.-** Una vez llegados a este punto, la lesión se convierte en lo que se llama placa aterosclerosa que gradualmente acumula sales de calcio, células musculares lisas (proveniente de la túnica media), colágeno y las células espumosas. **G.-** La placa es estable debajo del endotelio vascular hasta que este último se ve comprometido. Entonces, el endotelio dañado no puede producir más inhibidores de la coagulación haciéndolo más susceptible a la generación de un coágulo. **H.-** Al desencadenarse la generación de un coágulo sanguíneo en la zona de la placa, se puede desarrollar un trombo en el vaso dañado causando, en consecuencia, un infarto cardiaco. CML, célula muscular lisa; ERO, especies reactivas de oxígeno; LDL, lipoproteína de baja densidad (por las siglas en inglés de **L**ow **D**ensity **L**ipoprotein); Ox-LDL, LDL oxidadas y/o modificadas; MA, molécula de adhesión; MEE, membrana elástica externa; MEI, membrana elástica interna. Modificado de (32).

Es importante señalar que la acumulación de las Ox-LDL dentro de los macrófagos les confiere la apariencia morfológica parecido a burbujas de jabón denominadas células espumosas que son el sello distintivo de la fase temprana de la aterosclerosis (Fig. 1) (33). Aunque la diversidad de macrófagos constituyen la porción más grande de células inflamatorias en la placa ateromatosa

(34), los linfocitos T y B, células consideradas como parte de la respuesta inmunitaria adaptativa, tienen un papel crucial en el desarrollo de la placa aterosclerosa (35). Se ha observado que todos los subtipos de células T, que son los CD4⁺, CD8⁺, NK y las foliculares cooperadores T, han sido identificadas en placas ateromatosas humanas (36).

En las lesiones aterosclerosas tempranas, la fase de respuesta inmune innata en la EAC es rápidamente seguida de una respuesta inmune adaptativa y la generación de antígenos que serán procesados por las células presentadoras de antígenos y presentados a linfocitos T efectores (37). Las células T CD4⁺ vírgenes se pueden diferenciar en varios subtipos de células T cooperadoras (Th por las siglas en inglés de T helper) incluidas las Th1, Th2, Th9 Th17 y T reguladoras (Treg) (38). La variedad de citocinas expresadas en el ambiente de la placa aterosclerosa contribuye a la polarización de las células Th en los diversos subtipos. Los linfocitos Th1 son más abundantes que los linfocitos Th2 en las placas aterosclerosas (39). La diferenciación de las células Th1 ocurre como resultado de la activación del factor de transcripción T box expresado en células T (T-bet) bajo la influencia de diferentes estímulos, incluidos los estímulos mediados por las interleucinas (IL)-12 e IL-18, que son producidas por macrófagos activados (40). Interferón γ (INF γ), una citocina expresada por las células Th1 puede promover el desarrollo y progresión de las placas aterosclerosas (41). Se ha mostrado que se puede promover la progresión de aterosclerosis mediante la estimulación de la producción de IFN γ mediada por IL-12 junto con IL-18 (42).

Se ha establecido que los linfocitos Th2 tienen un papel anti ateroscleroso, este papel lo llevan a cabo neutralizando los efectos del IFN γ mediante producción de las citocinas IL-5, IL-13 e IL-14 (43). Hay estudios específicos que muestran que la IL-4 reduce la expresión de CD36 (grupo de diferenciación o cluster of differentiation por sus siglas en inglés) (44), VCAM-1 (45), MCP-1 (46), MMP-1 (metaloproteinasa de matriz 1 por sus siglas en inglés de matrix metalloproteinase 1) (47), y la clase A de receptores carroñeros (48), inhibiendo así el desarrollo de aterosclerosis. También se ha reportado que la IL-5 puede estimular a los linfocitos B para producir anticuerpos IgM contra las Ox-LDL (49).

La expresión de IL-6, TGF- β (factor de crecimiento transformante β o Transforming Growth Factor β por sus siglas en inglés), IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3 o Signal Transducer and Activator of Transcription 3 por sus siglas en inglés) y el receptor huérfano γ T relacionado con el ácido retinoico ROR γ T (por sus siglas en inglés de retinoic acid-related orphan receptor γ T) polariza los linfocitos Th al fenotipo Th17 (50). Los seis diferentes miembros de la familia de la interleucina 17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F) activan las rutas de señalización ERK1/2, NF- κ B, C/EBP β (por sus siglas en inglés de CCAAT/enhancer-binding protein β) y C/EBP δ en varias células que son blanco de su acción,

tales como células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y células Th1 (51), teniendo como consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias como $\text{IFN}\gamma$ (52), $\text{IL-1}\beta$, TNF y el factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés de Granulocyte colony-stimulating factor) (53,54).

La diferenciación de las células Th hacia células Treg está regulado por la IL-10, $\text{TGF-}\beta$ (55) y por las células dendríticas activadas vía TLR $\text{CD}_{11c}+$ $\text{CD}_{103}+$ (CD) (56). Las células Treg son consideradas como directoras negativas de las células inmunes efectoras. Diferentes fenotipos de células Treg tienen varios papeles críticos en la aterosclerosis.

Las células Treg naturales (nTreg) expresan CD25 (IL-2R), CD4 y FOXP3 (por sus siglas en inglés de forkhead box P3 o la proteína P3 de la caja cabeza de tenedor). Las células nTreg poseen TCR (por las siglas en inglés de T cell receptor o receptor de células T) con gran afinidad para auto antígenos y son capaces de controlar negativamente la respuesta inmune a través de la expresión de las citocinas IL-10 y $\text{TGF-}\beta$ (57).

Las células Treg inducibles (iTreg) comprenden reguladores de células T de tipo 1 (Tr1) y células Th3. Las células iTreg son $\text{CD4}+$ $\text{CD25}+$ y no necesitan la expresión de FOXP3 para ser funcionales. Se originan a partir de células T efectoras justo después de su exposición a antígenos (58). Las células Tr1 normalmente secretan IL-10, mientras que las células Th3 producen $\text{TGF-}\beta$. Las células iTreg y nTreg pueden restringir la autoinmunidad mediante la estimulación de la expresión del receptor inhibitorio CTLA-4 (por sus siglas en inglés de Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 o antígeno 4 del linfocito citotóxico) al competir con otros subtipos de células T por el conjunto de antígenos y el MHC (por sus siglas en inglés de Major Histocompatibility Complex o complejo principal de histocompatibilidad) de clase II (MHC II) en células presentadoras de antígeno (o APC por sus siglas en inglés de Antigen Presenting Cells o células presentadoras de antígeno), por sus efectos citotóxicos y/o inhibidores directos sobre otras células efectoras, y regulando negativamente la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) (57). La expresión de IL-10 por las células Treg es ateroprotectora y disminuye la progresión de las lesiones ateroscleróticas (59).

Las células NK representan una subclase particular de células T. Las células NK invariantes (iNK) con una colección definida de TCR, una vez estimuladas, pueden liberar una cantidad significativa de citocinas antiinflamatorias, como IL-10, IL-4 e IL-13, junto con citocinas proinflamatorias, incluido $\text{IFN-}\gamma$ (60). Las células iNK se consideran células autorreguladoras con la capacidad de promover la tolerancia al cooperar con las células Treg (61). Se han detectado células iNK en placas ateroscleróticas humanas de la aorta abdominal y las arterias carótidas, sin embargo,

los autores Getz and Reardon sugieren mayor investigación para clarificar la participación de las células iNK en la aterosclerosis (62–64).

Los linfocitos B pueden ejercer una función de protección o de daño en la enfermedad aterosclerótica. Se han identificado dos subconjuntos principales de células B en arterias ateroscleróticas humanas: células B1 y B2 (65). Las células B1 se derivan de células madre hematopoyéticas fetales, tienen una vida media prolongada, se mantienen en la periferia por autorrenovación dentro del bazo y producen anticuerpos naturales independientes de las señales provenientes de las células Th (66,67). Las células B1 se dividen en células B1a, que expresan células CD5 y B1b. Las células B1a pueden producir anticuerpos IgM naturales contra Ox-LDL y determinantes antigénicos en la superficie de las células apoptóticas, inhibiendo la captación de Ox-LDL y la formación de células espumosas y promoviendo la eliminación de células apoptóticas dentro de las lesiones ateroscleróticas. En general, los datos experimentales disponibles sugieren que las células B1a ejercen una acción ateroprotectora (68–70).

Las células B2 comprenden células B foliculares y de la zona marginal. A diferencia de las células B1, las células B2 tienen una vida media corta y las células madre hematopoyéticas de la médula ósea las renuevan continuamente. Además, las células B2 producen inmunoglobulinas en respuesta a las señales Th y su supervivencia depende de la señalización del receptor del factor activador de células B (o BAFFR por sus siglas en inglés de B-cell activating factor receptor). En general, las células B2 parecen ejercer una acción proaterogénica (71,72).

La evidencia reportada en la literatura sugiere que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria con un fuerte componente del sistema inmunológico.

3. Factores de riesgo de la enfermedad arterial coronaria

Los factores desencadenantes del daño endotelial se han denominado factores de riesgo y se han clasificado en factores de riesgo modificables y no modificables (73). Los factores de riesgo modificables, se definieron en los estudios de la cohorte de Framingham en los inicios de los años 60 (74) e incluyen a la hipertensión arterial, la hiperlipidemia, la diabetes mellitus, la obesidad, el tabaquismo, los malos hábitos alimenticios y el estilo de vida sedentario (73,75). Estos factores conducen al deterioro del endotelio vascular originando una disfunción endotelial que es la primera alteración fisiológica en la EAC (76).

Los factores de riesgo no modificables son la edad, el género, el grupo étnico y la historia familiar (73). Se ha descrito recientemente, que los factores de riesgo no modificables incluyen entre un 63% a un 80% del pronóstico en los modelos de riesgo cardiovascular (77). Se sabe que el riesgo de EAC aumenta después de los 35 años en ambos géneros. Sin embargo, hay sólida evidencia de que los factores de riesgo de la EAC, incluida la obesidad, los elevados niveles séricos de LDL y el

estilo de vida están asociados con la formación de estrías grasas y progresión a placa ateromatosa desde etapas tempranas de la infancia y la adolescencia (78–80). Sumado a lo anterior, los estudios de seguimiento a largo plazo han establecido que las placas aterosclerosas en las arterias coronarias se desarrollan por más de 40 años (81). Así, pasados los 40 años de edad, el porcentaje de hombres que desarrollan EAC es del 49% y de mujeres es del 32% (82). Se sabe que la incidencia de enfermedades cardiovasculares es mayor en hombres que en mujeres de edad similar (83–85), y esta diferencia de género es más prominente a una edad más joven (86), y se explica en parte por los efectos protectores de las hormonas sexuales en las mujeres (87,88). Sin embargo, las mujeres postmenopáusicas y en edad avanzada tienen más probabilidades de tener un peor desenlace de la enfermedad (89–93). Con base en lo anterior y por los resultados obtenidos a partir del estudio de Framingham, se ha definido un estadio previo de la EAC que es llamado EAC prematura. La EAC prematura es definida como la aparición de lesiones aterotrombóticas coronarias obstructivas sintomáticas antes de los 55 años en hombres y 65 años para mujeres (74,94).

Cabe destacar que los estudios de historia familiar de EAC revelaron otro factor de riesgo implícito en la misma historia familiar, que son los factores genéticos (95). Ya desde la década de 1950 aparecieron los primeros artículos que evaluaban el desarrollo de EAC en familiares, los cuales apoyaban la noción de que el riesgo de presentar EAC tiene un importante componente hereditario (96).

4. Genética de la enfermedad arterial coronaria

La EAC es crónica y multifactorial, es decir en su desencadenamiento participan tanto factores ambientales como genéticos. Las estimaciones de la contribución de la variación genética, estudiadas en la herencia entre padres e hijos en las civilizaciones occidentales, están en el rango de 40% a 50% (97–99). Por estudios en gemelos monocigóticos se ha recabado evidencia importante que respalda las estimaciones genéticas que contribuyen a las causas del desarrollo de EAC, dónde los hallazgos sugieren que a edades más tempranas, la muerte por EAC está influenciada por factores genéticos tanto en mujeres como en hombres (97,100,101). Pero, a diferencia de las enfermedades cardiovasculares monogénicas, como las miocardiopatías hereditarias de las que son responsables las variantes raras de ADN con grandes efectos, se ha observado que la EAC, como enfermedad compleja, está influenciada por polimorfismos de ADN comunes y raros en numerosos loci distribuidos por todo el genoma (102).

Una variedad importante de polimorfismos son los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (por las siglas en inglés de **Single Nucleotide Polymorphisms**) definidos como un loci con alelos que difieren en una sola base, teniendo el alelo más raro una frecuencia de al menos 1% en un conjunto aleatorio de individuos en una población (103). Los SNPs se localizan tanto en regiones codificantes como en regiones no codificantes. Los SNPs en regiones codificantes tienen gran importancia en

las actividades biológicas y moleculares de las proteínas, así como en su estabilidad (104), nivel de expresión (105) y función, esto dependiendo de donde estén ubicados estos polimorfismos (106,107). Los SNPs en las regiones codificantes se clasifican según sus efectos. Un SNP sinónimo es un SNP que no cambia la secuencia de aminoácidos de una proteína, mientras que un SNP no sinónimo sí la altera (108). Un SNP no sinónimo puede ser con cambio de sentido (del inglés missense) o sin sentido (del inglés nonsense). Así, un SNP no sinónimo que tenga cambio de sentido se traducirá a un aminoácido diferente. Un SNP no sinónimo sin sentido resultará en un codón de paro prematuro. Además, un SNP no sinónimo con cambio de sentido puede dar un cambio conservado o un cambio no conservado. Desde el punto de vista de los aminoácidos que son codificados por los transcritos que han sufrido un cambio no sinónimo conservado tendrá como consecuencia un residuo de aminoácido con propiedades fisicoquímicas similares al residuo de aminoácido que estaba originalmente. En cambio, un cambio no sinónimo no conservado se traducirá en un residuo de aminoácido con propiedades fisicoquímicas sustancialmente diferentes al aminoácido codificado originalmente (109–111). Se ha demostrado que los SNPs están localizados con mayor frecuencia en regiones no codificantes (96%) comparado con los SNPs localizado en las regiones codificantes (4%) (112). Por estudios de asociación de genoma completo o GWAS (del inglés **G**enome-**W**ide **A**ssociation **S**tudy) se ha observado que los SNPs asociados con enfermedades se encuentran en más del 90% en regiones no codificantes como regiones promotoras, potenciadores activos o enhancers e incluso en genes de ARN no codificante (113,114). Estos SNP en regiones no codificantes pueden afectar actividades como el corte y empalme de genes, la expresión génica y las secuencias de ADN no codificante (115,116). Se ha observado que los SNPs que residen dentro de regiones reguladoras cercanas a genes, contribuyeron en un rango de entre el 59% al 71% de la heredabilidad del infarto de miocardio y la EAC. Además, los SNPs asociados a EAC residen en elementos funcionales del genoma, como enhancers y regiones promotoras (98). Es importante señalar que hay varios tipos de estudios que han dado luz para comprender las bases genéticas de la EAC, entre los que están los estudios basados en familias, los estudios de asociación de casos y controles, los GWAS y los estudios de asociación de variantes raras (95). Los GWAS, según lo revisado por Musunuru y Kathiresan en 2019, habían identificado más de 150 loci en el umbral de significancia estadística comúnmente aceptado para este tipo de estudios con un valor $p < 5 \times 10^{-8}$ (102). A pesar de tal esfuerzo, solo la citocina CXCL12 se ha asociado significativamente con EAC en los GWAS (117,118). Pero la investigación continúa y están surgiendo más herramientas, como estudios *in silico*, estudios de aleatorización mendeliana y puntajes genéticos. Dicho esfuerzo consiste en identificar, desde las señales genéticas hasta su efecto biológico y establecer, la compleja relación entre las variantes genéticas y la EAC.

II. ANTECEDENTES

La respuesta inmune en la EAC se caracteriza por la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias que regulan el desarrollo, la progresión y las complicaciones de la enfermedad (119). Las citocinas son una familia diversa de glicoproteínas de bajo peso molecular que son activas en una amplia gama de tejidos y se agrupan en varias clases, como quimiocinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, interferones y factores de crecimiento transformantes (120,121).

Las interleucinas (ILs) son un tipo de citocinas que originalmente se pensaba que eran expresadas solo por los leucocitos, pero que actualmente se sabe son producidas por otros tipos de células del cuerpo. Las ILs juegan un papel crucial en la comunicación intercelular para la activación y diferenciación de las células inmunes, así como la proliferación, maduración, migración y adhesión (122). Dadas sus propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias, las ILs se han investigado ampliamente en la EAC.

1. Familia de la interleucina 12

La familia de la interleucina-12 (IL-12) tiene cuatro miembros, que incluyen IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35. Esta familia está ligada a la superfamilia de citocinas IL-6, un grupo de citocinas que consta de moléculas pleiotrópicas que forman un complejo receptor con al menos una molécula de la subunidad del receptor de señalización gp130 (123). Además, las citocinas de la superfamilia IL-6 tienen actividades biológicas superpuestas y están involucradas en la regulación del equilibrio entre las células T reguladoras y efectoras, en la regulación metabólica y en muchas funciones neuronales (124). La familia de la IL-12 consta de proteínas heterodiméricas compuestas por subunidades α (p19, p28 y p35) y β (p40 y proteína 3 inducida por el virus de Epstein-Barr o EB13) (125). Los miembros de la familia IL-12 son las interleucinas 12, 23 y 27 producidas predominantemente por linfocitos T efectoras, macrófagos y células dendríticas (126), mientras que el otro miembro que es la IL-35 es secretada por células T reguladoras, células dendríticas activadas y células B reguladoras (127). La IL-12 y la IL-23 se consideran factores proinflamatorios que amplifican las señales inflamatorias. La IL-27 tiene una función dual con características proinflamatorias y antiinflamatorias dependiente del microambiente donde se encuentre; mientras que la IL-35 es una citocina antiinflamatoria. Debido a su participación en el proceso inflamatorio, estas citocinas se han asociado también con el desarrollo de los eventos cerebrovasculares (ECV), utilizando modelos humanos y animales (128). Se ha observado que las concentraciones plasmáticas de las interleucinas de la familia de la IL-12 aumentan significativamente en muchos tipos de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. En el caso de la IL-12 se ha observado incrementos en las concentraciones plasmáticas en la angina de pecho estable, angina de pecho progresiva, angina de pecho inestable, el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST, el infarto de

miocardio con elevación del ST e infarto agudo de miocardio. Las concentraciones plasmáticas de la IL-12 están en el orden de picogramos en las diferentes poblaciones en las que se ha medido (129–133). En el caso de la IL-23 se ha observado que los pacientes con EAC presentan niveles más altos de IL-23 circulante (131,134). Se ha observado que la expresión de IL-27 es del orden de nanogramos y está aumentada en plasma y en placas ateromatosas presentes en las arterias coronaria y la arteria carótida de pacientes con EAC (131,135). Se observó que la expresión de la IL-35 (que es del orden de picogramos) se redujo significativamente en pacientes con EAC (131).

a. Interleucina 12

La interleucina-12 (IL-12) es una citocina heterodimérica que consta de una cadena ligera de 35 kDa (p35) codificada por el gen *IL-12A* ubicado en el cromosoma 3q y una cadena pesada de 40 kDa (p40) codificada por el gen *IL-12B* ubicado en cromosoma 5q (136). Esta citocina se descubrió durante el análisis de factores secretados por la línea celular linfoblástide B humana transformada por el virus de Epstein-Barr como factor estimulante de las células NK (137). La IL-12, producida principalmente por macrófagos, juega un papel clave en la inducción de la respuesta celular inmunitaria Th1 (138). Se demostró una alta expresión de ARNm y proteína de IL-12 en lesiones ateroscleróticas humanas (139). Dado que la IL-12 se expresa en placas ateroscleróticas, dos grupos de investigación independientes determinaron los niveles séricos de esta citocina en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) y EAC. Ambos grupos encontraron que los niveles séricos elevados de IL-12 se asociaron significativamente con resultados adversos de IAM y peor pronóstico de EAC (133,140). En el caso de la subunidad β o p40 del gen *IL-12B* tanto en la IL-12 como en la IL-23, la información sobre la asociación de polimorfismos presentes en este gen con EAC es escasa. Un estudio japonés en una pequeña cohorte no logró mostrar una asociación entre el polimorfismo rs3212227 C/A del gen de la *IL-12B* y la presencia o gravedad de EAC diagnosticada por angiografía (141). Estos resultados concuerdan con los informados por Mangino et al., en una cohorte británica (142).

b. Interleucina 23

La interleucina-23 (IL-23) se describió como una citocina heterodimérica conformada por las subunidades p19 y p40. La subunidad p19 tiene cuatro hélices α , consta de 189 aminoácidos con un peso molecular de 20.7 kDa, un péptido señal de 19 aminoácidos y un péptido maduro de 170 aminoácidos con 18.7 kDa. El gen *IL-23A* ubicado en el cromosoma 12q está compuesto por cuatro exones y tres intrones (143). La subunidad p19 es cosecretada con la subunidad p40 (común con IL-12) formando un heterodímero llamado Interleucina 23 (144,145). Este complejo heterodímero p19p40 se expresa predominantemente en células dendríticas y células fagocíticas.

La IL-23 estimula la proliferación de células T de memoria, el desarrollo de células Th17 proinflamatorias y la diferenciación de células Th1 (146). Se ha observado que la IL-23 regula la actividad de las células T ya que induce la diferenciación de linfocitos T CD4+ en células Th17; por lo tanto, la IL-23 no solo es un factor necesario para la activación de las células Th17, sino que también juega un papel importante en las enfermedades autoinmunes e inflamatorias (147). La IL-23 se ha asociado con la aterosclerosis tanto en humanos como en modelos animales con resultados contradictorios. Se observó una expresión más baja del gen *IL-23A* en linfocitos de sangre periférica (PBMC) no estimulados de pacientes con EAC en comparación con controles sanos (148). Sin embargo, en otro estudio, se detectaron niveles elevados del heterodímero IL-23 en pacientes con aterosclerosis carotídea en comparación con controles sanos y estos niveles se asociaron con progresión de la enfermedad y aumento de la mortalidad (134). Por otro lado, los polimorfismos de la subunidad α o p19 se han asociado con la presencia de varias enfermedades (149–151). La IL-23 participa en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas a través del receptor de IL-23 (IL-23R) y el receptor compartido IL-12R β 1 (152–154). En un modelo de ratones IL-23p19^{-/-} con infarto de miocardio, la deficiencia de IL-23 produjo inflamación miocárdica, menor activación de fibroblastos cardíacos, ruptura ventricular y aumento de la mortalidad (155). Otro experimento con ratones transgénicos que sobre expresaron p19 reveló que la regulación de su producción en células hematopoyéticas fue fundamental (156–159). Hasta donde sabemos, ningún estudio ha evaluado la asociación de los polimorfismos del gen *IL-23A* con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, hay estudios clínicos que han indicado un aumento significativo en los niveles de IL-23 en individuos con aterosclerosis y, de notable importancia, en placas carotídeas ateroscleróticas (134).

JUSTIFICACIÓN

La EAC es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Según datos de la Secretaría de Salud, en México se registran más de 70 mil muertes al año por algún evento cardiovascular a causa de la aterosclerosis. Este padecimiento es de origen multifactorial, en su inicio y progresión participan tanto factores genéticos como ambientales. Evidencia reciente señala que la inflamación e inmunidad, interaccionan con factores de riesgo cardiometabólico, para mediar todas las etapas de aterosclerosis, desde la acumulación de las LDL dentro del espacio subendotelial hasta la progresión de la placa aterosclerosa, la ruptura y la trombosis. El estudio de los genes que codifican para moléculas relevantes en la patogénesis de la aterosclerosis, tales como las citocinas, es importante para definir marcadores de susceptibilidad y/o resistencia a este padecimiento. Estas consideraciones sustentan el interés y la importancia de realizar el presente estudio para identificar marcadores genéticos asociados con el desarrollo de la EAC prematura en nuestra población. Los resultados del estudio tienen el potencial de permitir eventualmente, el establecimiento de tratamientos preventivos y mejor dirigidos considerando las características genéticas individuales. En la actualidad, no existen estudios en la literatura internacional que hayan evaluado la asociación de la EAC prematura con polimorfismos de los genes que codifican para las subunidades p40 y p19 de la IL-12 e IL-23.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos rs1368439, rs3212227, rs1433048, rs2853694, rs3212220, rs1363670 y rs6887695 del gen que codifica para la subunidad p40 y rs11171806, rs2066808 del gen que codifica para la subunidad p19 de las interleucinas 12 y 23 se asocian con el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria prematura (EACp).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer si los polimorfismos de los genes que codifican para las subunidades p40 y p19 de las interleucinas 12 y 23 se asocian con el desarrollo de EACp o con algún parámetro clínico o metabólico en estos individuos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos de los genes que codifican para las subunidades p40 y p19 de las interleucinas 12 y 23 en pacientes con EACp e individuos control.
2. Definir si alguno de estos polimorfismos se asocia con el desarrollo de la EAC.
3. Definir si estos polimorfismos se asocian con algún o algunos factores de riesgo cardiovascular y/o parámetros metabólicos en pacientes con EACp e individuos control.
4. Analizar el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos estudiados.
5. Construir haplotipos y definir si alguno de éstos pudiera asociarse al desarrollo de la EACp.

Materiales y Métodos

1. Población de estudio

El presente estudio es parte del proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), que es un estudio transversal que se realizó entre junio del 2008 a febrero de 2013. El estudio GEA se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en una colaboración de los Departamentos de Endocrinología y Biología Molecular (160–162). Fue diseñado para estudiar las bases genéticas y metabólicas que se asocian al desarrollo de la EACp en población mexicana (160). Los participantes del estudio GEA son individuos mestizos mexicanos con por lo menos 3 generaciones nacidas en la república mexicana (160). Teniendo en cuenta que la población mexicana es una mezcla de genes caucásicos, amerindios y africanos, se evaluaron previamente en el estudio (163) estos componentes utilizando 265 marcadores de ascendencia. Usando el software ADMIXTURE (164) se determinaron los orígenes caucásicos, amerindios y africanos. Se encontró que la ascendencia global no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre los pacientes con EACp y los controles sanos (55.8% vs 54.0% en la ancestría amerindia, 34.3% vs 35.8% en la ancestría caucásica y 9.8% vs 10.1% en la ancestría africana para casos y controles respectivamente) (163). Esto sugiere que la estratificación de la población no fue un sesgo o factor de confusión en este estudio.

Al inicio del estudio, se incluyeron un total de 1500 individuos sanos y 1240 individuos con EACp de entre 30 y 75 años de edad.

El grupo de pacientes se conformó con sujetos provenientes de la consulta externa, del departamento de hemodinamia y clínica ambulatoria del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Se incluyeron sujetos con diagnóstico de EACp, definida por historial personal de infarto al miocardio, angioplastia o cirugía de revascularización o estenosis coronaria $>50\%$ en la angiografía, diagnosticados antes de los 55 años en hombres y antes de los 65 años en mujeres. Se excluyeron pacientes que hubieran tenido eventos cardiovasculares agudos 3 meses antes del estudio, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus, enfermedad hepática, enfermedad renal, enfermedad oncológica, distiroidismo no tratado o tratamiento con corticosteroides.

Los sujetos aparentemente sanos fueron reclutados de la población abierta de donantes del banco de sangre y a través de invitación directa o publicada en centros de servicio social. Se incluyeron sujetos control sin antecedentes familiares de EACp y sin evidencia de aterosclerosis subclínica. Se excluyó aquellos sujetos que presentaron insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad hepática, renal, tiroidea u oncológica.

2. Recolección de datos demográficos

Todos los participantes del estudio GEA, respondieron cuestionarios estandarizados y validados para obtener información sobre antecedentes familiares y médicos, consumo de alcohol y tabaco, hábitos dietéticos y de actividad física (165,166).

3. Mediciones antropométricas

Los parámetros antropométricos fueron medidos por personal capacitado. El peso se midió en una báscula calibrada y para la talla se usó un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). La circunferencia de la cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la costilla y la cresta iliaca. El índice de masa corporal (IMC) se calculó mediante la fórmula $\frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Talla (m}^2\text{)}}$. La obesidad fue definida como un IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ (167). La obesidad abdominal se definió con valores de circunferencia de cintura ≥ 80 cm en mujeres y ≥ 90 cm en hombres (168). La presión arterial se midió en posición sedente por triplicado, se usó un esfigmomanómetro digital Welch Allyn series 5200 (Skaneateles Falls, NY, EUA) y se promediaron e informaron las dos últimas mediciones. La hipertensión arterial se definió con valores de tensión sistólica y diastólica de 140/90 mmHg respectivamente, o por el uso de un tratamiento antihipertensivo (163,169).

4. Análisis bioquímico

La toma de muestra fue en ayuno de 10 a 12 horas y después de 15 min de reposo en posición sedente, se colectaron 45 mL de sangre venosa en tubos con etilen diamino tetraacético dipotásico (K₂EDTA, 1.8mg/mL) y en tubos sin anticoagulante. Se centrifugó la sangre obtenida a 4°C. El plasma y el suero obtenidos se dividieron en 16 alícuotas. A las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KUI/mL, Benzamidina 1 mM). Todas las alícuotas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Las concentraciones de glucosa, colesterol total (CT), triglicéridos (TG) y colesterol unido a proteínas de alta densidad (C-HDL) se midieron en plasma fresco. Se utilizaron reactivos enzimático-colorimétricos (Roche/Hitachi, Alemania), en un analizador químico Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio, Japón), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, EUA). El C-HDL se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania) (170). El colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (C-LDL) fue estimado utilizando la fórmula de DeLong (171). La apolipoproteína A1 (ApoA1), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y ácido úrico se midieron en suero con métodos enzimático-colorimétricos (Roche/Hitachi, Alemania) en un analizador químico Hitachi 902 (Hitachi LTD, Tokio, Japón). El colesterol no-HDL (C no HDL) se estimó restando el valor del C-HDL

del colesterol total. En el laboratorio de endocrinología del Instituto, la reproducibilidad y precisión de las determinaciones de lípidos son evaluadas periódicamente por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Centers for Disease Control, CDC por sus siglas en inglés) de Atlanta, EUA. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores al 3%.

Se definió como hipercolesterolemia a individuos con un colesterol total ≥ 200 mg/dL, la hipoalfalipoproteinemia y la hipertrigliceridemia se definieron utilizando los criterios de la Declaración Científica de la American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute (172). La hiperuricemia se definió como ácido úrico en suero > 6 mg/dL en mujeres y > 7 mg/dL en hombres.

La concentración de insulina en suero se determinó por radioinmunoanálisis (Millipore RIA kit ST, Missouri, EUA). Los coeficientes de variación para este ensayo fueron del 2.1% al 6.8%, respectivamente. La resistencia a la insulina (RI) fue estimada con el modelo homeostático (HOMA-RI). La presencia de resistencia a la insulina fue considerada cuando los valores de HOMA-RI \geq percentil 75 que en mujeres fue ≥ 3.66 y en hombres ≥ 3.38 (173). La hiperinsulinemia fue definida como una concentración superior al percentil 75 que en mujeres fue ≥ 16.97 μ IU/mL y en hombres 15.20 μ IU/mL. La hipoadiponectinemia se definió a una concentración de adiponectina por debajo del percentil 25 que en mujeres fue ≤ 8.67 μ g/mL y en hombre fue ≤ 5.30 μ g/mL.

La concentración de proteína C reactiva (PCR) de alta sensibilidad se determinó mediante inmunonefelometría en un BN Pro Spec Nefelometer (Dade Behring, Marburg, Alemania). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores del 6%. Se consideró una PCR elevada cuando el valor fue PCR ≥ 3.0 mg/L. La concentración de adiponectina en suero se determinó por inmunoensayo enzimático (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menores al 10%.

Estudio de tomografía axial computarizada

Las tomografías computadas de tórax y abdomen se realizaron utilizando un sistema de tomografía computarizada helicoidal multidetector de 64 canales (Somatom Sensation, Siemens, Forcheim, Alemania). Las imágenes tomográficas fueron interpretadas por radiólogos experimentados. Las lecturas se leyeron para evaluar y cuantificar lo siguiente: (1) puntaje de calcificación de la arteria coronaria (CAC) usando el método Agatston (174) y (2) tejido adiposo visceral (175) Para el presente estudio, el grupo control solo incluyó individuos con CAC = 0.

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se definió con glucosa en ayunas ≥ 126 mg / dL y también se consideró cuando los participantes informaron un tratamiento para reducir la glucosa o un diagnóstico médico de DM2.

Análisis genético

La selección de los sitios polimórficos de los genes *IL-12b* e *IL-23a* se realizó mediante un análisis bioinformático que permitió definir cuales sitios polimórficos podrían tener algún efecto funcional. Así, para aquellos sitios polimórficos localizados en la región promotora, se seleccionaron aquellos que fueran sitios probables de unión para factores de transcripción. En el caso de los sitios polimórficos localizados en exones se seleccionó aquellos que pudieran dar como resultado un cambio de aminoácido. La selección de los sitios polimórficos se hizo mediante los programas informáticos: FastSNP, SplicePort: An Interactive Splice Site Analysis Tool (<http://www.spliceport.cbcb.umd.edu/>), SNPs3D (<http://www.snps3d.org/>), PESX: Putative Exonic Splicing enhancers/Silencers (<http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/>), y ESEfinder release 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>). Una vez identificados y seleccionados los probables sitios polimórficos funcionales, se evaluaron las frecuencias reportadas en otras poblaciones. Las frecuencias en otras poblaciones se obtuvieron utilizando los datos del Hap Map. Así, un criterio extra para la selección de los sitios polimórficos fue seleccionar los que tuvieran una frecuencia del alelo menor (MAF del inglés, minor allele frequency) mayor a 5%. Con base en lo anterior, el presente proyecto incluyó 9 polimorfismos, los cuales fueron:

Tabla 1. Sitios polimórficos del gen IL-23A (p19) que serán analizados por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real

IL23A (p19)	Posición (C:Pb)	Cambio de base	Tipo de sustitución	Región	MAF
rs11171806	12:56339747	A/G	Transición	Exón 3	0.0565
rs2066808	12:56344189	G/A	Transición	3'UTR	0.0807

MAF es la frecuencia del alelo menor. MAF a menudo se informa en el contexto de las frecuencias alélicas establecidas por 1000 Genomes y otros grandes proyectos de secuenciación.

Dentro del análisis genético, una vez seleccionados los sitios polimórficos, se aisló ADN genómico de sangre completa que contenía EDTA usando técnicas estándar. Los sitios polimórficos se genotiparon usando ensayos TaqMan de exonucleasa 5' en un sistema de PCR en tiempo real ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). La tasa de llamadas de genotipado superó el 95% para todos los SNP probados, sin genotipos discordantes en el 10% de las muestras duplicadas. Nos adherimos a las instrucciones del fabricante para realizar los ensayos.

Tabla 2. Sitios polimórficos del gen IL-12B (p40) que serán analizados por discriminación alélica utilizando PCR en tiempo real.

IL12B (p40)	Posición (C:Pb)	Cambio de base	Tipo de sustitución	Región	MAF
rs1368439	5:159315006	G/T	Transversión	3' UTR	0.1593
rs3212227	5:159315942	G/T	Transversión	3'UTR	0.2153
rs1433048	5:159328837	A/G	Transición	Intrón 1	0.1640
rs2853694	5:159322080	G/T	Transversión	Intrón 4	0.4756
rs3212220	5:159327187	A/C	Transversión	Intrón 1	0.2223
rs1363670	5:159357103	C/G	Transversión	RAC 5' UTR	0.1367
rs6887695	5:159395637	C/G	Transversión	RAC 5' UTR	0.3218

MAF es la frecuencia del alelo menor. MAF a menudo se informa en el contexto de las frecuencias alélicas establecidas por 1000 Genomes y otros grandes proyectos de secuenciación.

Aspectos éticos

El estudio cumple con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los Principios Éticos para la Investigación Médica que involucra sujetos humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki Finlandia 1964, modificada en Tokio, Japón 1975. Fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH, número 19-1104). Todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los datos personales y los resultados de los participantes son resguardados como estrictamente confidenciales. No ha habido divulgación de los mismos o intercambio de datos. Se explicó a cada individuo participante del estudio, y en forma detallada, los pasos del procedimiento para la elaboración del protocolo y, por ningún motivo, se afectó o modificó su tratamiento en caso de no aceptar su inclusión. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Bioética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH, proyecto número 18-1085-Anexo 1). Todos los participantes fueron invitados y aceptaron participar, para el caso firmaron una carta de consentimiento al momento de su inclusión.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS software v15.0 (SPSS Chicago, IL) Para la estimación estadística de medias \pm DE y frecuencias de las características basales. Comparamos frecuencias usando pruebas de Chi-cuadrado, y medios usando el ANOVA y la prueba t de Student. Para determinar la asociación entre los polimorfismos y las variables metabólicas, utilizamos ANCOVA y

ajustamos por edad, sexo, IMC, tabaquismo actual, LDL, DT2 y apoA. La asociación de los polimorfismos con EACp se analizó por regresión logística bajo modelos de herencia dominante, recesivo, aditivo, heterocigoto, codominante 1 y codominante 2. El poder estadístico para detectar la asociación con EACp fue de 0.80 según lo estimado con el software QUANTO [biostats.usc.edu/Quanto.html]. Las frecuencias observadas de los genotipos no se desviaron de lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, $P > 0.05$). Se usó el programa Haploview versión 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology y Universidad de Harvard, Cambridge, MA, EE. UU. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) para calcular el desequilibrio de ligamiento por parejas (D' , r^2) y construir los haplotipos.

Resultados

Resultados del gen *IL-23A* (subunidad p19)

Características demográficas, bioquímicas y factores de riesgo cardiovascular.

Se estudiaron 1,089 individuos sin la presencia de EACp y 1,160 individuos con la presencia de la enfermedad. En la población de individuos sin la presencia de EACp, denominado como grupo control, el 41% correspondió a hombres y en la población con EACp, denominado como pacientes, hubo la presencia de 81% de hombres. La edad promedio fue de 51 ± 9 años en el caso de los controles y 54 ± 8 años en pacientes. El IMC para controles fue de 27.9 kg/m^2 el cual fue significativamente diferente al IMC de 28.3 kg/m^2 de los pacientes. Las características demográficas, bioquímicas y los factores de riesgo cardiovascular de los grupos estudiados se muestran en la Tabla 3. En los pacientes con EACp la edad, el sexo, el IMC, la circunferencia de cintura, la tensión arterial sistólica, la tensión arterial diastólica, la grasa abdominal visceral, la alanina aminotransferasa, la aspartato aminotransferasa, así como los porcentajes de hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertensión e hipoadiponectinemia fueron significativamente mayores en pacientes. Por otro lado, los pacientes con EACp presentaron una disminución significativa de los niveles de colesterol total ($<200 \text{ mg/dL}$), C-LDL ($\geq 130 \text{ mg/dL}$), PCR de alta sensibilidad ($\geq 3 \text{ mg/L}$), así como en el hábito de fumar al comparar con el grupo control. Es importante mencionar que, todas las variables clínico-demográficas medidas en pacientes fue posterior a que fueran diagnosticados con EACp. Por tanto, en el presente estudio, el decremento en los valores de estas variables en pacientes con respecto a los controles pudo deberse al tratamiento con estatinas y al cambio en el estilo de vida por recomendación médica.

Asociación de los polimorfismos con la EACp

La distribución de los polimorfismos estudiados en los pacientes con EACp y los controles se muestra en la Tabla 4. La distribución del polimorfismo rs11171806 fue similar en los pacientes y los controles. En contraste, bajo los modelos recesivo (razón de momios [RM] = 4.567, $p_{\text{recesivo}} = 0.046$) y codominante 2 (RM = 4.567, $p_{\text{codominante2}} = 0.044$) el polimorfismo rs2066808 se asoció con un incremento en el riesgo de presentar EACp. Los modelos fueron ajustados por edad, genero, IMC, tabaquismo actual, C-LDL, C-HDL y HOMA-RI. El poder estadístico para detectar la asociación del polimorfismo rs2066808 con EACp fue estimada en $>90\%$ por el programa QUANTO.

Tabla 3. Características demográficas, clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovascular de los sujetos estudiados.

	Control (n=1089)	EACp (n=1160)	p
Edad (años)	51± 9	54± 8	<0.001
Sexo (% hombres)	41.0	81.0	<0.001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27.9 [25.4-30.8]	28.3 [25.9-31.1]	0.004
Circunferencia de cintura (cm)	94 ± 11	98 ± 10	<0.001
Tensión arterial sistólica (mmHg)	112 [104-123]	116 [106-127]	<0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	70.5 [65.0-76.0]	71.0 [65.5-77.5]	0.011
Grasa abdominal visceral (cm ²)	139 [105-181]	168 [129-215]	<0.001
Alanina aminotransferasa (UI/L)	24 [18 – 34]	26 [19 – 36]	0.025
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	25 [21 – 30]	26 [22 – 31]	0.001
Colesterol total > 200mg/dl (%)	36.4	20.3	<0.001
C-LDL ≥ 130 mg/dL (%)	29.6	16.1	<0.001
Hipoalfalipoproteinemia (%)	52.1	67.1	<0.001
C no HDL>160 mg/dL (%)	27.9	19.5	<0.001
Hipertrigliceridemia (%)	47.3	56.2	<0.001
Obesidad (%)	30.3	35.1	0.009
Obesidad abdominal (%)	81.2	83.7	0.067
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	9.6	35.5	<0.001
Hiperinsulinemia (%)	52.2	66.1	<0.001
Resistencia a la insulina (%)	54.2	72.8	<0.001
Hipertensión (%)	18.9	68.1	<0.001
GAV elevada (%)	54.7	64.7	<0.001
Tabaquismo actual (%)	22.6	11.6	<0.001
Hipoadiponectinemia (%)	42.9	57.6	<0.001
PCR>3 mg/L (%)	26.7	20.5	0.002
Hiperuricemia (%)	20.5	36.1	<0.001

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartil] o porcentaje. Las comparaciones se hicieron usando la prueba *t* de Student o la prueba *U* de Mann-Whitney para variables continuas y la prueba de chi-cuadrada para variables categóricas. C-LDL, colesterol en lipoproteínas de baja densidad; C no HDL, colesterol no HDL; HDL, lipoproteínas de alta densidad; PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; GAV, grasa abdominal visceral; UI, unidades internacionales.

Tabla 4. Asociación de los polimorfismos del gen IL-23A con EACp.

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Modelo	RM [IC 95%]	p
rs2066808	AA	AG	GG				
	Control (n=1089)	0.851	0.146	0.003	0.076	Aditivo Dominante	1.179 [0.906-1.535] 1.125 [0.848-1.491]
EACp (n=1160)	0.848	0.142	0.009	0.081	Recesivo	4.567 [1.030-20.24]	0.046
					Heterocigoto	1.049 [0.787-1.397]	0.787
					Codominante 1	1.060 [0.796-1.413]	0.689
					Codominante 2	4.606 [1.039-20.43]	0.044
rs1117806	GG	GA	AA				
	Control (n=1089)	0.896	0.102	0.002	0.053	Aditivo Dominante	1.163 [0.848-1.595] 1.176 [0.846-1.635]
EACp (n=1160)	0.896	0.101	0.003	0.053	Recesivo	1.070 [0.175-6.539]	0.942
					Heterocigoto	1.179 [0.844-1.645]	0.334
					Codominante 1	1.179 [0.845-1.646]	0.333
					Codominante 2	1.089 [0.178-6.666]	0.926

Todos los modelos se ajustaron por edad, sexo, IMC, tabaquismo actual, C-LDL, C-HDL, HOMA-RI. FAM, frecuencia del alelo menor; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; HOMA-RI, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina.

Asociación de los polimorfismos con factores de riesgo cardiovascular

La evaluación de la asociación de los polimorfismos con factores de riesgo cardiovascular se hizo de forma separada en los pacientes con EACp y los individuos control. En los pacientes (Tabla 5) bajo diferentes modelos de herencia, el polimorfismo rs2066808 se asoció con disminución de riesgo de presentar hiperinsulinemia (RM = 0.271, $p_{\text{recesivo}} = 0.048$; RM = 0.268, $p_{\text{codominante2}} = 0.046$), resistencia a la insulina (RM = 0.276, $p_{\text{recesivo}} = 0.043$; RM = 0.270, $p_{\text{codominante2}} = 0.040$), hipoalfalipoproteinemia (RM = 0.269, $p_{\text{recesivo}} = 0.042$; RM = 0.274, $p_{\text{codominante2}} = 0.045$), y un incremento en el riesgo de hiperuricemia (RM = 1.459, $p_{\text{aditivo}} = 0.015$; RM = 1.486, $p_{\text{dominante}} = 0.021$; RM = 1.412, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.045$; RM = 1.436, $p_{\text{codominante1}} = 0.039$). Por otro lado, el polimorfismo rs11171806 se asoció con disminución de riesgo de presentar hiperinsulinemia (RM = 0.677, $p_{\text{aditivo}} = 0.043$; RM = 0.645, $p_{\text{dominante}} = 0.031$; RM = 0.632, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.026$; RM = 0.632, $p_{\text{codominante1}} = 0.026$) y resistencia a la insulina (RM = 0.659, $p_{\text{aditivo}} = 0.037$; RM = 0.632, $p_{\text{dominante}} = 0.029$; RM = 0.625, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.027$; RM = 0.625, $p_{\text{codominante1}} = 0.027$). En los individuos control (Tabla 6) el polimorfismo rs11171806 se asoció con disminución del riesgo de presentar hiperinsulinemia (RM = 0.645, $p_{\text{aditivo}} = 0.049$).

Tabla 5. Asociación de los polimorfismos del gen IL-23A con la presencia de parámetros cardiometabólicos en pacientes con EACp.

	Frecuencia del genotipo			FAM	Modelo	RM [IC 95%]	p
Hiperinsulinemia							
rs2066808	AA	AG	GG				
No(n=393)	0.835	0.147	0.018	0.092	Recesivo	0.271 [0.075-0.987]	0.048
Si (n=767)	0.856	0.139	0.005	0.075	Codominante 2	0.268 [0.074-0.976]	0.046
rs1117806	GG	GA	AA		Aditivo	0.677 [0.464-0.988]	0.043
No (n=393)	0.869	0.129	0.003	0.066	Dominante	0.645 [0.433-0.960]	0.031
Si (n=767)	0.909	0.087	0.004	0.048	Heterocigoto	0.632 [0.422-0.946]	0.026
					Codominante 1	0.632 [0.422-0.947]	0.026
Resistencia a la insulina							
rs2066808	AA	AG	GG		Recesivo	0.276 [0.079-0.963]	0.043
No(n=316)	0.827	0.154	0.019	0.097	Codominante 2	0.270 [0.077-0.942]	0.040
Si (n=844)	0.857	0.137	0.006	0.075			
rs1117806	GG	GA	AA		Aditivo	0.659 [0.446-0.974]	0.037
No (n=316)	0.862	0.135	0.003	0.071	Dominante	0.632 [0.419-0.954]	0.029
Si (n=844)	0.908	0.089	0.004	0.048	Heterocigoto	0.625 [0.412-0.949]	0.027
					Codominante 1	0.625 [0.412-0.948]	0.027
Hipoalfalipoproteinemia							
rs2066808	AA	AG	GG		Recesivo	0.269 [0.076-0.951]	0.042
No(n=382)	0.851	0.131	0.018	0.084	Codominante 2	0.274 [0.077-0.971]	0.045
Si (n=778)	0.847	0.148	0.005	0.079			
Hiperuricemia							
rs2066808	AA	AG	GG		Aditivo	1.459 [1.076-1.979]	0.015
No(n=741)	0.867	0.126	0.007	0.070	Dominante	1.482 [1.061-2.070]	0.021
Si (n=419)	0.817	0.168	0.014	0.099	Heterocigoto	1.412 [1.008-2.003]	0.045
					Codominante 1	1.436 [1.018-2.025]	0.039

Todos los modelos se ajustaron por edad, sexo, IMC, tabaquismo actual, C-LDL, C-HDL y HOMA-RI. FAM, frecuencia del alelo menor; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; HOMA-RI, modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina; IMC, índice de masa corporal.

Tabla 6. Asociación del polimorfismo rs11171806 del gen IL-23A con la presencia de parámetros cardiometabólicos en individuos control.

	Frecuencia del genotipo			FAM	Modelo	RM [IC 95%]	p
Hiperinsulinemia							
rs11171806	GG	GA	AA				
No (n=519)	0.882	0.114	0.004	0.061	Aditivo	0.645 [0.418-0.997]	0.049
Si (n=570)	0.908	0.092	0	0.046			

Todos los modelos se ajustaron por edad, sexo e IMC. FAM, frecuencia del alelo menor; IC, intervalo de confianza; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal.

Análisis de haplotipos

Se encontró que los polimorfismos rs2066808 y rs11171806 estuvieron en alto desequilibrio de ligamiento ($D' = 0.98$, $r^2 = 0.64$) (Figura 2). Sin embargo, la distribución de los haplotipos generados fue similar en pacientes con EACp e individuos control (Tabla 7).

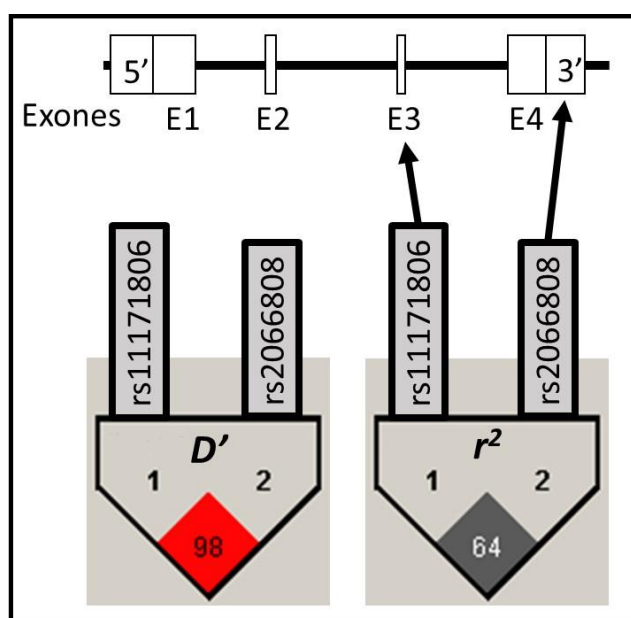


Fig. 2. Desequilibrio de ligamiento (D' y r^2) del gen IL-23A (subunidad p19). Se muestran los dos polimorfismos de un solo nucleótido genotipados del gen de la IL-23A. Figura creada en Haploview 4.2. La parte superior de la figura muestra dónde se encuentran localizados los polimorfismos dentro del gen IL-23A, la parte inferior muestra los valores de desequilibrio de ligamiento (D') y razón de recombinación (r^2) calculados.

Tabla 7. Asociación de los haplotipos del gen *IL-23A* con la presencia de EACp.

Haplotipos	Bloque	EACp		RM [IC 95%]	P
		Si	No		
H1	GA	0.920	0.924	0.938 [0.754-1.166]	0.564
H2	AG	0.052	0.053	0.989 [0.761-1.287]	0.939
H3	GG	0.028	0.023	1.230 [0.847-1.787]	0.277

El orden de los polimorfismos en el haplotipo está en función de su posición en el cromosoma (rs11171806, rs2066808). RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza.

Resultados del gen *IL-12B* (subunidad p40)

Factores de riesgo clínico y cardiovascular

Se estudiaron 1,030 individuos sin la presencia de EACp y 1,133 individuos con la presencia de la enfermedad. Las características demográficas, bioquímicas y los factores de riesgo cardiovascular de los grupos estudiados se muestran en la Tabla 8. En los pacientes con EACp la edad, el sexo, el IMC, la circunferencia de cintura, la tensión arterial sistólica, la tensión arterial diastólica, la grasa abdominal visceral, la alanina aminotransferasa, la aspartato aminotransferasa, así como los porcentajes de hipoalfalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertensión e hipoadiponectinemia fueron significativamente mayores en pacientes. Por otro lado, los pacientes con EACp presentaron una disminución significativa de los niveles de colesterol total (<200 mg/dL), C-LDL (\geq 130 mg/dL), PCR de alta sensibilidad (\geq 3 mg/L), así como en el hábito de fumar al comparar con el grupo control. Es importante mencionar que, todas las variables clínico-demográficas medidas en pacientes fue posterior a que fueran diagnosticados con EACp. Por tanto, en el presente estudio, el decremento en los valores de estas variables en pacientes con respecto a los controles pudo deberse al tratamiento con estatinas y al cambio en el estilo de vida por recomendación médica.

Tabla 8. Características clínicas y prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en los sujetos estudiados.

	Control (n=1030)	EACp (n=1133)	p
Edad (años)	51± 9	54± 8	<0.001
Sexo (% hombres)	41.0	81.0	<0.001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27.9 [25.4-30.8]	28.3 [25.9-31.1]	0.004
Circunferencia de cintura (cm)	94 ± 11	98 ± 10	<0.001
Tensión arterial sistólica (mmHg)	112 [104-123]	116 [106-127]	<0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	70.5 [65.0-76.0]	71.0 [65.5-77.5]	0.011
Grasa abdominal visceral (cm ²)	139 [105-181]	168 [129-215]	<0.001
Alanina aminotransferasa (UI/L)	24 [18 – 34]	26 [19 – 36]	0.025
Aspartato aminotransferasa (UI/L)	25 [21 – 30]	26 [22 – 31]	0.001
Colesterol total < 200mg/dl (%)	36.4	20.3	<0.001
C-LDL ≥ 130 mg/dL (%)	29.6	16.1	<0.001
Hipoalfalipoproteinemia (%)	52.1	67.1	<0.001
C no HDL >160 mg/dL (%)	27.9	19.5	<0.001
Hipertrigliceridemia (%)	47.3	56.2	<0.001
Obesidad (%)	30.3	35.1	0.009
Obesidad abdominal (%)	81.2	83.7	0.067
Diabetes mellitus tipo 2 (%)	9.6	35.5	<0.001
Hiperinsulinemia (%)	52.2	66.1	<0.001
Resistencia a la insulina (%)	54.2	72.8	<0.001
Hipertensión (%)	18.9	68.1	<0.001
GAV elevada (%)	54.7	64.7	<0.001
Tabaquismo actual (%)	22.6	11.6	<0.001
Hipoadiponectinemia (%)	42.9	57.6	<0.001
PCR >3 mg/L (%)	26.7	20.5	0.002
Hiperuricemia (%)	20.5	36.1	<0.001

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartil] o porcentaje. Las comparaciones se hicieron usando la prueba *t* de Student o la prueba *U* de Mann-Whitney para variables continuas y la prueba de chi-cuadrada para variables categóricas. C-LDL, colesterol en lipoproteínas de baja densidad; C no HDL, colesterol no HDL; HDL, lipoproteínas de alta densidad; PCR, proteína C reactiva de alta sensibilidad; GAV, grasa abdominal visceral; UI, unidades internacionales.

Asociación de polimorfismos de *IL-12B* con EACp

La distribución de los polimorfismos rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694 y rs1368439 fue similar en pacientes con EACp e individuos control. Por otro lado, bajo diferentes modelos de herencia, el polimorfismo rs1363670 se asoció con bajo riesgo de EACp (RM = 0.718, $p_{\text{dominante}} = 0.034$; RM = 0.701, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.024$; RM = 0.702, $p_{\text{codominante1}} = 0.025$) (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación de los polimorfismos del gen IL-12B y la EACp.

Polimorfismo	Frecuencia genotípica			FAM	Modelo	RM [95% CI]	p		
rs1368439	TT	TG	GG		Aditivo	0.906 [0.680-1.208]	0.503		
					Dominante	0.890 [0.655-1.209]	0.456		
					Recesivo	1.104 [0.281-4.342]	0.888		
	Control (n=1030)	0.856	0.137	0.007	0.075	Codominante 1	0.882 [0.646-1.206]	0.431	
						Codominante 2	1.086 [0.276-4.275]	0.906	
						Heterocigoto	0.882 [0.646-1.204]	0.429	
		EACp (n=1133)	0.867	0.129	0.005	0.069	Aditivo	0.917 [0.786-1.070]	0.270
							Dominante	0.876 [0.702-1.093]	0.242
							Recesivo	0.923 [0.692-1.231]	0.586
EACp (n=1133)	0.351	0.499	0.150	0.399	Codominante 1	0.896 [0.711-1.129]	0.352		
					Codominante 2	0.852 [0.621-1.168]	0.319		
					Heterocigoto	0.926 [0.750-1.143]	0.475		
	rs2853694	TT	TG	GG		Aditivo	1.111 [0.945-1.305]	0.202	
						Dominante	1.148 [0.939-1.416]	0.199	
						Recesivo	1.127 [0.786-1.615]	0.517	
Control (n=1030)		0.498	0.405	0.097	0.300	Codominante 1	1.137 [0.912-1.418]	0.255	
						Codominante 2	1.197 [0.823-1.742]	0.347	
						Heterocigoto	1.104 [0.893-1.365]	0.361	
		EACp (n=1133)	0.468	0.436	0.096	0.314	Aditivo	0.914 [0.785-1.065]	0.249
							Dominante	0.874 [0.699-1.092]	0.235
							Recesivo	0.914 [0.690-1.210]	0.529
EACp (n=1133)	0.347	0.495	0.158	0.406	Codominante 1	0.882 [0.697-1.117]	0.298		
					Codominante 2	0.848 [0.620-1.161]	0.305		
					Heterocigoto	0.932 [0.755-1.151]	0.513		
	rs3212220	CC	CA	AA		Aditivo	0.914 [0.785-1.065]	0.249	
						Dominante	0.874 [0.699-1.092]	0.235	
						Recesivo	0.914 [0.690-1.210]	0.529	
Control (n=1030)		0.332	0.492	0.176	0.422	Codominante 1	0.882 [0.697-1.117]	0.298	
						Codominante 2	0.848 [0.620-1.161]	0.305	
						Heterocigoto	0.932 [0.755-1.151]	0.513	
		EACp (n=1133)	0.347	0.495	0.158	0.406	Aditivo	0.770 [0.578-1.025]	0.074
							Dominante	0.745 [0.551-1.008]	0.057
							Recesivo	1.016 [0.253-4.080]	0.982
EACp (n=1133)	0.872	0.124	0.004	0.066	Codominante 1	0.737 [0.542-1.003]	0.052		
					Codominante 2	0.975 [0.243-3.918]	0.971		
					Heterocigoto	0.737 [0.542-1.003]	0.052		
	rs1363670	GG	GC	CC		Aditivo	0.745 [0.553-1.003]	0.053	
						Dominante	0.718 [0.528-0.976]	0.034	
						Recesivo	2.035 [0.298-13.87]	0.468	
Control (n=1030)		0.846	0.151	0.003	0.079	Codominante 1	0.701 [0.515-0.958]	0.025	
						Codominante 2	1.941 [0.284-13.25]	0.499	
						Heterocigoto	0.701 [0.514-0.955]	0.024	
		EACp (n=1133)	0.877	0.120	0.003	0.063	Aditivo	0.965 [0.823-1.131]	0.658
							Dominante	0.998 [0.807-1.235]	0.987
							Recesivo	0.857 [0.614-1.197]	0.365
EACp (n=1133)	0.351	0.499	0.150	0.344	Codominante 1	1.032 [0.825-1.290]	0.785		
					Codominante 2	0.871 [0.612-1.240]	0.445		
					Heterocigoto	1.062 [0.860-1.311]	0.578		

Los modelos fueron ajustados por edad, sexo, IMC, tabaquismo actual, colesterol LDL, DM2 y apoA. FAM = frecuencia de alelo menor, IC = intervalo de confianza, OR = razón de momios.

Los modelos de herencia fueron ajustados por edad, sexo, IMC, tabaquismo, C-LDL, DM2 y apoA.

Asociación de los polimorfismos de *IL-12B* con factores de riesgo cardiovascular

La asociación de los polimorfismos del gen *IL-12B* con factores de riesgo cardiovascular se evaluó de forma independiente en pacientes con EACp e individuos control. En los individuos control, bajo diferentes modelos de herencia, los polimorfismos rs3212227 (RM = 0.759, $p_{\text{aditivo}} = 0.031$; RM = 0.603, $p_{\text{dominante}} = 0.008$; RM = 0.693, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.040$; RM = 0.605, $p_{\text{codominante1}} = 0.011$), rs3212220 (RM = 0.770, $p_{\text{aditivo}} = 0.041$; RM = 0.585, $p_{\text{dominante}} = 0.005$; RM = 0.646, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.015$; RM = 0.558, $p_{\text{codominante1}} = 0.004$), y rs6887695 (RM = 0.660, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.021$; RM = 0.652, $p_{\text{codominante1}} = 0.025$) se asociaron con mayor riesgo de presentar altos niveles de grasa abdominal subcutánea (GAS > p75), mientras que el polimorfismo rs6887695 se asoció con un mayor riesgo de obesidad central (RM = 2.272, $p_{\text{recesivo}} = 0.029$; RM = 2.369, $p_{\text{codominante1}} = 0.030$) (Tabla 10).

Tabla 10. Asociación de los polimorfismos del gen *IL-12B* con la presencia de parámetros cardiometabólicos en individuos control.

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Modelo	RM [IC 95%]	p
GAS > p75							
rs3212227	TT	TG	GG				
No(n=519)	0.320	0.500	0.180	0.430	Aditivo	0.759 [0.590-0.976]	0.031
Si (n=511)	0.359	0.486	0.155	0.397	Dominante	0.603 [0.415-0.874]	0.008
					Codominante 1	0.605 [0.410-0.893]	0.011
					Heterocigoto	0.693 [0.489-0.984]	0.040
rs3212220	CC	CA	AA				
No (n=519)	0.316	0.500	0.184	0.433	Aditivo	0.770 [0.600-0.990]	0.041
Si (n=511)	0.355	0.476	0.169	0.406	Dominante	0.585 [0.402-0.850]	0.005
					Codominante 1	0.558 [0.375-0.829]	0.004
					Heterocigoto	0.646 [0.455-0.917]	0.015
rs6887695	GG	GC	CC				
No (n=519)	0.378	0.492	0.129	0.375	Codominante 1	0.652 [0.448-0.947]	0.025
Si (n=511)	0.458	0.428	0.114	0.328	Heterocigoto	0.660 [0.465-0.938]	0.021
Obesidad central							
rs6887695	GG	GC	CC				
No(n=194)	0.407	0.474	0.119	0.356	Recesivo	2.272 [1.090-4.736]	0.029
Si (n=836)	0.420	0.455	0.125	0.353	Codominante 1	2.369 [1.086-5.169]	0.030

Todos los modelos se ajustaron por edad, sexo e IMC. FAM, frecuencia del alelo menor; IC, intervalo de confianza; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza; GAS, grasa abdominal subcutánea.

En los pacientes con EACp, bajo diferentes modelos de herencia, el polimorfismo rs2853694 se asoció con un menor riesgo de resistencia a la insulina (RM = 0.743, $p_{\text{aditivo}} = 0.005$; RM = 0.711, $p_{\text{dominante}} = 0.015$; RM = 0.624, $p_{\text{recesivo}} = 0.034$; RM = 0.543, $p_{\text{codominante1}} = 0.009$). Los polimorfismos rs3212227 (RM = 0.757, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.027$) y rs3212220 (RM = 0.768, $p_{\text{heterocigoto}} = 0.038$) se asociaron con un bajo riesgo de síndrome metabólico. El polimorfismo rs6887695 se asoció con riesgo alto a hiperuricemia (RM = 1.565, $p_{\text{recesivo}} = 0.025$) (Tabla 11).

Tabla 11. Asociación de los polimorfismos del gen IL-12B con la presencia de parámetros cardiometabólicos en pacientes con EACp.

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Modelo	RM [IC 95%]	p
Resistencia a la insulina							
rs2853694	TT	TG	GG				
No(n=309)	0.410	0.466	0.125	0.356	Aditivo	0.743 [0.605-0.913]	0.005
Si (n=824)	0.490	0.423	0.087	0.300	Dominante	0.711 [0.541-0.935]	0.015
					Recesivo	0.624 [0.404-0.964]	0.034
					Codominante 2	0.543 [0.343-0.860]	0.009
Síndrome metabólico							
rs3212227	TT	TG	GG				
No (n=478)	0.328	0.536	0.136	0.404	Heterocigoto	0.757 [0.589-0.971]	0.027
Si (n=655)	0.368	0.472	0.160	0.396			
rs3212220	CC	CA	AA				
No (n=478)	0.326	0.531	0.142	0.408	Heterocigoto	0.768 [0.598-0.986]	0.038
Si (n=655)	0.362	0.469	0.169	0.404			
Hiperuricemia							
rs6887695	GG	GC	CC				
No(n=717)	0.414	0.495	0.091	0.338	Recesivo	1.565 [1.059-2.314]	0.025
Si (n=416)	0.421	0.446	0.133	0.356			

Todos los modelos se ajustaron por edad, sexo e IMC. FAM, frecuencia del alelo menor; IC, intervalo de confianza; RM, razón de momios; IC, intervalo de confianza.

Análisis de haplotipos

En el análisis de haplotipos, únicamente los polimorfismos rs3112227 y rs3212220 estuvieron en desequilibrio de ligamiento ($D' = 0.95$ y $r^2 = 0.88$) (Fig. 3). Se observaron siete diferentes haplotipos, sin embargo, ninguno de estos se asoció con la presencia de EACp (Tabla 12).

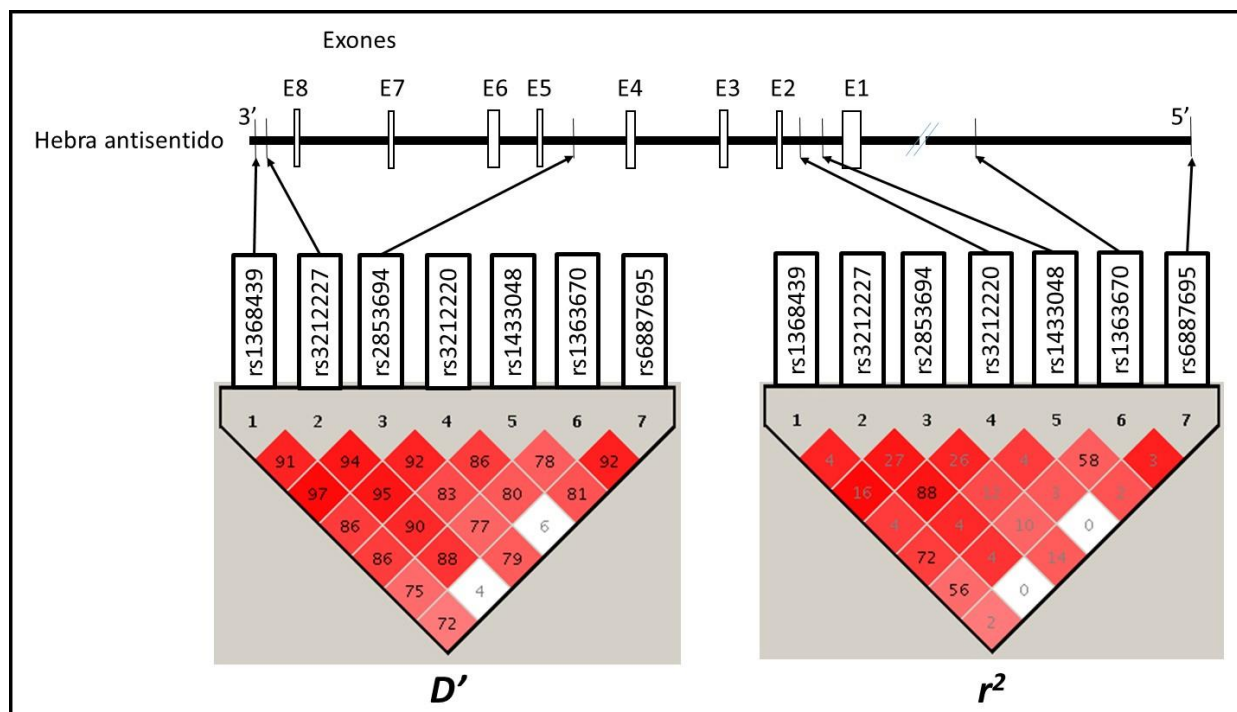


Fig. 3. Gráfico de desequilibrio de ligamiento de haplotipos del gen IL-12B. Los coeficientes de desequilibrio de ligamiento pareado D' y r^2 se muestran en cada celda. En el haplotipo, el orden de los polimorfismos está de acuerdo con su posición en el cromosoma.

Tabla 12. Frecuencia de los haplotipos del gen IL-23A en pacientes con EACp e individuos control.

Haplotipos	Bloque	EACp		p
		Si	No	
H1	TGTAAGG	0.252	0.246	0.626
H2	TTGCAGG	0.218	0.197	0.086
H3	TTTCAGCT	0.177	0.167	0.423
H4	TGTAAGC	0.135	0.148	0.228
H5	TTTCAGG	0.092	0.095	0.704
H6	GTGCGCG	0.048	0.054	0.3214
H7	TTGCAGC	0.017	0.054	0.175

El orden de los polimorfismos en el haplotipo está en función de su posición en el cromosoma.

Discusión

Polimorfismos del gen *IL-23A*

La IL-23 es una citocina que forma parte de la familia de la IL-12 junto con las citocinas IL-12, IL-27 e IL-35. Esta familia consiste de un grupo de citocinas heterodiméricas α/β compuestas de una de tres cadenas alfa (p19 codificada por el gen *IL-23A*, p28 codificada por el gen *IL-27p28*, o p35 codificada por el gen *IL-12A*) y una de dos tipos de cadena beta (p40 codificada por el gen *IL-12B* y EBI3 codificada por el gen *EBI3*) (125).

Así, se ha descrito a la IL-23 como una citocina heterodimérica con importantes efectos sobre el sistema inmunológico a través de su participación en el proceso inflamatorio. La IL-23 se ha asociado con el desarrollo de varios trastornos inflamatorios como la artritis reumatoide (176), lupus eritematoso sistémico (177), psoriasis (178), colitis ulcerosa (179) y enfermedad de intestino irritable (180).

Su función en el desarrollo de la aterosclerosis ha sido estudiada en modelos animales y humanos obteniéndose resultados contradictorios (128,134,148,155). Oppmann y colaboradores describieron que la secreción de IL-23 está limitada por la expresión tejido célula específica (células dendríticas activadas) de la subunidad p19 (144), subunidad codificada por el gen *IL-23A*. Se ha sugerido que las variantes genéticas funcionales dentro del gen *IL-23A* pueden tener un impacto sobre la respuesta inmune y pueden ser investigadas mediante estudios de asociación genética (181). Se han publicado estudios de asociación de polimorfismos del gen *IL-23A* con algunas enfermedades de naturaleza inflamatoria (149–151). Los polimorfismos *IL-23A* rs2066808, rs2371494 y rs11575248 fueron asociados con esclerosis múltiple en la población china Han (151), mientras que en Brasileños el haplotipo GG de los polimorfismos rs11171806 y rs2066808 se asoció con disminución del riesgo de diabetes mellitus tipo 1A (150). En cambio, en cohortes alemanas y chinas, el polimorfismo rs2066808 se asoció con susceptibilidad a psoriasis (182,183), en tanto que en españoles, estos polimorfismos fueron asociados con artritis psoriásica (184). Lo anterior fue confirmado en una cohorte rumana independiente y una cohorte caucásica compuesta por individuos británicos e irlandeses. En ambas cohortes se confirmaron las asociaciones de los polimorfismos rs11171806 y rs2066808 con artritis psoriásica, una enfermedad con un componente altamente inflamatorio (185,186). Hasta donde sabemos, no hay estudios que hayan evaluado la asociación de polimorfismos dentro o cerca del gen *IL23A* con el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. En el presente trabajo, en un grupo de 2249 individuos mexicanos (1160 pacientes con EACp y 1089 individuos control), estudiamos la asociación de dos polimorfismos [exón 3

(rs11171806) y en la región no traducida 3' (rs2066808) del gen *IL-23A* con la presencia de la EACp. Se encontró que el polimorfismo rs2066808 podría aumentar el riesgo genético de desarrollar EACp. Este resultado está acorde con los efectos pro-inflamatorios reportados para esta interleucina. Es importante señalar que, este polimorfismo está localizado cerca del gen *IL-23A*, en una región intrónica del gen *STAT2* y podría alterar el corte y empalme (splicing) del ARNm y de esta forma generar una isoforma de esta molécula con una función alterada. La proteína *STAT2* es un activador de la transcripción relacionado con la ruta de transducción de señales del interferón tipo 1 (187), y con funciones inmunosupresoras (188). La función potencial de *STAT2* en la aterosclerosis se ha descrito previamente en modelos animales (189). Se reportaron que los ratones deficientes en *ApoA* y alimentados con una dieta occidental, estaban protegidos contra la aterosclerosis, sugiriendo que esta protección estaba relacionada con la reducción en la expresión del gen *STAT2* (189). *STAT2* junto con el factor regulador de interferón (con siglas en inglés de IRF) juegan una función fundamental en los procesos celulares como en el desarrollo, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular, respuesta inmune e inflamación (190), todos estos procesos han sido involucrados en el desarrollo de aterosclerosis.

En pacientes con EACp, el polimorfismo rs2066808 podría disminuir el riesgo de hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hipoalfalipoproteinemia, y aumentar el riesgo de hiperuricemia, mientras que el rs11171806 podría disminuir el riesgo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. En contraste, en controles, el rs2066808 podría disminuir el riesgo de hiperinsulinemia. Como se puede observar, la asociación de los polimorfismos con los parámetros cardiometabólicos fue diferente en los pacientes con EACp y en los individuos control, con el efecto más importante en los pacientes. En el grupo de pacientes, ambos polimorfismos podrían disminuir el riesgo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, dos características relacionadas. Así, los pacientes con los alelos rs2066808G y rs11171806A presentaron baja resistencia a la insulina, y en consecuencia, ellos no necesitan el binomio resistencia-a-la-insulina/compensación-por-hiperinsulinemia, teniendo bajo riesgo para esta condición.

En resumen, los datos sugieren que el polimorfismo rs2066808 localizado cerca del gen *IL-23A* puede incrementar el riesgo de EACp. Ambos polimorfismos estudiados se asociaron con parámetros cardiometabólicos (hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipoalfalipoproteinemia e hiperuricemia) principalmente en el grupo de pacientes.

Polimorfismos del gen *IL-12B*

En nuestro estudio reportamos la asociación del polimorfismo *IL-12B* rs1363670 con bajo riesgo de presentar EACp. En individuos control, los polimorfismos rs3212227, rs321220 y rs6887695 se

asociaron con bajo riesgo de presentar altos niveles de grasa abdominal subcutánea (> p75), mientras que el polimorfismo rs6887695 se asoció con riesgo elevado de obesidad central. En contraste, en pacientes con EACp, el polimorfismo rs2853694 se asoció con bajo riesgo de resistencia a la insulina. Los polimorfismos rs3212227 y rs3212220 se asociaron con bajo riesgo de síndrome metabólico y el polimorfismo rs3887695 se asoció con un riesgo elevado de hiperuricemia. Los polimorfismos rs3212227 y 3212220 se asociaron en individuos control con un bajo riesgo de presentar altos niveles de grasa abdominal subcutánea y en pacientes con EACp con un bajo riesgo de síndrome metabólico. Como puede observarse los resultados en los genes *IL-23A* e *IL-12B* son concordantes. Esto es, en pacientes con EACp, se asoció al polimorfismo rs2853694 con bajo riesgo de resistencia a la insulina. El polimorfismo rs6887695 se asoció con riesgo elevado de hiperuricemia. Se ha reportado que la resistencia a la insulina está asociada significativamente con el desarrollo y progresión de la aterosclerosis coronaria (191,192). Hanley y col., analizaron la cohorte del San Antonio Heart Study (Estudio del corazón de San Antonio) y reportaron una asociación independiente de la resistencia a la insulina y el riesgo de EAC (193). En el mismo sentido, otro artículo publicado en 2009 reportó que la resistencia a la insulina fue por sí sola la causa más frecuente de EAC (194). Otros estudios transversales y prospectivos han provisto evidencia de que la resistencia a la insulina en sujetos no diabéticos es un importante factor de riesgo cardiovascular, independientemente de otros factores de riesgo (195,196). Tomando en cuenta la información expuesta anteriormente, proponemos que los polimorfismos de los genes *IL-12B* e *IL-23A* están asociados con bajo riesgo de resistencia a la insulina y en consecuencia con bajo riesgo de desarrollo de EACp en la población estudiada. Por otro lado, varios meta análisis de estudios observacionales han encontrado que la hiperuricemia puede incrementar significativamente el riesgo de EAC y el riesgo de eventos coronarios (197–200). La asociación de la hiperuricemia con EAC puede ser explicada por el hecho de que el ácido úrico puede estimular la proliferación de células musculares lisas, reducir la producción de óxido nítrico y disminuir la actividad vascular del óxido nítrico (201,202). Además, es bien conocido que altos niveles de ácido úrico están asociados con altos niveles de citocinas proinflamatorias (203) y, en consecuencia, con un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular (204). En los pacientes con EACp del presente estudio, el polimorfismo rs6887695 del gen *IL-12B* se asoció con riesgo elevado de hiperuricemia. Basados en este resultado, y dado que el polimorfismo rs2066808 del gen *IL-23A* también se asoció con riesgo elevado de hiperuricemia, sugerimos un nexo entre estos dos polimorfismos, el riesgo elevado a hiperuricemia y el riesgo de EACp.

Los polimorfismos del gen de *IL-12B* para los cuales se detectó una asociación en el presente estudio, han sido asociados previamente con algunas enfermedades. A saber, el polimorfismo rs1363670 fue asociado con la enfermedad de Crohn (205–207), mientras que el polimorfismo

rs3212227 fue asociado con artritis reumatoide (208,209), tuberculosis pulmonar (210), cáncer de mama (211), diabetes mellitus tipo 1 (212) y espondilitis anquilosante (213). Por otro lado, el polimorfismo rs3212220 mostró asociación significativa con tuberculosis pulmonar (210,214) y psoriasis (215). El polimorfismo rs2853694 se asoció con lepra (216) y la enfermedad de Crohn (217). Además, se documentó una asociación de esclerosis múltiple recurrente-remitente (218) y artritis psoriásica (211) con el polimorfismo rs6887695. Es importante hacer notar que, algunos de estos polimorfismos fueron asociados con variaciones en los niveles/expresión de la proteína p40 e IL-23 (209,211,212,219). El polimorfismo rs3212227 fue asociado con variación en los niveles de IL-12p40 y/o IL-23 en pacientes con espondilitis anquilosante, artritis reumatoide y brucelosis (209,220,221). El polimorfismo rs3212227 también se asoció con la expresión de ARNm de la IL-12 en individuos sanos (222). Por otro lado, el polimorfismo rs3212220 fue asociado con variación en los niveles de IL-12 en pacientes con tuberculosis pulmonar (214). Estos datos apoyan la asociación de los polimorfismos rs3212227 y rs3212220 con GAS > p75 y síndrome metabólico en nuestro estudio. Solo dos estudios han analizado la asociación de los polimorfismos del gen *IL-12B* con la enfermedad cardiovascular, uno en pacientes con EAC (141) y el otro en pacientes con IAM (142). Se ha reportado que la IL-12B puede inducir la expresión de IFN- γ teniendo un efecto importante en la diferenciación y proliferación de linfocitos Th1 (223). Por otro lado, se reportó que la deficiencia de la proteína p40 tiene como resultado disminución en la migración de células dendríticas y en la activación de células T vírgenes (224–226).

La subunidad beta p40 de la IL-23 también es parte de la IL-12 y, junto con las interleucinas IL-23, IL-27 e IL-35 constituyen la familia de la citocina IL-12 (128). La interleucina IL-12 es conocida como el controlador maestro de la respuesta Th1: Esta citocina estimula a las células T y NK para producir INF- γ , el cual induce múltiples procesos proaterogénicos en la lesión aterosclerosa (227). Se ha reportado que la homodimerización de la subunidad p40 puede generar IL12p80, la cual anula la señalización mediada por IL-12 e IL-23 a través de la unión a la subunidad IL-12 β 2R.

En resumen, nuestros resultados para los polimorfismos del gen *IL-12B* indicaron que el polimorfismo rs1363670 del gen se asoció con bajo riesgo de EACp. En controles, se encontró una asociación con GAS > 75 (polimorfismos rs3212227, rs3212220 y rs6887695) y con obesidad central (rs6887695). Por otro lado, en pacientes con EACp, el polimorfismo rs2853694 se asoció con bajo riesgo a resistencia a la insulina, los polimorfismos rs3212227 y rs3212220 con bajo riesgo de síndrome metabólico y el polimorfismo rs6887695 con riesgo elevado de hiperuricemia.

Las fortalezas del presente trabajo son las que a continuación se enuncian. Se incluyó a individuos pertenecientes a una cohorte mexicana bien analizada desde el punto de vista demográfico, clínico, antropométrico, bioquímico y tomográfico. Esto nos permitió analizar un importante número de factores de riesgo cardiovascular y, al mismo tiempo, nos permitió ajustar los

diferentes análisis considerando posibles variables confusoras. En el grupo de individuos control, se realizó una tomografía axial computarizada con la cual se detectaron individuos con CAC mayor a cero y por tanto con aterosclerosis subclínica. Estos individuos no fueron incluidos en el grupo control. Es importante señalar que, considerando que la población mexicana es una mezcla de genes provenientes de poblaciones caucásicas, amerindias y africanas, se evaluó a los individuos control y pacientes del estudio GEA con 256 marcadores de ancestría. Los resultados de este análisis mostraron que ambos grupos presentaron una base genética semejante evitando así un sesgo por estratificación de la población estudiada (228,229). Dentro de las limitaciones del trabajo se incluyen que no fue posible medir la expresión de los genes *IL-23A* e *IL-12B* en los grupos estudiados y, por tanto, no se pudo establecer si había diferencias en la expresión de estos genes en los grupos control y pacientes con EACp. Esta limitación también nos impidió establecer si existían asociaciones entre los genotipos de los polimorfismos aquí estudiados y la expresión de los genes. Por otro lado, no incluimos diseños experimentales para establecer la funcionalidad de los polimorfismos estudiados. Finalmente, no podemos hacer conclusiones sobre causalidad debido al carácter transversal del presente estudio.

Conclusiones

En el caso del gen *IL-23A* que codifica para la subunidad p19 o IL23A, el polimorfismo rs2066808 localizado cerca del gen *IL-23A* puede incrementar el riesgo de EACp. Ambos polimorfismos estudiados (rs2066808 y rs11171806) se asociaron con parámetros cardiometabólicos (hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipoalfalipoproteinemia e hiperuricemia) principalmente en el grupo de pacientes.

En el gen *IL-12B*, el polimorfismo rs1363670 se asoció con bajo riesgo de presentar EACp. En controles, se encontró una asociación con GAS > 75 (polimorfismos rs3212227, rs3212220 y rs6887695) y con obesidad central (rs6887695). Por otro lado, en pacientes con EACp, el polimorfismo rs2853694 se asoció con bajo riesgo de resistencia a la insulina, los polimorfismos rs3212227 y rs3212220 con bajo riesgo de síndrome metabólico y el polimorfismo rs6887695 con riesgo elevado de hiperuricemia.

Perspectivas

- Medir la expresión de los genes *IL-23A* e *IL-12B* en los grupos estudiados para establecer si hay diferencias en la expresión de estos genes en los grupos control y pacientes con EACp. Lo anterior mediante el uso de diseños experimentales para establecer la funcionalidad de los polimorfismos estudiados.
- Establecer la asociación entre los genotipos de los polimorfismos estudiados en la presente tesis y la expresión de los genes *IL-23A* e *IL-12B*.
- Utilizando el seguimiento a 5 años del estudio basal de proyecto GEA, evaluar si los portadores de los polimorfismos asociados a EACp o a alguna variable metabólica que no presentaban la patología la hayan desarrollado o no.

Referencias

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. World Health Organization; 2017. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. WHO CVD Risk Chart Working Group. World Health Organization Cardiovascular Disease Risk Charts: Revised Models to Estimate Risk in 21 Global Regions. *Lancet Glob Health*. 2019;7(10):e1332–45.
3. GBD 2017 DALYs, HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1859–922.
4. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mortalidad [Internet]. INEGI. 2021 [cited 2021 Mar 18]. Available from: https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos.asp?#Regreso&c=11816
5. Steenbergen C, Frangogiannis NG. Ischemic heart disease. In: Hill JA, Olson EN, editors *Muscle Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*. Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press; 2012. p. 495–521.
6. Buja LM, Vander-Heide RS. Pathobiology of Ischemic Heart Disease: Past, Present and Future. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2016;25(3):214–20.
7. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10):e56–528.
8. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326(4):242–50.
9. Ryan CJ, DeVon HA, Zerwic JJ. Typical and atypical symptoms: diagnosing acute coronary syndromes accurately. *Am J Nurs*. 2005;105(2):34–6.
10. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410–22.
11. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115–26.
12. Sanz J, Moreno PR, Fuster V. The year in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(13):1131–43.
13. Mauricio D, Castelblanco E, Alonso N. Cholesterol and Inflammation in Atherosclerosis: An Immune-Metabolic Hypothesis. *Nutrients*. 2020;12:2444.
14. Alkhalil M, Choudhury RP. Current concepts in atherosclerosis. *Indian J Thorac Cardiovasc Surg*. 2018;34 (Suppl 3):198–205.
15. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2015;116:531–49.

16. Pirahanchi Y, Sinawe H, Dimri M. Biochemistry, LDL Cholesterol. In: In: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island, Florida: StatPearls Publishing; 2020 [cited 2021 Feb 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519561/>
17. Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol*. 2018;175:1279–92.
18. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Linton EF, Jerome G, Song WL, et al. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al, editors Endotext [Internet] [Internet]. South Dartmouth (Massachusetts): MDTText.com, Inc.; 2019 [cited 2021 Feb 14]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
19. Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: Inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med*. 2014;70:117–28.
20. Shapiro MD, Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Research*. 2017;6:134.
21. Albertini R, Moratti R, Luca GD. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. *Curr Mol Med*. 2002;2:579–92.
22. Williams JW, Zaitsev K, Kim KW, Ivanov S, Saunders BT, Schrank PR, et al. Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nat Immunol*. 2020;21:1194–204.
23. Caligiuri G. CD31 as a Therapeutic Target in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2020;126:1178–89.
24. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2292–301.
25. Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Ohtsuki T, Hori M. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice. *Atherosclerosis*. 2002;160:305–10.
26. Mu W, Chen M, Gong Z, Zheng F, Xing Q. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in the aortic tissues of atherosclerotic patients and the associated clinical implications. *Exp Ther Med*. 2015;10:423–8.
27. Coll B, Alonso-Villaverde C, Joven J. Monocyte chemoattractant protein-1 and atherosclerosis: is there room for an additional biomarker? *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2007;383:21–9.
28. Gonzalez L, Trigatti BL. Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Can J Cardiol*. 2017;33:303–12.
29. Miteva K, Madonna R, Caterina RD, Linthout SV. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2018;107:67–77.
30. Sukhorukov VN, Khotina VA, Chegodaev YS, Ivanova E, Sobenin IA, Orekhov AN. Lipid Metabolism in Macrophages: Focus on Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2020;8:262.
31. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317–25.
32. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233–41.

33. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223–61.
34. Chistiakov DA, Kashirskikh DA, Khotina VA, Grechko AV, Orekhov AN. Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis The Role of Myeloid Cells. *J Clin Med.* 2019;8:1798.
35. Hedrick CC. Lymphocytes in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:253–7.
36. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:387–401.
37. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12:204–12.
38. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
39. Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S364–9.
40. Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, et al. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2003;59:234–40.
41. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous Interferon- γ Enhances Atherosclerosis in Apolipoprotein E^{-/-} Mice. *Am J Pathol.* 2000;157:1819–24.
42. Davenport P, Tipping PG. The Role of Interleukin-4 and Interleukin-12 in the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Am J Pathol.* 2003;163:1117–25.
43. Engelbertsen D, Andersson L, Ljungcrantz I, Wigren M, Hedblad B, Nilsson J, et al. T-Helper 2 Immunity Is Associated With Reduced Risk of myocardial infarction and stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:637–44.
44. Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto-Jr AM, Hajjar DP, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *J Lipid Res.* 2000;41:688–96.
45. Lee YW, Kühn H, Hennig B, Neish AS, Toborek M. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:83–94.
46. Walch L, Massade L, Dufilho M, Brunet A, Rendu F. Pro-atherogenic effect of interleukin-4 in endothelial cells: modulation of oxidative stress, nitric oxide and monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Atherosclerosis.* 2006;187:285–91.
47. Sasaguri T, Arima N, Tanimoto A, Shimajiri S, Hamada T, Sasaguri Y. A role for interleukin 4 in production of matrix metalloproteinase 1 by human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1998;138:247–53.
48. Cornicelli JA, Butteiger D, Rateri DL, Welch K, Daugherty A. Interleukin-4 augments acetylated LDL-induced cholesterol esterification in macrophages. *J Lipid Res.* 2000;41:379–83.
49. Witztum JL, Binder CJ, Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Shaw PX, et al. Natural antibodies in murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2008;9:190–5.

50. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485–517.
51. Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2011;106:787–95.
52. Madhur MS, Funt SA, Li L, Vinh A, Chen W, Lob HE, et al. Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1565–72.
53. Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, Celik S, Lasitschka F, et al. Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in apoE-deficient Mice. *J Imm.* 2009;183(12):8167–75.
54. Ley K, Smith E, Stark MA. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol Res.* 2006;34:229–42.
55. Chaudhry A, Samstein RM, Treuting P, Liang Y, Pils MC, Heinrich JM, et al. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity.* 2011;34:566–78.
56. Subramanian M, Thorp E, Hansson GK, Tabas I. Treg-mediated suppression of atherosclerosis requires MYD88 signaling in DCs. *J Clin Invest.* 2013;123:179–88.
57. Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol.* 2013;25:615–22.
58. Ray A, Khare A, Krishnamoorthy N, Qi Z, Ray P. Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol.* 2010;3:216–29.
59. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2010;134:33–46.
60. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:557–68.
61. Nowak M, Stein-Streilein J. Invariant NKT cells and tolerance. *Int Rev Immunol.* 2007;26:95–119.
62. Getz GS, Reardon CA. Natural killer T cells in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14:304–14.
63. Chan WL, Pejnovic N, Hamilton H, Liew TV, Popadic D, Poggi A, et al. Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells. *Circ Res.* 2005;96:675–83.
64. Bobryshev YV, Lord RSA. Co-accumulation of dendritic cells and natural killer T cells within rupture-prone Regions in human atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 2005;53:781–5.
65. Tsiantoulas D, Sage AP, Mallat Z, Binder CJ. Targeting B cells in atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:296–302.
66. Graf R, Seagal J, Otipoby KL, Lam KP, Ayoub S, Zhang B, et al. BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science.* 2019;363:748–53.

67. Baumgarth N. A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2017;199:3387–94.
68. Hosseini H, Li Y, Kanellakis P, Tay C, Cao A, Tipping P, et al. Phosphatidylserine liposomes mimic apoptotic cells to attenuate atherosclerosis by expanding polyreactive IgM producing B1a lymphocytes. *Cardiovasc Res*. 2015;106:443–52.
69. Kyaw T, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Opposing roles of B lymphocyte subsets in atherosclerosis. *Autoimmunity*. 2017;50:52–6.
70. Ma SD, Mussbacher M, Galkina EV. Functional Role of B Cells in Atherosclerosis. *Cells*. 2021;10:270.
71. Srikakulapu P, McNamara CA. B cells and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312:H1060–7.
72. Tay C, Liu YH, Kanellakis P, Kallies A, Li Y, Cao A, et al. Follicular B Cells Promote Atherosclerosis via T Cell-Mediated Differentiation Into Plasma Cells and Secreting Pathogenic Immunoglobulin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38:e71–84.
73. Brown JC, Gerhardt TE, Kwon E. Risk Factors For Coronary Artery Disease. In: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island, Florida: StatPearls Publishing; 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554410/>
74. Andersson C, Johnson AD, Benjamin EJ, Levy D, Vasan RS. 70-year legacy of the Framingham Heart Study. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(11):687–98.
75. Rodríguez G, Mago N, Rosa F. El papel de la inflamación en la aterogénesis. *Investig Clin*. 2009;50(1):109–29.
76. Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620–36.
77. Pencina MJ, Navar AM, Wojdyla D, Sanchez RJ, Khan I, Ellassal J, et al. Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2019;139(13):1603–11.
78. Hong YM. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean Circ J*. 2010;40:1–9.
79. Zieske AW, Malcom GT, Strong JP. Natural history and risk factors of atherosclerosis in children and youth: the PDAY study. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2002;21:213–37.
80. McMahan CA, Gidding SS, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP, McGill-Jr HC, et al. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. *Pediatrics*. 2006;118:1447–55.
81. Insull-Jr W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*. 2009;122(1 Suppl):S3–14.
82. Sanchis-Gomar F, Perez-Quilis C, Leischik R, Lucia A. Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome. *Ann Transl Med*. 2016;4(13):256.
83. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and Risk of Cardiovascular Disease: The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1976;85(4):447–52.

84. Seda O, Tremblay J, Gaudet D, Brunelle PL, Gurau A, Ettore Merlo, et al. Systematic, genome-wide, sex-specific linkage of cardiovascular traits in French Canadians. *Hypertension*. 2008;51(4):1156–62.
85. Hochner-Celnikier D, Chajek-Shaul T, Manor O. Sex differences in risk factors for coronary artery disease and stroke in men and women aged 45-65 years. *Heart Asia*. 2013;5(1):229–32.
86. Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(4):1348–59.
87. Vitale C, Fini M, Speziale G, Chierchia S. Gender differences in the cardiovascular effects of sex hormones. *Fundam Clin Pharmacol*. 2010;24(6):675–85.
88. Wada H, Miyauchi K, Daida H. Gender differences in the clinical features and outcomes of patients with coronary artery disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2019;17(2):127–33.
89. Matthews KA, Meilahn E, Kuller LH, Kelsey SF, Caggiula AW, Wing RR. Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1989;321(10):641–6.
90. Dallongeville J, Bacquer DD, Heidrich J, Backer GD, Prugger C, Kotseva K, et al. Gender differences in the implementation of cardiovascular prevention measures after an acute coronary event. *Heart*. 2010;96(21):1744–9.
91. Maas AHEM, Appelman YEA. Gender differences in coronary heart disease. *Neth Heart J*. 2010;18(12):598–602.
92. Zhao M, Vaartjes I, Graham I, Grobbee D, Spiering W, Kerstin Klipstein-Grobusch, et al. Sex Differences in Risk Factor Management of Coronary Heart Disease Across Three Regions. *Heart*. 2017;103(20):1587–94.
93. Woodward M. Cardiovascular Disease and the Female Disadvantage. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(7):1165.
94. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143–421.
95. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: Discovery, biological and clinical translation. *Nat Rev Genet*. 2017;18(6):331–44.
96. Gertler MM, Garn SM, White PD. Young candidates for coronary heart disease. *J Am Med Assoc*. 1951;147(7):621–5.
97. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, Faire U de. Genetic Susceptibility to Death from Coronary Heart Disease in a Study of Twins. *N Engl J Med*. 1994;330(15):1041–6.
98. Won HH, Natarajan P, Dobbyn A, Jordan DM, Roussos P, Lage K, et al. Disproportionate Contributions of Select Genomic Compartments and Cell Types to Genetic Risk for Coronary Artery Disease. *PLoS Genet*. 2015;11(10):e1005622.

99. Zeng L, Talukdar HA, Koplev S, Giannarelli C, Ivert T, Gan LM, et al. Contribution of Gene Regulatory Networks to Heritability of Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(23):2946–57.
100. Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, Faire UD. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J Intern Med*. 2002;252(3):247–54.
101. Wienke A, Holm NV, Skytthe A, Yashin AI. The heritability of mortality due to heart diseases: a correlated frailty model applied to Danish twins. *Twin Res Off J Pf Int Soc Twin Stud*. 2001;4(4):266–74.
102. Musunuru K, Kathiresan S. Genetics of Common, Complex Coronary Artery Disease. *Cell*. 2019;177(1):132–45.
103. Keats BJB, Sherman SL. Chapter 13 - Population Genetics. In: Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. Sixth edition. San Diego, California: Academic Press; 2013. (ClinicalKey).
104. Lu HC, Chung SS, Fornili A, Fraternali F. Anatomy of protein disorder, flexibility and disease-related mutations. *Front Mol Biosci*. 2015;2:47.
105. Robert F, Pelletier J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Front Genet*. 2018;9:507.
106. Yang Y, Peng X, Ying P, Tian J, Li J, Ke J, et al. AWESOME: a database of SNPs that affect protein post-translational modifications. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D874–80.
107. Ng PC, Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:61–80.
108. Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2009;578:23–39.
109. Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac Medica México*. 2017;153:238–50.
110. Yamaguchi-Kabata Y, Shimada MK, Hayakawa Y, Minoshima S, Chakraborty R, Gojobori T, et al. Distribution and Effects of Nonsense Polymorphisms in Human Genes. *PLoS One*. 2008;3:e3393.
111. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E. Analyzing Effects of Naturally Occurring Missense Mutations. *Comput Math Methods Med*. 2012;2012:805827.
112. Crawford DC, Akey DT, Nickerson DA. The patterns of natural variation in human genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005;6:287–312.
113. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S Am*. 2009;106:9362–7.
114. Ricaño-Ponce I, Wijmenga C. Mapping of immune-mediated disease genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:325–53.
115. Pagani F, Baralle FE. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet*. 2004;5:389–96.

116. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* 2007;8:749–61.
117. 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.* 2013;45(1):25–33.
118. Saade S, Cazier JB, Ghassibe-Sabbagh M, Youhanna S, Badro DA, Kamatani Y, et al. Large Scale Association Analysis Identifies Three Susceptibility Loci for Coronary Artery Disease. *PLoS One.* 2011;6(12):e29427.
119. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515–81.
120. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):969–79.
121. McInnes IB. Chapter 26 - Cytokines. In: Firestein G, Budd R, Gabriel SE, McInnes IB, O’Dell J, editors. *Kelley and Firestein’s Textbook of Rheumatology.* 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017. p. 396–407.
122. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(4):984–1010.
123. Rose-John S, Scheller J, Schaper F. “Family reunion”--A Structured View on the Composition of the Receptor Complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type Cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):471–4.
124. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(2):a028415.
125. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nat Immunol.* 2012;13(8):722–8.
126. Hasegawa H, Mizoguchi I, Chiba Y, Ohashi M, Xu M, Yoshimoto T. Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Front Immunol.* 2016;7:479.
127. Zhang J, Zhang Y, Wang Q, Li C, Deng H, Si C, et al. Interleukin-35 in Immune-Related Diseases: Protection or Destruction. *Immunology.* 2019;157(1):13–20.
128. Posadas-Sánchez R, Vargas-Alarcón G. Innate immunity in coronary disease. The role of interleukin-12 cytokine family in atherosclerosis. *Rev Investig Clin Organo Hosp Enfermedades Nutr.* 2018;70(1):5–17.
129. Zhou RH, Shi Q, Gao HQ, Shen BJ. Changes in Serum Interleukin-8 and Interleukin-12 Levels in Patients with Ischemic Heart Disease in a Chinese Population. *J Atheroscler Thromb.* 2011;8:30–2.
130. Correia LC, Andrade BB, Borges VM, Clarêncio J, Bittencourt AP, Freitas R, et al. Prognostic value of cytokines and chemokines in addition to the GRACE Score in non-ST-elevation acute coronary syndromes. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2010;411:540–5.
131. Lin Y, Huang Y, Lu Z, Luo C, Shi Y, Zeng Q, et al. Decreased Plasma IL-35 Levels Are Related to the Left Ventricular Ejection Fraction in Coronary Artery Diseases. *PLoS One.* 2012;7:e52490.
132. Yong K, Dogra G, Boudville N, Chan D, Adams L, Ching H, et al. Interleukin-12 Is Associated With Arterial Stiffness in Healthy Individuals. *Am J Hypertens.* 2013;26:159–62.

133. Zykov MV, Barbarash OL, Kashtalap VV, Kutikhin AG, Barbarash LS. Interleukin-12 Serum Level Has Prognostic Value in Patients With ST-segment Elevation Myocardial Infarction. *Heart Lung J Crit Care*. 2016;45(4):336–40.
134. Abbas A, Gregersen I, Holm S, Daissormont I, Bjerkeli V, Krohg-Sørensen K, et al. Interleukin 23 Levels Are Increased in Carotid Atherosclerosis: Possible Role for the Interleukin 23/interleukin 17 Axis. *Stroke*. 2015;46(3):793–9.
135. Gregersen I, Sandanger Ø, Askevold ET, Sagen EL, Yang K, Holm S, et al. Interleukin 27 is increased in carotid atherosclerosis and promotes NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2017;12:e0188387.
136. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, Li X, Lasota J, LaForgia S, et al. Assignment of Genes Encoding a Unique Cytokine (IL12) Composed of Two Unrelated Subunits to Chromosomes 3 and 5. *Genomics*. 1992;14(1):59–62.
137. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and Purification of Natural Killer Cell Stimulatory Factor (NKSF), a Cytokine With Multiple Biologic Effects on Human Lymphocytes. *J Exp Med*. 1989;170(3):827–45.
138. Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine With Immunoregulatory Functions That Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:251–76.
139. Uyemura K, Demer LL, Castle SC, Jullien D, Berliner JA, Gately MK, et al. Cross-regulatory Roles of Interleukin (IL)-12 and IL-10 in Atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1996;97(9):2130–8.
140. Opstad TB, Arnesen H, Pettersen AÅ, Seljeflot I. Combined Elevated Levels of the Proinflammatory Cytokines IL-18 and IL-12 Are Associated With Clinical Events in Patients With Coronary Artery Disease: An Observational Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2016;14(5):242–8.
141. Momiyama Y, Ohmori R, Nagano M, Kato R, Taniguchi H, Egashira T, et al. Polymorphism of the 3'-untranslated Region of interleukin-12 p40 Gene Is Not Associated With the Presence or Severity of Coronary Artery Disease. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2005;69(7):793–7.
142. Mangino M, Braund P, Singh R, Steeds R, Stevens S, Channer KS, et al. Association Analysis of IL-12B and IL-23R Polymorphisms in Myocardial Infarction. *J Mol Med Berl Ger*. 2008;86(1):99–103.
143. Inoue N. IL23A (interleukin 23, alpha subunit p19). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;15(2):191–4.
144. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, et al. Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, With Biological Activities Similar as Well as Distinct From IL-12. *Immunity*. 2000;13(5):715–25.
145. Lupardus PJ, Garcia KC. The Structure of interleukin-23 Reveals the Molecular Basis of p40 Subunit Sharing With interleukin-12. *J Mol Biol*. 2008;382(4):931–41.
146. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, J de Sauvage F, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003;278:1910–4.
147. Bianchi E, Rogge L. The IL-23/IL-17 pathway in human chronic inflammatory diseases-new insight from genetics and targeted therapies. *Genes Immun*. 2019;20:415–25.

148. Khojasteh-Fard M, Abolhalaj M, Amiri P, Zaki M, Taheri Z, Qorbani M, et al. IL-23 gene expression in PBMCs of patients with coronary artery disease. *Dis Markers*. 2012;33:289–93.
149. Catanoso MG, Boiardi L, Macchioni P, Garagnani P, Sazzini M, Fanti SD, et al. IL-23A, IL-23R, IL-17A and IL-17R polymorphisms in different psoriatic arthritis clinical manifestations in the northern Italian population. *Rheumatol Int*. 2013;33:1165–76.
150. Costa VS, Santos AS, Fukui RT, Mattana TCC, Matioli SR, Silva MER. Protective effect of interleukin-23A (IL23A) haplotype variants on type 1A diabetes mellitus in a Brazilian population. *Cytokine*. 2013;62:327–33.
151. Li FF, Zhu XD, Yan P, Jin MH, Yue H, Zhang Q, et al. Characterization of variations in IL23A and IL23R genes: possible roles in multiple sclerosis and other neuroinflammatory demyelinating diseases. *Aging*. 2016;8:2734–46.
152. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, et al. A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12Rbeta1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168(11):5699–708.
153. Teng MWL, Andrews DM, McLaughlin N, Scheidt B von, Ngiow SF, Möller A, et al. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S Am*. 2010;107:8328–33.
154. van-de-Vosse E, Lichtenauer-Kaligis EGR, van-Dissel JT, Ottenhoff THM. Genetic variations in the interleukin-12/interleukin-23 receptor (beta1) chain, and implications for IL-12 and IL-23 receptor structure and function. *Immunogenetics*. 2003;54:817–29.
155. Savvatis K, Pappritz K, Becher PM, Lindner D, Zietsch C, Volk HD, et al. Interleukin-23 deficiency leads to impaired wound healing and adverse prognosis after myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2014;7:161–71.
156. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, Vassileva G, et al. Ubiquitous Transgenic Expression of the IL-23 Subunit p19 Induces Multiorgan Inflammation, Runtting, Infertility, and Premature Death. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001;166(12):7563–70.
157. Eijnden SV, Goriely S, Wit DD, Goldman M, Willems F. Preferential Production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) Heterodimer by Dendritic Cells From Human Newborns. *Eur J Immunol*. 2006;36(1):21–6.
158. Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. Discovery and Biology of IL-23 and IL-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:225–42.
159. Mat NFC, Siddiqui S, Mehta D, Seaver K, Banete A, Alothaimeen T, et al. Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection of Dendritic Cells Interferes With TLR-induced IL-12/IL-23 Cytokine Production in an IL-10 Independent Manner. *Cytokine*. 2018;108:105–14.
160. Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Romero-Hidalgo S, Antúnez-Argüelles E, Bautista-Grande A, Vargas-Alarcón G, et al. The ABCA1 gene R230C variant is associated with decreased risk of premature coronary artery disease: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study. *PLoS One*. 2012;7(11):e49285.

161. López-Bautista F. Deficiencia de vitamina D y su asociación con enfermedad arterial coronaria en población mexicana [Internet] [Maestría]. [Ciudad Universitaria]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2015/julio/0731781/Index.html>
162. Posadas-Sánchez R. Los polimorfismos de los genes que codifican para las subunidades alfa y beta de las interleucinas 27 y 35 se asocian con enfermedad arterial coronaria prematura y parámetros metabólicos en población mexicana. [Internet] [Doctorado]. [Ciudad Universitaria]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0767120/Index.html>
163. Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Angeles-Martínez J, López-Bautista F, Villarreal-Molina T, Rodríguez-Pérez JM, et al. Interleukin 35 Polymorphisms Are Associated With Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease, Metabolic Parameters, and IL-35 Levels: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6012795.
164. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* 2009;19(9):1655–64.
165. Baecke J, Burema J, Frijters J. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr.* 1982;36(5):936–42.
166. Hernández-Avila M, Romieu I, Parra S, Hernández-Avila J, Madrigal H, Willett W. Validity and reproducibility of a food frequency questionnaire to assess dietary intake of women living in Mexico city. *Salud Publica Mex.* 1998;40(2):133–40.
167. Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Jiménez-Corona A. Optimal cutoff points for the detection of undiagnosed type 2 diabetes, hypertension and metabolic syndrome in Mexican adults. *Salud Publica Mex.* 2012;54(1):13–9.
168. Sánchez-Castillo CP, Velázquez-Monroy O, Berber A, Lara-Esqueda A, Tapia-Conyer R, James WPT, et al. Anthropometric cutoff points for predicting chronic diseases in the Mexican National Health Survey 2000. *Obes Res.* 2003;11(3):442–51.
169. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640–5.
170. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uekama K, Kayahara N, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. *Clin Chemistry.* 1995;41(5):717–23.
171. DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM. A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol. The Lipid Research Clinics Prevalence Study. *J Am Med Assoc.* 1986;256(17):2372–7.
172. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112(17):2735–52.

173. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412–9.
174. Mautner GC, Mautner SL, Froehlich J, Feuerstein IM, Proschan MA, Roberts WC, et al. Coronary Artery Calcification: Assessment With Electron Beam CT and Histomorphometric Correlation. *Radiology*. 1994;192(3):619–23.
175. Kvist H, Chowdhury B, Grangård U, Tylén U, Sjöström L. Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr*. 1988;48(6):1351–61.
176. Rong C, Hu W, Wu F rong, Cao X juan, Chen F hu. Interleukin-23 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem*. 2012;361:243–8.
177. Xia LP, Li BF, Shen H, Lu J. Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol*. 2015;44:200–5.
178. Mudigonda P, Mudigonda T, Feneran AN, Alamdari HS, Sandoval L, Feldman SR. Interleukin-23 and interleukin-17: importance in pathogenesis and therapy of psoriasis. *Dermatol Online J*. 2012;18:1.
179. Mohammadi M, Hayatbakhsh MM, Zahedi MJ, Jalalpour MR, Pakgohar A. Serum interleukin-23 levels in patients with ulcerative colitis. *Iran J Immunol IJI*. 2011;8:183–8.
180. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116:1310–6.
181. Tindall EA, Hayes VM. Comprehensive sequence analysis of the human IL23A gene defines new variation content and high rate of evolutionary conservation. *DNA Res Int J Rapid Publ Rep Genes Genomes*. 2010;17:117–22.
182. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet*. 2009;41:199–204.
183. Chen H, Poon A, Yeung C, Helms C, Pons J, Bowcock AM, et al. A genetic risk score combining ten psoriasis risk loci improves disease prediction. *PLoS One*. 2011;6:e19454.
184. Eiris N, Santos-Juanes J, Coto-Segura P, Gómez J, Alvarez V, Morales B, et al. Resequencing of the IL12B gene in psoriasis patients with the rs6887695/rs3212227 risk genotypes. *Cytokine*. 2012;60:27–9.
185. Bowes J, Orozco G, Flynn E, Ho P, Brier R, Marzo-Ortega H, et al. Confirmation of TNIP1 and IL23A as susceptibility loci for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1641–4.
186. Popa OM, Kriegova E, Popa L, Schneiderova P, Dutescu MI, Bojinca M, et al. Association study in Romanians confirms IL23A gene haplotype block rs2066808/ rs11171806 as conferring risk to psoriatic arthritis. *Cytokine*. 2013;63:67–73.
187. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II- interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:375–86.

188. Yi T, Lee DS, Jeon MS, Kwon SW, Song SU. Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene*. 2012;497:131–9.
189. Lagor WR, Fields DW, Bauer RC, Crawford A, Abt MC, Artis D, et al. Genetic manipulation of the ApoF/Stat2 locus supports an important role for type I interferon signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;233:234–41.
190. Levy DE, Darnell JJE. STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:651–62.
191. An X, Yu D, Zhang R, Zhu J, Du R, Shi Y, et al. Insulin resistance predicts progression of de novo atherosclerotic plaques in patients with coronary heart disease: a one-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:71.
192. Iguchi T, Hasegawa T, Otsuka K, Matsumoto K, Yamazaki T, Nishimura S, et al. Insulin resistance is associated with coronary plaque vulnerability: insight from optical coherence tomography analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15:284–91.
193. Hanley AJG, Williams K, Stern MP, Haffner SM. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 2002;25:1177–84.
194. Eddy D, Schlessinger L, Kahn R, Peskin B, Schiebinger R. Relationship of Insulin Resistance and Related Metabolic Variables to Coronary Artery Disease: A Mathematical Analysis. *Diabetes Care*. 2009;32:361–6.
195. Tzagournis M, Chiles R, Ryan JM, Skillman TG. Interrelationships of hyperinsulinism and hypertriglyceridemia in young patients with coronary heart disease. *Circulation*. 1968;38:1156–63.
196. Adeva-Andany MM, Martínez-Rodríguez J, González-Lucán M, Fernández-Fernández C, Castro-Quintela E. Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes Metab Syndr*. 2019;13:1449–55.
197. Wheeler JG, Juzwishin KDM, Eiriksdottir G, Gudnason V, Danesh J. Serum uric acid and coronary heart disease in 9,458 incident cases and 155,084 controls: prospective study and meta-analysis. *PLoS Med*. 2005;2:e76.
198. Kim SY, Guevara JP, Kim KM, Choi HK, Heitjan DF, Albert DA. Hyperuricemia and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res*. 2010;62:170–80.
199. Braga F, Pasqualetti S, Ferraro S, Panteghini M. Hyperuricemia as risk factor for coronary heart disease incidence and mortality in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:7–15.
200. Li M, Hu X, Fan Y, Li K, Zhang X, Hou W, et al. Hyperuricemia and the risk for coronary heart disease morbidity and mortality a systematic review and dose-response meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:19520.
201. Waring WS, Maxwell SRJ, Webb DJ. Uric acid concentrations and the mechanisms of cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2002;23:1888–9.

202. Dawson J, Quinn T, Walters M. Uric acid reduction: a new paradigm in the management of cardiovascular risk? *Curr Med Chem*. 2007;14:1879–86.
203. Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, Bos AJG, Maggio M, Dixit VD, et al. Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J*. 2006;27:1174–81.
204. Tiong AY, Brieger D. Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J*. 2005;150:11–8.
205. Henckaerts L, Steen KV, Verstreken I, Cleyne I, Franke A, Schreiber S, et al. Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2009;7:972-980.e2.
206. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR. IL23R and IL12B SNPs and Haplotypes Strongly Associate with Crohn's Disease Risk in a New Zealand Population. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:539461.
207. Vermeire S, Assche GV, Rutgeerts P. Role of genetics in prediction of disease course and response to therapy. *World J Gastroenterol*. 2010;16:2609–15.
208. Wang EY, Yang Q, Liao ZG. Association of polymorphisms in interleukin (IL)-12A and -B genes with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Clin Exp Immunol*. 2015;180:83–9.
209. Manolova I, Ivanova M, Vasilev G, Stoilov R, Miteva L, Stanilova S. Impact of IL12B Polymorphisms on Genetic Susceptibility and IL-12p40 and IL-23 Serum Levels in Rheumatoid Arthritis. *Immunol Invest*. 2020;49:1–14.
210. Morris GAJ, Edwards DRV, Hill PC, Wejse C, Bisseye C, Olesen R, et al. Interleukin 12B (IL12B) Genetic Variation and Pulmonary Tuberculosis: A Study of Cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One*. 2011;6:e16656.
211. Kaarvatn MH, Vrbanc J, Kulic A, Knezevic J, Petricevic B, Balen S, et al. Single nucleotide polymorphism in the interleukin 12B gene is associated with risk for breast cancer development. *Scand J Immunol*. 2012;76:329–35.
212. Morahan G, McKinnon E, Berry J, Browning B, Julier C, Pociot F, et al. Evaluation of IL12B as a candidate type I diabetes susceptibility gene using data from the Type I Diabetes Genetics Consortium. *Genes Immun*. 2009;10 (Suppl 1):S64–8.
213. Wong RH, Wei JCC, Huang CH, Lee HS, Chiou SY, Lin SH, et al. Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2012;39:135–40.
214. Abhimanyu, Mangangcha IR, Jha P, Arora K, Mukerji M, Banavaliker JN, et al. Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. 2011;11:1015–22.
215. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*. 2007;80:273–90.
216. Ali S, Srivastava AK, Chopra R, Aggarwal S, Garg VK, Bhattacharya SN, et al. IL12B SNPs and copy number variation in IL23R gene associated with susceptibility to leprosy. *J Med Genet*. 2013;50:34–42.

217. McGovern DPB, Rotter JI, Mei L, Haritunians T, Landers C, Derkowski C, et al. Genetic epistasis of IL23/IL17 pathway genes in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:883–9.
218. Javan MR, Shahraki S, Safa A, Salmaninejad A, Aslani S. An interleukin 12 B single nucleotide polymorphism increases IL-12p40 production and is associated with increased disease susceptibility in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2017;(39):435–41.
219. Stanilova S, Miteva L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun*. 2005;6:364–6.
220. Eskandari-Nasab E, Moghadampour M, Asadi-Saghandi A, Kharazi-Nejad E, Rezaeifar A, Pourmasoumi H. Levels of interleukin-(IL)-12p40 are markedly increased in Brucellosis among patients with specific IL-12B genotypes. *Scand J Immunol*. 2013;78:85–91.
221. Ivanova M, Manolova I, Miteva L, Gancheva R, Stanilova S. Genetic variations in the IL-12B gene in association with IL-23 and IL-12p40 serum levels in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int*. 2019;39:111–9.
222. Wei P, Kou W, Zhang C, Kang H, Yao H, Tang X, et al. Genetic variations in interleukin-12B in allergic rhinitis. *Immunol Res*. 2016;64:329–36.
223. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity*. 2003;19:641–4.
224. Johnston A, Xing X, Swindell WR, Kochkodan J, Riblett M, Nair RP, et al. Susceptibility-associated genetic variation at IL12B enhances Th1 polarization in psoriasis. *Hum Mol Genet*. 2013;22:1807–15.
225. Lim HX, Hong HJ, Jung MY, Cho D, Kim TS. Principal role of IL-12p40 in the decreased Th1 and Th17 responses driven by dendritic cells of mice lacking IL-12 and IL-18. *Cytokine*. 2013;63:179–86.
226. Li X, Bai L, Fang J, Hou S, Zhou Q, Yu H, et al. Genetic variations of IL-12B, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 in Behcet's disease and VKH syndrome. *PLoS One*. 2014;9:e98373.
227. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685–95.
228. Posadas-Sánchez R, López-Urbe ÁR, Posadas-Romero C, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Ocampo-Arcos WA, et al. Association of the I148M/PNPLA3 (rs738409) polymorphism with premature coronary artery disease, fatty liver, and insulin resistance in type 2 diabetic patients and healthy controls. The GEA study. *Immunobiology*. 2017;222:960–6.
229. Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Angeles-Martínez J, López-Bautista F, Villarreal-Molina T, Rodríguez-Pérez JM, et al. Interleukin 35 Polymorphisms Are Associated with Decreased Risk of Premature Coronary Artery Disease, Metabolic Parameters, and IL-35 Levels: The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:6012795.

Anexos

Publicaciones generadas del Proyecto de doctorado.

1. Vázquez-Vázquez C, Posadas-Sánchez R, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Cardoso-Saldaña G, et al. The rs2066808 Polymorphism Located Near the IL-23A Gene Is Associated With Premature Coronary Artery Disease in Mexican Population (GEA Study). *DNA Cell Biol.* 2019;38(8):880–6.
2. Vázquez-Vázquez C, Posadas-Sánchez R, Fragoso JM, Ramírez-Bello J, Sánchez-Guerra M, Osorio-Yañez C, et al. IL-12B Polymorphisms Are Associated With the Presence of Premature Coronary Artery Disease and With Cardiovascular Risk Factors: The Genetics of Atherosclerotic Disease Mexican Study. *DNA Cell Biol.* 2020;39(7):1347-55

The rs2066808 Polymorphism Located Near the *IL-23A* Gene Is Associated with Premature Coronary Artery Disease in Mexican Population (GEA Study)

Christian Vázquez-Vázquez,¹ Rosalinda Posadas-Sánchez,²
Nonanzit Pérez-Hernández,¹ José Manuel Rodríguez-Pérez,¹ José Manuel Fragoso,¹
Guillermo Cardoso-Saldaña,² and Gilberto Vargas-Alarcón¹

Interleukin-23 (IL-23) has been associated with atherosclerosis in both humans and animal models with contradictory results. This cytokine is conformed by an α p19 (encoded by *IL-23A* gene) and a β p40 subunit (encoded by *IL-12B* gene). The aim of this study was to evaluate the association of two polymorphisms located within (rs11171806) or near (rs2066808) of the *IL-23A* gene with the presence of premature coronary artery disease (CAD) and with cardiometabolic parameters. The rs2066808 and rs11171806 polymorphisms were determined in 2249 Mexican individuals (1160 with premature CAD and 1089 healthy controls). Under recessive and codominant 2 models, adjusted by confounding variables, the rs2066808 polymorphism could increase the genetic risk of premature CAD (odds ratio [OR]=4.567, 95% confidence interval [CI]: 1.03–20.24, $P_{\text{recessive}}=0.046$ and OR=4.606, 95% CI: 1.039–20.43, $P_{\text{codominant2}}=0.044$). The association of the polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated separately in premature CAD patients and healthy controls. In patients, the rs2066808 polymorphism could decrease the genetic risk of hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypoalphalipoproteinemia, and increase the genetic risk of hyperuricemia, whereas the rs11171806 polymorphism could decrease the genetic risk of hyperinsulinemia and insulin resistance. In healthy controls, the rs11171806 polymorphism could decrease the genetic risk of hyperinsulinemia. These findings suggest that the rs2066808 polymorphism located near the *IL-23A* gene could increase the genetic risk of premature CAD and both studied polymorphisms could be associated with some cardiometabolic parameters in premature CAD patients and in healthy controls.

Keywords: coronary artery disease, interleukin 23, p40 subunit, p19 subunit, polymorphisms

Introduction

ATHEROSCLEROSIS IS A CHRONIC, progressive, and multifactorial disease modulated by genetic and environmental factors. An important complication of the atherosclerosis is the coronary artery disease (CAD). This disease is considered the most common cause of death in industrialized countries, accounting for up to 40% of all deaths (Lopez *et al.*, 2006). An increasing number of observations have shown that inflammation plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and its complications. An imbalance of anti- and proinflammatory cytokines in the development and progression of atherosclerosis has been described in animal models (Frostegård *et al.*, 1999; Tedgui and Mallat, 2006).

Interleukin 23 (IL-23), a member of the interleukin 12 family, is a heterodimeric cytokine, conformed by an α p19 and a β p40 subunit (Oppmann *et al.*, 2000). This cytokine is produced mainly by macrophages and dendritic cells after toll-like receptor activation (Aggarwal *et al.*, 2003) and plays a central role in the inflammatory process. IL-23 stimulates the proliferation of T memory cells, the development of proinflammatory Th17 cells, and the differentiation of Th1 cells (Aggarwal *et al.*, 2003). IL-23 has been associated with atherosclerosis in both humans and animal models with contradictory results. Lower *IL-23* gene expression was observed in unstimulated peripheral blood lymphocytes of patients with CAD when compared with healthy controls (Khojasteh-Fard *et al.*, 2012). However, in another study, high IL-23 levels were detected in patients

Departments of ¹Molecular Biology and ²Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico.

with carotid atherosclerosis when compared with healthy controls, and these levels were associated with disease progression and increased mortality (Abbas *et al.*, 2015). In contrast, in an *IL-23p19*^{-/-} mice model with myocardial infarction, the *IL-23* deficiency produces myocardial inflammation, lower cardiac fibroblast activation, ventricular rupture, and increased mortality (Savvatis *et al.*, 2014).

Beta subunit p40 is encoded by *IL-12B* gene on chromosome 5. Information regarding the association of polymorphisms present in the *IL-12B* gene with CAD is scarce. A Japanese study in a small cohort failed to show an association between rs3212227 *IL-12B* polymorphism and the presence or severity of CAD diagnosed by angiography (Momiya *et al.*, 2005). These results agree with those reported by Mangino *et al.* (2008) in a British cohort. In contrast, the α subunit p19 is encoded by the *IL-23A* gene located on 12q13.3 region. Polymorphisms in this gene have been associated with the presence of several diseases (Catanoso *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016); however, no studies have evaluated the association of the *IL23A* polymorphisms with the development of cardiovascular disease. Considering this, the aim of this study was to evaluate the association of two polymorphisms located within (rs11171806) or near (rs2066808) of the *IL-23A* gene with the presence of CAD in a cohort of Mexican individuals.

Materials and Methods

Subjects

The study included 2249 Mexican individuals (1160 with premature CAD and 1089 healthy controls) belonging to the Genetics of Atherosclerosis (GEA) Mexican study. The premature CAD patients were diagnosed by history of myocardial infarction, angioplasty, revascularization surgery, or coronary stenosis >50% on angiography. Premature CAD was considered when the diagnosis was made before age 55 in men and before age 65 in women. The individuals included in the control group were recruited from blood bank and through brochures posted in social service centers. All were apparently healthy asymptomatic individuals without family history of premature CAD. To obtain family medical history, demographic information, history of nutritional habits, physical activity, alcohol consumption, and pharmacological treatment in patients and healthy controls, standardized questionnaires were applied. Anthropometric, biochemical, metabolic, and cardiovascular risk factors were evaluated in both premature CAD cases and controls and defined as previously described (Posadas-Sánchez *et al.*, 2014, 2017a; Medina-Urrutia *et al.*, 2015). Considering that the Mexican population is an admixture of Caucasian, Amerindian, and African genes, these components were evaluated previously using 265 ancestry markers (Posadas-Sánchez *et al.*, 2017b). These results show that global ancestry was not significantly different between premature CAD patients and healthy controls (55.8% vs. 54.0% Amerindian ancestry, 34.3% vs. 35.8% Caucasian, and 9.8% vs. 10.1% African mean ancestry for patients and controls, respectively, $p > 0.05$). This suggests that population stratification was not a bias or confounding factor in this study.

The GEA study was approved by the Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

(INCICH, number 19-1104), and aligned to the Helsinki Declaration. All participants provided informed consent.

Computed axial tomography study

Coronary artery calcification (CAC) score (Mautner *et al.*, 1994), total, subcutaneous, and visceral abdominal fat areas (Kvist *et al.*, 1988), and hepatic to splenic attenuation ratio (Longo *et al.*, 1993) were determined after a computed tomography of the chest and abdomen performed using a 64-channel multidetector helical computed tomography system (Somatom Sensation, Siemens). The GEA study originally included 1500 healthy controls; yet, after the computed tomography, the CAC score of 411 subjects was >0. They were thus considered as individuals with subclinical atherosclerosis and were not included in the analysis. The final healthy control group included 1089 individuals with a CAC score of 0.

Genetic analysis

The rs2066808 (C_12055277_10) and rs11171806 (C_25985467_10) polymorphisms were determined using 5' exonuclease TaqMan assays. The determinations were made with an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system, according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). To corroborate the adequate assignment of the genotypes in the TaqMan assays, we randomly select and repeat 10% of the samples. These samples were 100% concordant in two independent assays.

Statistical analysis

The analysis was made using the SPSS version 15.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL). Means, medians, interquartile ranges, and frequencies were calculated as the case may be. Continuous and categorical variables were analyzed by Student's *t* test, Mann-Whitney *U*-test, Kruskal-Wallis, and chi-square as appropriate. The association of the polymorphisms with premature CAD, metabolic parameters, and cardiovascular risk factors was analyzed by logistic regression under the following inheritance models: additive (major allele homozygotes vs. heterozygotes vs. minor allele homozygotes), codominant 1 (major allele homozygotes vs. heterozygotes), codominant 2 (major allele homozygotes vs. minor allele homozygotes), dominant (major allele homozygotes vs. heterozygotes+minor allele homozygotes), overdominant (heterozygotes vs. major allele homozygotes+minor allele homozygotes), and recessive (major allele homozygotes+heterozygotes vs. minor allele homozygotes). In the analysis of association with premature CAD, the models were adjusted by age, gender, body mass index (BMI), current smoking, low- and high-density lipoprotein cholesterol (LDL-C and HDL-C), and homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR), whereas in the associations with metabolic parameters and cardiovascular risk factors, the models were adjusted by age, gender and BMI. $p < 0.05$ values were considered statistically significant. Genotype frequencies did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium in any case ($p > 0.05$). The haplotypes were constructed and analyzed using the Haploview version 4:1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA).

Results

Demographic, biochemical, and cardiovascular risk factors

Demographic, biochemical, and cardiovascular risk factors of the studied groups are given in Table 1. All the variables were increased in the patient group except the total cholesterol <200 mg/dL, the LDL-C \geq 130 mg/dL, non-HDL-C >160 mg/dL, smoking habit, and high sensitivity C-reactive protein \geq 3 mg/L that were decreased in this group compared with healthy controls. The decrease of these variables in patients after diagnosis could be due to patients received statin treatment and in addition modified their life styles by medical recommendation.

Association of the polymorphisms with premature CAD

The distribution of the studied polymorphisms in premature CAD patients and healthy controls is given in Table 2. The distribution of the rs11171806 polymorphism was similar in patients and healthy controls. In contrast, under the recessive and codominant 2 models, the rs2066808 polymorphism could increase the genetic risk of premature CAD (odds ratio [OR]=4.567, 95% confidence interval [CI]: 1.03–20.24, $P_{\text{recessive}}=0.046$ and OR=4.606, 95% CI: 1.039–20.43, $P_{\text{codominant2}}=0.044$). The models were adjusted by age, gender, BMI, current smoking, LDL-C, HDL-C, and HOMA-IR. The statistical power to detect association of the

rs2066808 polymorphism with premature CAD was >90% as estimated with QUANTO software [biostats.usc.edu/Quanto.html].

Association of the polymorphisms with cardiovascular risk factors

The association of the polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated separately in premature CAD patients and healthy controls. In patients (Table 3), the rs2066808 polymorphism could decrease the genetic risk of hyperinsulinemia (OR=0.271, $P_{\text{recessive}}=0.048$; OR=0.268, $P_{\text{codominant2}}=0.046$), insulin resistance (OR=0.276, $P_{\text{recessive}}=0.043$; OR=0.270, $P_{\text{codominant2}}=0.040$), and hypoalphalipoproteinemia (OR=0.269, $P_{\text{recessive}}=0.042$; OR=0.274, $P_{\text{codominant2}}=0.045$), and increase the risk of hyperuricemia (OR=1.459, $P_{\text{additive}}=0.015$; OR=1.486, $P_{\text{dominant}}=0.021$; OR=1.412, $P_{\text{overdominant}}=0.045$; OR=1.436, $P_{\text{codominant1}}=0.039$). In the same way, the rs11171806 polymorphism could decrease the genetic risk of developing hyperinsulinemia (OR=0.677, $P_{\text{additive}}=0.043$; OR=0.645, $P_{\text{dominant}}=0.031$; OR=0.632, $P_{\text{over-dominant}}=0.026$; OR=0.632, $P_{\text{codominant1}}=0.026$) and insulin resistance (OR=0.659, $P_{\text{additive}}=0.037$; OR=0.632, $P_{\text{dominant}}=0.029$; OR=0.625, $P_{\text{overdominant}}=0.027$; OR=0.625, $P_{\text{codominant1}}=0.027$). In contrast, in healthy controls (Table 4), the rs11171806 polymorphism could decrease the risk of hyperinsulinemia (OR=0.645, $P_{\text{additive}}=0.049$).

TABLE 1. DEMOGRAPHIC, BIOCHEMICAL, AND CARDIOVASCULAR RISK FACTORS PREVALENCE OF THE STUDIED POPULATION

	Controls (n=1089)	Premature CAD (n=1160)	p
Age (years)	51 \pm 9	54 \pm 8	<0.001
Gender (% male)	41.0	81.0	<0.001
BMI (kg/m ²)	27.9 [25.4–30.8]	28.3 [25.9–31.1]	0.004
Waist circumference (cm)	94 \pm 11	98 \pm 10	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	112 [104–123]	116 [106–127]	<0.001
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.5 [65.0–76.0]	71.0 [65.5–77.5]	0.011
Visceral adipose fat (cm ²)	139 [105–181]	168 [129–215]	<0.001
Alanine aminotransferase (IU/L)	24 [18–34]	26 [19–36]	0.025
Aspartate aminotransferase (IU/L)	25 [21–30]	26 [22–31]	0.001
Total cholesterol <200 mg/dL (%)	36.4	20.3	<0.001
LDL-C \geq 130 mg/dL (%)	29.6	16.1	<0.001
Hypoalphalipoproteinemia (%)	52.1	67.1	<0.001
Non-HDL-C >160 mg/dL (%)	27.9	19.5	<0.001
Hypertriglyceridemia (%)	47.3	56.2	<0.001
Obesity (%)	30.3	35.1	0.009
Abdominal obesity (%)	81.2	83.7	0.067
Type 2 diabetes mellitus (%)	9.6	35.5	<0.001
Hyperinsulinemia (%)	52.2	66.1	<0.001
Insulin resistance (%)	54.2	72.8	<0.001
Hypertension (%)	18.9	68.1	<0.001
High visceral abdominal fat (%)	54.7	64.7	<0.001
Current smoking (%)	22.6	11.6	<0.001
Hypoadiponectinemia (%)	42.9	57.6	<0.001
High sensitivity CRP \geq 3 mg/L (%)	26.7	20.5	0.002
Hyperuricemia (%)	20.5	36.1	<0.001

Data are shown as mean \pm standard deviation, median [interquartile range], or percentage. Comparisons were made using Student's *t* test or Mann–Whitney *U*-test, as appropriate, for continuous variables, and by chi-square analysis for categorical variables.

BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; CRP, C-reactive protein; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

TABLE 2. ASSOCIATION BETWEEN *INTERLEUKIN-23A* POLYMORPHISMS AND PREMATURE CORONARY DISEASE

Polymorphism	Genotype frequency			MAF	Model	OR [95% CI]	p
	AA	AG	GG				
rs2066808	AA	AG	GG	0.076	Additive	1.179 [0.906–1.535]	0.221
Control (n = 1089)	0.851	0.146	0.003		Dominant	1.125 [0.848–1.491]	0.414
CAD (n = 1160)	0.848	0.142	0.009	0.081	Recessive	4.567 [1.030–20.24]	0.046
					Overdominant	1.049 [0.787–1.397]	0.787
					Codominant 1	1.060 [0.796–1.413]	0.689
					Codominant 2	4.606 [1.039–20.43]	0.044
rs11171806	GG	GA	AA	0.053	Additive	1.163 [0.848–1.595]	0.349
Control (n = 1089)	0.896	0.102	0.002		Dominant	1.176 [0.846–1.635]	0.334
CAD (n = 1160)	0.896	0.101	0.003	0.053	Recessive	1.070 [0.175–6.539]	0.942
					Overdominant	1.179 [0.844–1.645]	0.334
					Codominant 1	1.179 [0.845–1.646]	0.333
					Codominant 2	1.089 [0.178–6.666]	0.926

Models were adjusted for age, gender, BMI, current smoking, LDL-C and HDL-C, and HOMA-IR.

Bold numbers indicate significant associations.

CI, confidence interval; HOMA-IR, homeostasis model assessment-insulin resistance; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio.

Haplotype analysis

The polymorphisms were in high linkage disequilibrium ($D' = 0.98$, $r^2 = 0.64$); however, a similar distribution of the haplotypes constructed was observed in patients and healthy controls (data not shown).

Discussion

In a group of 2249 Mexican individuals (1160 with premature CAD and 1089 controls), we describe that the

rs2066808 polymorphism located near the *IL-23A* gene could increase the genetic risk of developing premature CAD. In premature CAD patients, the rs2066808 polymorphism could decrease the risk of hyperinsulinemia, insulin resistance, and hypoalphalipoproteinemia, and increase the risk of hyperuricemia, whereas the rs11171806 could decrease the risk of hyperinsulinemia and insulin resistance. In contrast, in controls, the rs2066808 could decrease the risk of hyperinsulinemia. As can be seen, the association of the polymorphisms with cardiometabolic

TABLE 3. ASSOCIATION BETWEEN *INTERLEUKIN-23A* POLYMORPHISMS AND CARDIOMETABOLIC ABNORMALITIES IN CORONARY ARTERY DISEASE PATIENTS

	Genotype frequency			MAF	Model	OR [95% CI]	P	
	AA	AG	GG					
rs2066808	AA	AG	GG	0.092	Recessive	0.271 [0.075–0.987]	0.048	
Hyperinsulinemia	No (n = 393)	0.835	0.147					0.018
	Yes (n = 767)	0.856	0.139	0.005				
Insulin resistance	No (n = 316)	0.827	0.154	0.019	0.097	Recessive	0.276 [0.079–0.963]	0.043
	Yes (n = 844)	0.857	0.137	0.006	0.075	Codominant 2	0.270 [0.077–0.942]	0.040
Hypoalphalipoproteinemia	No (n = 382)	0.851	0.131	0.018	0.084	Recessive	0.269 [0.076–0.951]	0.042
	Yes (n = 778)	0.847	0.148	0.005	0.079	Codominant 2	0.274 [0.077–0.971]	0.045
Hyperuricemia	No (n = 741)	0.867	0.126	0.007	0.070	Additive	1.459 [1.076–1.979]	0.015
	Yes (n = 419)	0.817	0.168	0.014	0.099	Dominant	1.482 [1.061–2.070]	0.021
						Overdominant	1.412 [1.008–2.003]	0.045
						Codominant 1	1.436 [1.018–2.025]	0.039
rs11171806	GG	GA	AA	0.066	Additive	0.677 [0.464–0.988]	0.043	
Hyperinsulinemia	No (n = 393)	0.869	0.129					0.003
	Yes (n = 767)	0.909	0.087	0.004		Overdominant	0.632 [0.422–0.946]	0.026
						Codominant 1	0.632 [0.422–0.947]	0.026
Insulin resistance	No (n = 316)	0.862	0.135	0.003	0.071	Additive	0.659 [0.446–0.974]	0.037
	Yes (n = 844)	0.908	0.089	0.004	0.048	Dominant	0.632 [0.419–0.954]	0.029
						Overdominant	0.625 [0.412–0.949]	0.027
						Codominant 1	0.625 [0.412–0.948]	0.027

Models were adjusted for age, gender, and BMI.

All significant models are shown.

TABLE 4. ASSOCIATION BETWEEN *INTERLEUKIN-23A* POLYMORPHISMS AND CARDIOMETABOLIC ABNORMALITIES IN CONTROL SUBJECTS

	<i>Genotype frequency</i>			<i>MAF</i>	<i>Model</i>	<i>OR [CI 95%]</i>	<i>P</i>
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>				
Hyperinsulinemia							
rs11171806							
No (<i>n</i> =519)	0.882	0.114	0.004	0.061	Additive	0.645 [0.418–0.997]	0.049
Yes (<i>n</i> =570)	0.908	0.092	0.000	0.046			

Models were adjusted for age, gender, and BMI.

parameters was different in premature CAD patients and healthy controls, with the most important effect in patients. In this group, both polymorphisms could decrease the risk of hyperinsulinemia and insulin resistance, two related characteristics. Thus, patients with the rs2066808*G* and rs11171806*A* alleles have low insulin resistance, and in consequence they do not need the insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, having low risk for this condition.

IL-23 is a heterodimeric cytokine with important effects in the immune system through its participation in the inflammatory process. IL-23 has been associated with the development of several inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis (Rong *et al.*, 2012), systemic lupus erythematosus (Xia *et al.*, 2015), psoriasis (Mudigonda *et al.*, 2012), ulcerative colitis (Mohammadi *et al.*, 2011), and inflammatory bowel disease (Yen *et al.*, 2006). Its role in the development of atherosclerosis has been studied in animal models and humans with contradictories results (Khojasteh-Fard *et al.*, 2012; Savvatis *et al.*, 2014; Abbas *et al.*, 2015; Posadas-Sánchez and Vargas-Alarcón, 2018).

It is well known that IL-23 secretion is limited by the tissue and cell-restricted expression of p19 subunit (Oppmann *et al.*, 2000), encoded by the *IL-23A* gene. Thus, functional genetic variants within the *IL-23A* gene could have important impact on immune response and could be candidate gene for association studies (Tindall and Hayes, 2010). Association studies of the *IL-23A* polymorphisms with some diseases have been reported (Catanoso *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). The *IL-23A* rs2066808, rs2371494, and rs11575248 polymorphisms were associated with susceptibility to multiple sclerosis in Chinese Han population (Li *et al.*, 2016), whereas in Brazilians, the *GG* haplotype of rs11171806 and rs2066808 polymorphisms decreases the risk of type 1A diabetes mellitus (Costa *et al.*, 2013). In contrast, in German and Chinese cohorts, the rs2066808 polymorphism was associated with susceptibility to psoriasis (Nair *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011), whereas in Spaniards, this polymorphism was associated with psoriatic arthritis (Eiris *et al.*, 2012). Two independent cohorts of Romanians and Caucasians (British and Ireland) confirm these results (Bowes *et al.*, 2011; Popa *et al.*, 2013). Unfortunately, at the present time, there are no studies that have evaluated the association of polymorphism within or near the *IL23A* gene with the development of cardiovascular disease. In our study, we confirm the important role of the rs2066808 polymorphism now in a cardiovascular disease, the premature CAD.

IL-23 is a cytokine that is included in the IL-12 family together with IL-12, IL-27, and IL-35 cytokines. This family consists of a single group of α/β heterodimeric cytokines

composed of one of three alpha chains (p19 encode by *IL-23A*, p28 encode by *IL-27p28*, or p35 encode by *IL-12A*) and one of two beta chains [p40 encoded by *IL-12B* gene or Epstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) encoded by *EBI3*] (Vignali *et al.*, 2012). Previously, in the same cohort reported in this study, we analyzed the association of the polymorphisms of the *IL-27p28*, *IL-12A*, and *EBI3* genes with premature CAD (Posadas-Sánchez *et al.*, 2017b, 2017c). With the analysis of *IL-23A* polymorphisms, we complete the study of polymorphisms located in genes that encode the subunits that constitute the IL-12 family cytokine in our cohort of patients with premature CAD.

In contrast, the association of the rs2066808 polymorphism located near the *IL-23A* gene with premature CAD reported in this study is in accordance with the proinflammatory effects of this cytokine. This polymorphism is located in an intronic region of the *STAT2* (signal transducer and activator of transcription) gene and could alter RNA splicing by disrupting splice site enhancers or silencers, resulting in an isoform of this molecule with altered function. *STAT2* is a transcription activator related with the signal transduction pathway of type 1 interferon (Platanias, 2005) and with immunosuppressive function (Yi *et al.*, 2012). The potential role of *STAT2* in atherosclerosis has been previously described in an animal model (Lagor *et al.*, 2014). In this study, it was reported that ApoF-deficient mice under Western diet are protected from atherosclerosis and is suggested that this protection is related with a reduced expression of *STAT2* gene. *STAT* together with IRF (interferon regulatory factor) plays an important role in fundamental cellular process such as development, apoptosis, cell growth and differentiation, immune response, and inflammation (Levy and Darnell, 2002), all of them process involved in the developing atherosclerosis.

It is important to consider that our control group included only individuals without CAC evaluated by tomography. The subjects with calcium score >0 were considered as individuals with subclinical atherosclerosis and were not included as control individuals. The proportion of Caucasian, Native American, and African ancestries was similar in patients and controls, so population stratification was ruled out as a potential confounding factor. An important number of clinical, biochemical, and tomographic variables were collected in the studied groups that allowed adjustment of the analyses for a large number of potential confounders. Despite all of these strengths of our study, some limitations should also be considered. First, we only determined two polymorphisms that were previously associated with inflammatory diseases in other populations. Second, due to the transversal character of the study, conclusions on causality cannot be made. Third, the functional effect of the

polymorphisms was not defined experimentally. Finally, the statistical power to detect association of the rs11171806 polymorphism with premature CAD was <40%, so, the result reported in our study of this polymorphism must be taken with care.

In summary, our data suggest that the rs2066808 polymorphism located near the *IL-23A* gene could increase the genetic risk of premature CAD. Both polymorphisms studied were associated with some cardiometabolic parameters principally in the patient group. Associations with hyperinsulinemia, insulin resistance, hypoalbuminemia, and hyperuricemia were reported.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fronteras de la Ciencia No. 1958), Mexico City, Mexico. C.V.-V. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections. The authors are grateful to Marva Arellano-Gonzalez and Silvestre Ramírez-Fuentes for their technical assistance.

Authors' Contributions

C.V.-V. and G.V.-A. were responsible for the conception and design of the study. R.P.-S. and N.P.-H. contributed to the analysis and interpretation of data. J.M.F., J.M.R.-P., and G.C.-S. participated in the collection of samples and carried out the experiments. Drafting and revision of the article was handled by G.V.-A., C.V.-V., and R.P.-S.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Abbas, A., Gregersen, I., Holm, S., Daissormont, I., Bjerkeli, V., Krohg-Sørensen, K., *et al.* (2015). Interleukin 23 levels are increased in carotid atherosclerosis. Possible role for the interleukin 23/interleukin 17 axis. *Stroke* **46**, 793–799.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910–1914.
- Bowes, J., Orozco, G., Flynn, E., Ho, P., Brier, R., Marzo-Ortega, H., *et al.* (2011). Confirmation of TNIP1 and IL23A as susceptibility loci for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* **70**, 1641–1644.
- Catanoso, M.G., Boiardi, L., Macchioni, P., Garagnani, P., Sazzini, M., De Fanti, S., *et al.* (2013). IL-23A, IL-23R, IL-17A and IL-17R polymorphisms in different psoriatic arthritis clinical manifestations in the northern Italian population. *Rheumatol Int* **33**, 1165–1176.
- Chen, H., Poon, A., Yeung, C., Helms, C., Pons, J., Bowcock, A.M., *et al.* (2011). A genetic risk score combining ten psoriasis risk loci improves disease prediction. *PLoS One* **6**, e19454.
- Costa, V.S., Santos, A.S., Fukui, R.T., Mattana, T.C.C., Matioli, S.R., and Silva, M.E.R. (2013). Protective effect of interleukin-23A (IL23A) haplotype variants on type 1A diabetes mellitus in a Brazilian population. *Cytokine* **62**, 327–333.
- Eiris, N., Santos-Juanes, J., Coto-Segura, P., Gómez, J., Alvarez, V., Morales, B., *et al.* (2012). Resequencing of the IL12B gene in psoriasis patients with the rs6887695/rs3212227 risk genotypes. *Cytokine* **60**, 27–29.
- Frostegård, J., Ulfgrén, A.K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., *et al.* (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* **145**, 33–43.
- Khojasteh-Fard, M., Abolhalaj, M., Amiri, P., Zaki, M., Taheri, Z., Qorbani, M., *et al.* (2012). IL-23 gene expression in PBMCs of patients with coronary artery disease. *Dis Markers* **33**, 289–293.
- Kvist, H., Chowdhury, B., Grangård, U., Tylén, U., and Sjöström, L. (1988). Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr* **48**, 1351–1361.
- Lagor, W.R., Fields, D.W., Bauer, R.C., Crawford, A., Abt, M.C., Artis, D., *et al.* (2014). Genetic manipulation of the ApoF/Stat2 locus supports an important role for type I interferon signaling in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **233**, 234–241.
- Levy, D.E., and Darnell, J.E. (2002). STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 651–662.
- Li, F.-F., Zhu, X.-D., Yan, P., Jin, M.-H., Yue, H., Zhang, Q., *et al.* (2016). Characterization of variations in IL23A and IL23R genes: possible roles in multiple sclerosis and other neuroinflammatory demyelinating diseases. *Aging (Albany NY)* **8**, 2734–2746.
- Longo, R., Ricci, C., Masutti, F., Vidimari, R., Crocè, L.S., Bercich, L., *et al.* (1993). Fatty infiltration of the liver. Quantification by 1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* **28**, 297–302.
- Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T., and Murray, C.J. (2006). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747–1757.
- Mangino, M., Braund, P., Singh, R., Steeds, R., Stevens, S., Channer, K.S., *et al.* (2008). Association analysis of IL-12B and IL-23R polymorphisms in myocardial infarction. *J Mol Med* **86**, 99–103.
- Mautner, G.C., Mautner, S.L., Froehlich, J., Feuerstein, I.M., Proschan, M.A., Roberts, W.C., *et al.* (1994). Coronary artery calcification: assessment with electron beam CT and histomorphometric correlation. *Radiology* **192**, 619–623.
- Medina-Urrutia, A., Posadas-Romero, C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Villarreal-Molina, T., González-Salazar, M.D.C., *et al.* (2015). Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* **14**, 20.
- Mohammadi, M., Hayatbakhsh, M.M., Zahedi, M.J., Jalalpour, M.R., and Pakgohar, A. (2011). Serum interleukin-23 levels in patients with ulcerative colitis. *Iran J Immunol* **8**, 183–188.
- Momiyama, Y., Ohmori, R., Nagano, M., Kato, R., Taniguchi, H., Egashira, T., *et al.* (2005). Polymorphism of the 3'-untranslated region of interleukin-12 p40 gene is not associated with the presence or severity of coronary artery disease. *Circ J* **69**, 793–797.

- Mudigonda, P., Mudigonda, T., Feneran, A.N., Alamdari, H.S., Sandoval, L., and Feldman, S.R. (2012). Interleukin-23 and interleukin-17: importance in pathogenesis and therapy of psoriasis. *Dermatol Online J* **18**, 1.
- Nair, R.P., Duffin, K.C., Helms, C., Ding, J., Stuart, P.E., Goldgar, D., *et al.* (2009). Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. *Nat Genet* **41**, 199–204.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715–725.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* **5**, 375–386.
- Popa, O.M., Kriegova, E., Popa, L., Schneiderova, P., Dutescu, M.I., Bojinca, M., *et al.* (2013). Association study in Romanians confirms IL23A gene haplotype block rs2066808/rs11171806 as conferring risk to psoriatic arthritis. *Cytokine* **63**, 67–73.
- Posadas-Sánchez, R., Angélica, W., Arcos, O., René, Á., Uribe, L., González-salazar, M.C., *et al.* (2014). Asociación del ácido úrico con factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis subclínica en adultos mexicanos. [Association of uric acid with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in Mexican adults]. [in Spanish]. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr* **1**, 14–21.
- Posadas-Sánchez, R., López-Uribe, Á.R.Á.R., Posadas-Romero, C., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J.M.J.M.J.M., Ocampo-Arcos, W.A.W.A., *et al.* (2017a). Association of the I148M/PNPLA3 (rs738409) polymorphism with premature coronary artery disease, fatty liver, and insulin resistance in type 2 diabetic patients and healthy controls. The GEA study. *Immunobiology* **222**, 960–966.
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Angeles-Martínez, J., López-Bautista, F., Villarreal-Molina, T., Rodríguez-Pérez, J.M., *et al.* (2017b). Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters, and IL-35 levels: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *Mediators Inflamm* **2017**, 6012795.
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J.M., Coral-Vázquez, R.M., Roque-Ramírez, B., Llorente, L., *et al.* (2017c). Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study. *Oncotarget* **8**, 64459–64470.
- Posadas-Sánchez, R., and Vargas-Alarcón, G. (2018). Innate immunity in coronary disease. The role of interleukin-12 cytokine family in atherosclerosis. *Rev Investig Clin* **70**, 5–17.
- Rong, C., Hu, W., Wu, F., Cao, X., and Chen, F. (2012). Interleukin-23 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem* **361**, 243–248.
- Savvatis, K., Pappritz, K., Becher, P.M., Lindner, D., Zietsch, C., Volk, H.D., *et al.* (2014). Interleukin-23 deficiency leads to impaired wound healing and adverse prognosis after myocardial infarction. *Circ Hear Fail* **7**, 161–171.
- Tedgui, A., and Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* **86**, 515–581.
- Tindall, E.A., and Hayes, V.M. (2010). Comprehensive sequence analysis of the human IL23A gene defines new variation content and high rate of evolutionary conservation. *DNA Res* **17**, 117–122.
- Vignali, D.A.A., and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722–728.
- Xia, L.P., Li, B.F., Shen, H., and Lu, J. (2015). Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand. J Rheumatol* **44**, 200–205.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**, 1310–1316.
- Yi, T., Lee, D.-S., Jeon, M.-S., Kwon, S.W., and Song, S.U. (2012). Gene expression profile reveals that STAT2 is involved in the immunosuppressive function of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Gene* **497**, 131–139.

Address correspondence to:
 Gilberto Vargas-Alarcón, PhD
 Department of Molecular Biology
 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
 Juan Badiano 1, Sección XVI, Tlalpan
 Mexico City 14080
 Mexico

E-mail: gvargas63@yahoo.com

Received for publication February 20, 2019; received in revised form May 2, 2019; accepted May 8, 2019.

IL-12B Polymorphisms Are Associated with the Presence of Premature Coronary Artery Disease and with Cardiovascular Risk Factors: The Genetics of Atherosclerotic Disease Mexican Study

Christian Vázquez-Vázquez,^{1,*} Rosalinda Posadas-Sánchez,^{2,*} José Manuel Fragoso,¹ Julian Ramírez-Bello,³ Marco Sánchez-Guerra,⁴ Citlalli Osorio-Yañez,⁵ and Gilberto Vargas-Alarcón¹

The aim of this study was to evaluate the association of the *IL-12B* polymorphisms with the presence of premature coronary artery disease (pCAD) and with cardiovascular risk factors. The study included 2163 individuals (1133 patients with pCAD and 1030 healthy controls). Seven *IL-12B* polymorphisms (rs1363670, rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694, and rs1368439) were determined by TaqMan assays. The associations were evaluated by logistic regression using inheritance models adjusted for confounding variables. The rs1363670 was associated with a low risk of pCAD (odds ratio [OR] 0.718, $p_{\text{dominant}}=0.034$; OR 0.701, $p_{\text{heterozygote}}=0.024$; OR 0.702, $p_{\text{codominant1}}=0.025$). The association of the polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated independently in each group. In controls, the rs3212227, rs3212220, and rs6887695 polymorphisms were associated with subcutaneous abdominal fat > p75, whereas the rs6887695 was associated with a high risk of central obesity. In pCAD patients, the rs2853694 was associated with a low risk of insulin resistance; and association of rs3212227 and rs3212220 with a low risk of metabolic syndrome was found, and the rs6887695 polymorphism was nominally associated with a high risk of hyperuricemia. In conclusion, the *IL-12B* rs1363670 polymorphism was associated with a low risk of pCAD, and in both pCAD patients and healthy controls, some *IL-12B* polymorphisms were associated with cardiovascular risk factors.

Keywords: beta p40 subunit, coronary artery disease, cardiovascular risk factors, polymorphisms

Introduction

CARDIOVASCULAR DISEASES ARE currently the main cause of death worldwide; in fact, coronary artery disease (CAD) plays a central role (Benjamin *et al.*, 2019). CAD is a consequence of the atherosclerosis, which is the most important and well-known artery disease. Furthermore, atherosclerosis has a life-long course and is initially asymptomatic; it is a chronic, progressive, and multifactorial disease modulated by genetic and environmental factors (Stein *et al.*, 2019). In recent years, an increasing number of observations have shown that inflammation plays an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and its complications; as a matter of fact, atherosclerosis is nowadays considered an inflammatory disease (Hansson, 2005). It is well known that cytokines are involved in all stages of ath-

erosclerosis and have a relevant influence on its pathogenesis. Interleukin (IL)-23 plays a central role in inflammation because it promotes the Th1 cell differentiation, stimulates the proliferation of the T memory cells, and is critical in the development of proinflammatory Th17 populations (Aggarwal *et al.*, 2003). IL-23 has been related to several inflammatory disorders, such as rheumatoid arthritis (Rong *et al.*, 2012), ulcerative colitis (Mohammadi *et al.*, 2011), psoriasis (Mudigonda *et al.*, 2012), systemic lupus erythematosus (Xia *et al.*, 2015), and inflammatory bowel diseases (Yen *et al.*, 2006). Some reports have suggested the participation of IL-23 in the development of atherogenesis (Duvallat *et al.*, 2011). However, the results in animal models and humans are contradictory. In an animal model (IL-23p19^{-/-} mice), Savvatis *et al.* (2014) reported that after myocardial infarction, IL-23 deficiency results in myocardial inflammation, lower

Departments of ¹Molecular Biology and ²Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico.

³Research Unit on Endocrine and Metabolic Diseases, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico.

⁴Department of Developmental Neurobiology, Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City, Mexico.

⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

*The contributions of these authors are equal and the order of authorship is arbitrary.

cardiac fibroblast activation, adverse remodeling, ventricular rupture, and increased mortality; these findings suggest an antiatherogenic effect of this cytokine. In contrast, in peripheral arterial disease patients, an increase in IL-23 serum levels and a higher IL-23 expression in human carotid lesions were observed (Erbel *et al.*, 2011; David *et al.*, 2012). Similarly, high levels of IL-23 were detected in patients with carotid atherosclerosis when compared with healthy controls. These high levels were associated with disease progression and increased mortality (Abbas *et al.*, 2015). The structure of this cytokine includes the alpha subunit (p19; encoded by *IL-23A* gene) and the beta subunit (p40; encoded by *IL-12B* gene). *IL-23A* and *IL-12B* genes are polymorphic. Polymorphisms present in the *IL-12B* gene have been associated with psoriasis (Cargill *et al.*, 2007), type 1 (Windsor *et al.*, 2004) and type 2 diabetes mellitus (Yaghini *et al.*, 2012), multiple sclerosis (van Veen *et al.*, 2001), and ankylosing spondylitis (Wong *et al.*, 2012). However, information regarding the association of polymorphisms present in the *IL-12B* gene with CAD is scarce. In a small Japanese cohort, Momiyama *et al.* (2005), failed to show an association between rs3212227 *IL-12B* polymorphism and the presence or severity of CAD (diagnosed by angiography). These results are in agreement with those reported by Mangino *et al.* (2008) in patients with myocardial infarction from a British cohort. Thus, the aim of the present study was to evaluate the association of the *IL-12B* polymorphisms with premature CAD (pCAD) and with cardiovascular risk factors in a cohort of Mexican individuals.

Materials and Methods

Subjects

We included 2163 individuals (1133 patients with pCAD and 1030 healthy controls) from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican study, which was approved by Bioethics and Investigation Committee of the Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (Project number 19-1104). pCAD was defined as a history of myocardial infarction, angioplasty, revascularization surgery, or coronary stenosis >50% on angiography, diagnosed before age 55 in men and before age 65 in women. Controls were apparently healthy asymptomatic individuals without a family history of pCAD, recruited from blood bank donors and through brochures posted in social service centers. Exclusion criteria included congestive heart failure and liver, renal, thyroid, or oncological disease. Standardized questionnaires were applied to all participants to obtain demographic information, history of nutritional habits, physical activity, family medical history, alcohol consumption, and pharmacological treatment. Demographic, clinical, anthropometric, biochemical parameters, and cardiovascular risk factors were evaluated in all individuals as previously described (Medina-Urrutia *et al.*, 2015; Posadas-Sánchez *et al.*, 2017a, 2017b). All participants provided informed consent. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Computed axial tomography study

All individuals underwent a computed tomography scan of the chest and abdomen. Then, we determined (i) the

coronary artery calcification (CAC) score using the Agatston method (Mautner *et al.*, 1994), (ii) total abdominal fat, subcutaneous and visceral abdominal fat (SAF and VAF) areas according to the procedure used by Kvist (Kvist *et al.*, 1988), and (iii) hepatic to splenic attenuation ratio as previously reported by Longo *et al.* (1993) were determined after performing a computed tomography of the chest and abdomen in all individuals. Of the 1479 control individuals included in the GEA study, 449 had a CAC score >0 and were considered as individuals with subclinical atherosclerosis, whereas 1030 subjects had a CAC score of zero and hence formed the group of healthy controls.

Genetic analysis

High-molecular-weight genomic DNA was extracted from peripheral blood using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). According to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA), rs1363670, rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694, and rs1368439 *IL-12B* polymorphisms were determined using 5' exonuclease TaqMan genotyping assays on an ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR system. To corroborate the adequate assignment of the genotypes in the TaqMan assays, we randomly selected and repeated 10% of the samples. These samples were 100% concordant in two independent assays.

Statistical analyses

Data are expressed as the mean (standard deviation), median (interquartile range), or frequencies. Analysis of continuous and categorical variables was made using Student's *t*, Mann-Whitney *U*, and chi-squared tests as appropriate. Associations of polymorphisms with pCAD, and cardiovascular risk factors under codominant 1, codominant 2, heterozygote, additive, recessive, and dominant models were evaluated using logistic regression analysis. All models were adjusted for confounding variables. Models were constructed using one variable at a time; final models included variables with biological relevance or with statistical significance, or both. The statistical power to detect associations was estimated with QUANTO software (biostats.usc.edu/Quanto.html). All the study polymorphisms studied were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). We used SPSS software v15.0 (SPSS, Chicago, IL) for all analyses. A p -value <0.05 was considered significant. Pairwise linkage disequilibrium (LD, D') estimations between polymorphisms and haplotype reconstruction were performed with Haploview version 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA).

Results

Clinical and cardiovascular risk factors

In Table 1, clinical and biochemical characteristics, as well as demographic, lifestyle, and tomographic data of the study population are shown. Age, percentage of male, body mass index (BMI), waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, VAF, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, hypoalbuminemia, hypertriglyceridemia, obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), hyperinsulinemia, insulin resistance (IR), hypertension, hypoadiponectinemia,

TABLE 1. TOMOGRAPHIC DATA, DEMOGRAPHIC, LIFESTYLE, CLINICAL, AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS IN THE STUDY GROUPS

	Control (n=1030)	pCAD (n=1133)	p
Age (years)	51±9	54±8	<0.001
Sex (% men)	41.0	81.0	<0.001
BMI (kg/m ²)	27.9 [25.4–30.8]	28.3 [25.9–31.1]	0.004
Waist circumference (cm)	94±11	98±10	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	112 [104–123]	116 [106–127]	<0.001
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.5 [65.0–76.0]	71.0 [65.5–77.5]	0.011
Visceral abdominal fat (cm ²)	139 [105–181]	168 [129–215]	<0.001
ALT (IU/L)	24 [18–34]	26 [19–36]	0.025
AST (UI/L)	25 [21–30]	26 [22–31]	0.001
Total cholesterol <200 mg/dL (%)	36.4	20.3	<0.001
LDL-cholesterol ≥130 mg/dL (%)	29.6	16.1	<0.001
Hypoalphalipoproteinemia (%)	52.1	67.1	<0.001
Non-HDL cholesterol >160 mg/dL (%)	27.9	19.5	<0.001
Hypertriglyceridemia (%)	47.3	56.2	<0.001
Obesity (%)	30.3	35.1	0.009
Abdominal obesity (%)	81.2	83.7	0.067
T2DM (%)	9.6	35.5	<0.001
Hyperinsulinemia (%)	52.2	66.1	<0.001
Insulin resistance (%)	54.2	72.8	<0.001
Hypertension (%)	18.9	68.1	<0.001
High visceral abdominal fat (%)	54.7	64.7	<0.001
Current smoking (%)	22.6	11.6	<0.001
Hypoadiponectinemia (%)	42.9	57.6	<0.001
hsCRP >3 mg/L (%)	26.7	20.5	0.002
Hyperuricemia (%)	20.5	36.1	<0.001

Data are shown as mean±standard deviation, median [interquartile range] or percentage. For continuous variables, comparisons were made using Student's *t*-test or Mann Whitney *U* test, as appropriate. Chi-squared analysis was performed for categorical variables.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; pCAD, premature coronary artery disease; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; T2DM, type 2 diabetes mellitus.

and hyperuricemia were higher in pCAD patients than healthy controls. On the other hand, controls presented high levels of total cholesterol, low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), non-high-density lipoprotein-cholesterol, and high sensitivity C-reactive protein when compared with pCAD patients.

Association of IL-12B polymorphisms with pCAD

Distribution of rs3212220, rs3212227, rs6887695, rs1433048, rs2853694, and rs1368439 polymorphisms was similar in pCAD patients and healthy controls. On the other hand, under different models, the rs1363670 polymorphism was associated with a low risk of pCAD (odds ratio [OR]=0.718, 95% confidence interval [CI]: 0.528–0.976, $p_{\text{dominant}}=0.034$; OR=0.701, 95% CI: 0.514–0.955, $p_{\text{heterozygote}}=0.024$; OR=0.702, 95% CI=0.515–0.958, $p_{\text{codominant1}}=0.025$) (Table 2). The models were adjusted for age, sex, BMI, current smoking, LDL-C, T2DM, and apolipoprotein A.

Association of the IL-12B polymorphisms with cardiovascular risk factors

The association of the IL-12B polymorphisms with cardiovascular risk factors was evaluated independently in pCAD patients and healthy controls. In healthy controls, under different inheritance models, the rs3212227 (OR=0.759, $p_{\text{additive}}=0.031$; OR=0.603, $p_{\text{dominant}}=0.008$; OR=0.693, $p_{\text{heterozygote}}=0.040$; OR=0.605, $p_{\text{codominant1}}=0.011$), rs3212220 (OR=0.770, $p_{\text{additive}}=0.041$; OR=0.585, $p_{\text{dominant}}=0.005$; OR=0.646, $p_{\text{heterozygote}}=0.015$; OR=0.558,

$p_{\text{codominant1}}=0.004$), and rs6887695 (OR=0.660, $p_{\text{heterozygote}}=0.021$; OR=0.652, $p_{\text{codominant1}}=0.025$) polymorphisms were associated with SAF > p75. In the same way, rs6887695 was associated with a high risk of central obesity (OR=2.272, $p_{\text{recessive}}=0.029$; OR=2.369, $p_{\text{codominant1}}=0.030$) (Table 3). The table included only associations with statistical power higher than 80%. Associations with a statistical power lower than 80% are shown in Supplementary Table S1.

In pCAD patients, under different inheritance models, the rs2853694 was associated with a low risk of IR (OR=0.743, $p_{\text{additive}}=0.005$; OR=0.711, $p_{\text{dominant}}=0.015$; OR=0.624, $p_{\text{recessive}}=0.034$; OR=0.543, $p_{\text{codominant1}}=0.009$). In the same way, the rs3212227 (OR=0.757, $p_{\text{heterozygote}}=0.027$) and rs3212220 (OR=0.768, $p_{\text{heterozygote}}=0.038$) polymorphisms were associated with a low risk of metabolic syndrome. Finally, the rs6887695 polymorphism was associated with a high risk of hyperuricemia (OR=1.565, $p_{\text{recessive}}=0.025$) (Table 4). The table included only associations with statistical power higher than 80%. Associations with a statistical power lower than 80% are shown in Supplementary Table S2.

Haplotype analysis

In this analysis, only the rs3212227 and rs3212220 polymorphisms were in linkage disequilibrium ($D'=0.88$) (Supplementary Fig. S1). Seven different haplotypes were observed, however, none of them was associated with the presence of pCAD (Supplementary Table S3). The clinical data spreadsheet is included in the Supplementary Data.

TABLE 2. ASSOCIATIONS OF *IL-12B* POLYMORPHISMS WITH PREMATURE CORONARY ARTERY DISEASE

Polymorphism	Genotype frequency			MAF	Model	OR [95% CI]	p
rs1368439 Control (n = 1030)	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	0.075	Additive	0.906 [0.680–1.208]	0.503
					Dominant	0.890 [0.655–1.209]	0.456
					Recessive	1.104 [0.281–4.342]	0.888
					Heterozygote	0.882 [0.646–1.204]	0.429
					Codominant 1	0.882 [0.646–1.206]	0.431
pCAD (n = 1133)				0.069	Codominant 2	1.086 [0.276–4.275]	0.906
					Additive	0.917 [0.786–1.070]	0.270
					Dominant	0.876 [0.702–1.093]	0.242
					Recessive	0.923 [0.692–1.231]	0.586
					Heterozygote	0.926 [0.750–1.143]	0.475
rs3212227 Control (n = 1030)	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	0.415	Codominant 1	0.896 [0.711–1.129]	0.352
					Codominant 2	0.852 [0.621–1.168]	0.319
					Additive	1.111 [0.945–1.305]	0.202
					Dominant	1.148 [0.939–1.416]	0.199
					Recessive	1.127 [0.786–1.615]	0.517
pCAD (n = 1133)				0.399	Heterozygote	1.104 [0.893–1.365]	0.361
					Codominant 1	1.137 [0.912–1.418]	0.255
					Codominant 2	1.197 [0.823–1.742]	0.347
					Additive	0.914 [0.785–1.065]	0.249
					Dominant	0.874 [0.699–1.092]	0.235
rs2853694 Control (n = 1030)	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	0.300	Recessive	0.914 [0.690–1.210]	0.529
					Heterozygote	0.932 [0.755–1.151]	0.513
					Codominant 1	0.882 [0.697–1.117]	0.298
					Codominant 2	0.848 [0.620–1.161]	0.305
					Additive	0.770 [0.578–1.025]	0.074
pCAD (n = 1133)				0.314	Dominant	0.745 [0.551–1.008]	0.057
					Recessive	1.016 [0.253–4.080]	0.982
					Heterozygote	0.737 [0.542–1.003]	0.052
					Codominant 1	0.737 [0.542–1.003]	0.052
					Codominant 2	0.975 [0.243–3.918]	0.971
rs3212220 Control (n = 1030)	<i>CC</i>	<i>CA</i>	<i>AA</i>	0.422	Additive	0.745 [0.553–1.003]	0.053
					Dominant	0.718 [0.528–0.976]	0.034
					Recessive	2.035 [0.298–13.87]	0.468
					Heterozygote	0.701 [0.514–0.955]	0.024
					Codominant 1	0.702 [0.515–0.958]	0.025
pCAD (n = 1133)				0.406	Codominant 2	1.941 [0.284–13.25]	0.499
					Additive	0.965 [0.823–1.131]	0.658
					Dominant	0.998 [0.807–1.235]	0.987
					Recessive	0.857 [0.614–1.197]	0.365
					Heterozygote	1.062 [0.860–1.311]	0.578
rs1433048 Control (n = 1030)	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	0.082	Codominant 1	1.032 [0.825–1.290]	0.785
					Codominant 2	0.871 [0.612–1.240]	0.445
					Additive	0.770 [0.578–1.025]	0.074
					Dominant	0.745 [0.551–1.008]	0.057
					Recessive	1.016 [0.253–4.080]	0.982
pCAD (n = 1133)				0.066	Heterozygote	0.737 [0.542–1.003]	0.052
					Codominant 1	0.737 [0.542–1.003]	0.052
					Codominant 2	0.975 [0.243–3.918]	0.971
					Additive	0.745 [0.553–1.003]	0.053
					Dominant	0.718 [0.528–0.976]	0.034
rs1363670 Control (n = 1030)	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>TT</i>	0.079	Recessive	2.035 [0.298–13.87]	0.468
					Heterozygote	0.701 [0.514–0.955]	0.024
					Codominant 1	0.702 [0.515–0.958]	0.025
					Codominant 2	1.941 [0.284–13.25]	0.499
					Additive	0.965 [0.823–1.131]	0.658
pCAD (n = 1133)				0.063	Dominant	0.998 [0.807–1.235]	0.987
					Recessive	0.857 [0.614–1.197]	0.365
					Heterozygote	1.062 [0.860–1.311]	0.578
					Codominant 1	1.032 [0.825–1.290]	0.785
					Codominant 2	0.871 [0.612–1.240]	0.445
rs6887695 Control (n = 1030)	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>	0.353	Additive	0.965 [0.823–1.131]	0.658
					Dominant	0.998 [0.807–1.235]	0.987
					Recessive	0.857 [0.614–1.197]	0.365
					Heterozygote	1.062 [0.860–1.311]	0.578
					Codominant 1	1.032 [0.825–1.290]	0.785
pCAD (n = 1133)				0.344	Codominant 2	0.871 [0.612–1.240]	0.445

In bold are shown the significant models.

Models were adjusted for age, sex, BMI, current smoking, low-density lipoprotein cholesterol, T2DM, and apolipoprotein A. OR, odds ratio; CI, confidence interval; MAF, minor allele frequency.

Discussion

In a cohort of Mexican individuals, we reported the association of the *IL-12B* rs1363670 polymorphism with a low risk of pCAD. In healthy controls, the rs3212227, rs3212220,

and rs6887695 polymorphisms were associated with a low risk of SAF > p75, while rs6887695 was associated with a high risk of central obesity. In contrast, in pCAD patients, rs2853694 was associated with a low risk of IR; rs3212227 and rs3212220 were additionally associated with a low risk of

TABLE 3. ASSOCIATIONS OF THE *IL-12B* POLYMORPHISMS WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN HEALTHY CONTROLS

Polymorphisms	Genotype frequency			MAF	Model	OR [95% CI]	p
SAF > p75							
rs3212227	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>				
No (n=519)	0.320	0.500	0.180	0.430	Additive	0.759 [0.590–0.976]	0.031
Yes (n=511)	0.359	0.486	0.155	0.397	Dominant	0.603 [0.415–0.874]	0.008
					Heterozygote	0.693 [0.489–0.984]	0.040
					Codominant 1	0.605 [0.410–0.893]	0.011
rs3212220	<i>CC</i>	<i>CA</i>	<i>AA</i>		Additive	0.770 [0.600–0.990]	0.041
No (n=519)	0.316	0.500	0.184	0.433	Dominant	0.585 [0.402–0.850]	0.005
Yes (n=511)	0.355	0.476	0.169	0.406	Heterozygote	0.646 [0.455–0.917]	0.015
					Codominant 1	0.558 [0.375–0.829]	0.004
rs6887695	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>				
No (n=519)	0.378	0.492	0.129	0.375	Heterozygote	0.660 [0.465–0.938]	0.021
Yes (n=511)	0.458	0.428	0.114	0.328	Codominant 1	0.652 [0.448–0.947]	0.025
Central obesity							
rs6887695	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>				
No (n=194)	79 (0.407)	92 (0.474)	23 (0.119)	0.356	Recessive	2.272 [1.090–4.736]	0.029
Yes (n=836)	351 (0.420)	380 (0.455)	105 (0.125)	0.353	Codominant 1	2.369 [1.086–5.169]	0.030

Models were adjusted for age, sex, and BMI.
SAF, subcutaneous abdominal fat.

metabolic syndrome, and the rs6887695 polymorphism was associated with a high risk of hyperuricemia. Two polymorphisms (rs3212227, and rs3212220) were associated in both groups with different conditions: in controls with a low risk of SAF and in pCAD patients with a low risk of metabolic syndrome.

IL-23 cytokine is composed of two subunits: the alpha p19 subunit encoded by the *IL-23A* gene and the beta p40 subunit encoded by *IL-12B* gene. Previously, in the same cohort of individuals, we evaluated the association of the *IL-23A* polymorphisms with the presence of pCAD and cardiovascular risk factors (Vázquez-Vázquez *et al.*, 2019) and detected two *IL-23A* polymorphisms (rs2066808, and rs11171806) associated with a low risk of IR; in fact,

rs2066808 was associated with a high risk of hyperuricemia. These results agree with the findings in the present study when we analyzed the *IL-12B* gene polymorphisms. In pCAD patients, we detected one polymorphism (rs2853694) associated with a low risk of IR and another (rs6887695) with a high risk of hyperuricemia. Previous studies have shown that IR is significantly associated with the development and progression of coronary atherosclerosis (An *et al.*, 2012; Iguchi *et al.*, 2014). Hanley *et al.* (2002) analyzed the cohort of the San Antonio Heart Study and reported an independent association between IR and the risk of CAD. In the same way, Eddy *et al.* (2009) reported that IR was the single most frequent cause of CAD. Several cross-sectional and prospective studies provide clinical evidence that IR, in nondiabetic

TABLE 4. ASSOCIATION OF THE *IL-12B* POLYMORPHISMS WITH CARDIOVASCULAR RISK FACTORS IN PREMATURE CORONARY ARTERY DISEASE PATIENTS

Polymorphism	Genotype frequency			MAF	Model	OR [95% CI]	p
Insulin resistance							
rs2853694	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>				
No (n=309)	0.410	0.466	0.125	0.356	Additive	0.743 [0.605–0.913]	0.005
Yes (n=824)	0.490	0.423	0.087	0.300	Dominant	0.711 [0.541–0.935]	0.015
					Recessive	0.624 [0.404–0.964]	0.034
					Codominant 2	0.543 [0.343–0.860]	0.009
Metabolic syndrome							
rs3212227	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>				
No (n=478)	0.328	0.536	0.136	0.404	Heterozygote	0.757 [0.589–0.971]	0.027
Yes (n=655)	0.368	0.472	0.160	0.396			
rs3212220	<i>CC</i>	<i>CA</i>	<i>AA</i>				
No (n=478)	0.326	0.531	0.142	0.408	Heterozygote	0.768 [0.598–0.986]	0.038
Yes (n=655)	0.362	0.469	0.169	0.404			
Hyperuricemia							
rs6887695	<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>				
No (n=717)	0.414	0.495	0.091	0.338	Recessive	1.565 [1.059–2.314]	0.025
Yes (n=416)	0.421	0.446	0.133	0.356			

The models were adjusted for age, sex, and BMI.

subjects, is a major cardiovascular risk factor, independently of others (Tzagournis *et al.*, 1968; Adeva-Andany *et al.*, 2019). Considering this information, we suggest an association of the *IL-12B* and *IL-23A* polymorphisms with a low risk of IR and in consequence with a low risk of the pCAD development in our population. On the other hand, several meta-analysis of observational studies have found that hyperuricemia could significantly increase the risk of coronary heart disease and the risk of coronary events (Wheeler *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). The association of hyperuricemia with CAD can be explained by the fact that uric acid may stimulate the proliferation of vascular smooth cells, reduce the production of nitric oxide, and diminish the activity of vascular nitric oxide (Waring *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2007). Moreover, it is well known that high levels of uric acid are associated with high levels of proinflammatory cytokines (Ruggiero *et al.*, 2006) and, in consequence, with a high risk of cardiovascular diseases (Tiong and Brieger, 2005). In pCAD patients herein, the *IL-12B* rs6887695 polymorphism was associated with a high risk of hyperuricemia. Based on this result, and the association of the *IL-23A* rs2066808 polymorphism with a high risk of hyperuricemia (previously reported in our cohort), we can suggest a link between these polymorphisms, the risk of hyperuricemia, and the risk of CAD.

The polymorphisms for which we detected an association in this study, had been previously associated with some diseases. Namely, rs1363670 has been associated with Crohn's disease (Henckaerts *et al.*, 2009; Ferguson *et al.*, 2010; Vermeire *et al.*, 2010), while rs3212227 has been associated with rheumatoid arthritis (Wang *et al.*, 2015; Manolova *et al.*, 2020), pulmonary tuberculosis (Morris *et al.*, 2011), breast cancer (Kaarvatn *et al.*, 2012), type 1 diabetes mellitus (Morahan *et al.*, 2009), and ankylosing spondylitis (Wong *et al.*, 2012). On the other hand, rs3212220 has shown a significant association with not only pulmonary tuberculosis (Abhimanyu *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2011) but also psoriasis (Cargill *et al.*, 2007). Leprosy (Ali *et al.*, 2013) and Crohn's disease (McGovern *et al.*, 2009) have been associated with rs2853694. In addition, an association of relapsing-remitting multiple sclerosis (Javan *et al.*, 2017) and psoriatic arthritis (Kaarvatn *et al.*, 2012) with rs6887695 has been documented. Of note, some of these polymorphisms have been associated with variations in the levels/expression of p40 and IL-23 (Stanilova and Miteva, 2005; Morahan *et al.*, 2009; Kaarvatn *et al.*, 2012; Manolova *et al.*, 2020). The rs3212227 has been associated with variations in levels of IL-12p40 and/or IL-23 in patients with ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and brucellosis (Eskandari-Nasab *et al.*, 2013; Ivanova *et al.*, 2019; Manolova *et al.*, 2020). Also, it has been associated with IL-12 mRNA expression in healthy individuals (Wei *et al.*, 2016). On the other hand, the rs3212220 has been associated with IL-12 levels in patients with pulmonary tuberculosis (Abhimanyu *et al.*, 2011). These data support the functional effect of the rs3212227 and rs3212220 polymorphisms, that in our study were associated with SAF > p75 and metabolic syndrome. Only two studies have analyzed the association of the *IL-12B* polymorphisms with cardiovascular diseases: one of them in patients with CAD (Momiya *et al.*, 2005) and the other in patients with myocardial infarction (Mangino *et al.*, 2008). It has been reported that IL-

12B can induce the expression of interferon (IFN)- γ , leading to the differentiation and proliferation of Th1 (Trinchieri *et al.*, 2003). Alternatively, it has been reported that a deficiency in p40 results in a weakened migration of dendritic cells and a decreased ability to activate naive T cells (Johnston *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Beta p40 subunit is also part of IL-12 and, together with IL-23, IL-27, and IL-35, constitutes the IL-12 cytokine family (Posadas-Sánchez and Vargas-Alarcón, 2018). IL-12, known as the Th1-response master controller, stimulates T and NK cells to produce IFN- γ , which induces multiple proatherogenic processes in the atherosclerotic lesion (Hansson *et al.*, 2006). Gunsten *et al.* (2009) reported that the homodimerization of p40 could generate IL12p80, which abrogates IL-12 and IL-23 downstream signaling through binding to IL-12 β 2R subunit.

The strengths of the present study are the following. First, we included individuals belonging to a Mexican cohort that had been evaluated from the demographic, clinical, anthropometric, biochemical, and tomographic points of view. This allowed us to analyze an important number of cardiovascular risk factors and, at the same time, adjust the study considering possible confounders. Second, in the control group, a computer axial tomography study was carried out, and in the genetic study, we formed a control group of only individuals with a CAC score of zero. Third, in the results section, we only included the associations with a statistical power >80%. Finally, considering that the Mexican population is an admixture of Caucasian, Amerindian, and African genes and to avoid the population stratification as a bias or confounding factor, the individuals (patients and controls) of the GEA study were evaluated using 256 ancestry markers. These results showed that global ancestry was not significantly different between pCAD patients and healthy controls (Posadas-Sánchez *et al.*, 2017a, 2017b). The study limitations should be considered. It was not possible to measure the *IL-12B* gene expression in the study groups, and so, we could not establish if there were differences in this expression in pCAD patients and healthy controls. This limitation also prevented us from establishing whether there were associations between the genotypes of the polymorphisms studied here and the *IL-12B* gene expression. On the other hand, we did not include experimental designs to establish the functionality of the study polymorphisms. Finally, conclusions on causality cannot be made because of the transversal character of the study.

In summary, our results indicate that *IL-12B* rs1363670 polymorphism was associated with a low risk of pCAD. In controls, an association with SAF >75 (rs3212227, rs3212220, and rs6887695) and with central obesity (rs6887695) was detected. On the other hand, in pCAD patients, the polymorphisms were associated with a low risk of IR (rs2853694), metabolic syndrome (rs3212227 and rs3212220), and high risk of hyperuricemia (rs6887695).

Acknowledgments

C.V.-V. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The authors are grateful to the study participants. The Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections. The authors are grateful

to Marva Arellano-Gonzalez and Silvestre Ramírez-Fuentes for their technical assistance.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Fronteras de la Ciencia No. 1958), Mexico City, Mexico.

Supplementary Material

Supplementary Data
Supplementary Table S1
Supplementary Table S2
Supplementary Table S3
Supplementary Figure S1

References

- Abbas, A., Gregersen, I., Holm, S., Daissormont, I., Bjerkeli, V., Krohg-Sørensen, K., *et al.* (2015). Interleukin 23 levels are increased in carotid atherosclerosis. Possible role for the interleukin 23/interleukin 17 axis. *Stroke* **46**, 793–799.
- Abhimanyu, M., Mangangcha, I.R., Jha, P., Arora, K., Mukerji, M., Banavaliker, J.N., *et al.* (2011). Differential serum cytokine levels are associated with cytokine gene polymorphisms in north Indians with active pulmonary tuberculosis. *Infect Genet Evol* **11**, 1015–1022.
- Adeva-Andany, M.M., Martínez-Rodríguez, J., González-Lucán, M., Fernández-Fernández, C., and Castro-Quintela, E. (2019). Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes Metab Syndr* **13**, 1449–1455.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.H., de Sauvage, F.J., and Gurney, A.L. (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910–1914.
- Ali, S., Srivastava, A.K., Chopra, R., Aggarwal, S., Garg, V.K., Bhattacharya, S.N., *et al.* (2013). IL12B SNPs and copy number variation in IL23R gene associated with susceptibility to leprosy. *J Med Genet* **50**, 34–42.
- An, X., Yu, D., Zhang, R., Zhu, J., Du, R., Shi, Y., *et al.* (2012). Insulin resistance predicts progression of de novo atherosclerotic plaques in patients with coronary heart disease: a one-year follow-up study. *Cardiovasc Diabetol* **11**, 71.
- Benjamin, E.J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M.S., Callaway, C.W., Carson, A.P., *et al.* (2019). Heart disease and stroke statistics-2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **139**, e56–e528.
- Braga, F., Pasqualetti, S., Ferraro, S., and Panteghini, M. (2016). Hyperuricemia as risk factor for coronary heart disease incidence and mortality in the general population: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* **54**, 7–15.
- Cargill, M., Schrodi, S.J., Chang, M., Garcia, V.E., Brandon, R., Callis, K.P., *et al.* (2007). A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet* **80**, 273–290.
- David, A., Saitta, S., De Caridi, G., Benedetto, F., Massara, M., Risitano, D.C., *et al.* (2012). Interleukin-23 serum levels in patients affected by peripheral arterial disease. *Clin Biochem* **45**, 275–278.
- Dawson, J., Quinn, T., and Walters, M. (2007). Uric acid reduction: a new paradigm in the management of cardiovascular risk? *Curr Med Chem* **14**, 1879–1886.
- Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., Falgarone, G., and Boissier, M.C. (2011). Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med* **43**, 503–511.
- Eddy, D., Schlessinger, L., Kahn, R., Peskin, B., and Schiebinger, R. (2009). Relationship of insulin resistance and related metabolic variables to coronary artery disease: a mathematical analysis. *Diabetes Care* **32**, 361–366.
- Erbel, C., Dengler, T.J., Wangler, S., Lasitschka, F., Bea, F., Wambgsans, N., *et al.* (2011). Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability. *Basic Res Cardiol* **106**, 125–134.
- Eskandari-Nasab, E., Moghadampour, M., Asadi-Saghandi, A., Kharazi-Nejad, E., Rezaeifar, A., and Pourmasoumi, H. (2013). Levels of interleukin-(IL)-12p40 are markedly increased in brucellosis among patients with specific IL-12B genotypes. *Scand J Immunol* **78**, 85–91.
- Ferguson, L.R., Han, D.Y., Fraser, A.G., Huebner, C., Lam, W.J., and Morgan, A.R. (2010). IL23R and IL12B SNPs and haplotypes strongly associate with Crohn's disease risk in a New Zealand population. *Gastroenterol Res Pract* **2010**, 539461.
- Gunsten, S., Mikols, C.L., Grayson, M.H., Schwendener, R.A., Agapov, E., Tidwell, R.M., *et al.* (2009). IL-12 p80-dependent macrophage recruitment primes the host for increased survival following a lethal respiratory viral infection. *Immunology* **126**, 500–513.
- Hanley, A.J.G., Williams, K., Stern, M.P., and Haffner, S.M. (2002). Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* **25**, 1177–1184.
- Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* **352**, 1685–1695.
- Hansson, G.K., Robertson, A.K.L., and Söderberg-Nauclér, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Ann Rev Pathol Mech Dis* **1**, 297–329.
- Henckaerts, L., Van Steen, K., Verstreken, I., Cleynen, I., Franke, A., and Schreiber, V.S. (2009). Genetic risk profiling and prediction of disease course in Crohn's disease patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7**, 972–980.e2.
- Iguchi, T., Hasegawa, T., Otsuka, K., Matsumoto, K., Yamazaki, T., Nishimura, S., *et al.* (2014). Insulin resistance is associated with coronary plaque vulnerability: insight from optical coherence tomography analysis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* **15**, 284–291.
- Ivanova, M., Manolova, I., Miteva, L., Gancheva, R., Stoilov, R., and Stanilova, S. (2019). Genetic variations in the IL-12B gene in association with IL-23 and IL-12p40 serum levels in ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* **39**, 111–119.
- Javan, M.R., Shahraki, S., Safa, A., Zamani, M.R., Salmaninejad, A., and Aslani, S. (2017). An interleukin 12 B single nucleotide polymorphism increases IL-12p40 production and is associated with increased disease susceptibility in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res* **39**, 435–441.
- Johnston, A., Xing, X., Swindell, W.R., Kochkodan, J., Riblett, M., Nair, R.P., *et al.* (2013). Susceptibility-associated genetic variation at IL12B enhances Th1 polarization in psoriasis. *Hum Mol Genet* **22**, 1807–1815.
- Kaarvatn, M.H., Vrbanc, J., Kulic, A., Knezevic, J., Petricevic, B., Balen, S., *et al.* (2012). Single nucleotide polymorphism

- in the interleukin 12B gene is associated with risk for breast cancer development. *Scand J Immunol* **76**, 329–335.
- Kim, S.Y., Guevara, J.P., Kim, K.M., Choi, H.K., Heitjan, D.F., and Albert, D.A. (2010). Hyperuricemia and coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res* **62**, 170–180.
- Kvist, H., Chowdhury, B., Grangård, U., Tylén, U., and Sjöström, L. (1988). Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: predictive equations. *Am J Clin Nutr* **48**, 1351–1361.
- Li, M., Hu, X., Fan, Y., Li, K., Zhang, X., Hou, W., *et al.* (2016). Hyperuricemia and the risk for coronary heart disease morbidity and mortality a systematic review and dose-response meta-analysis. *Sci Rep* **6**, 19520.
- Li, X., Bai, L., Fang, J., Hou, S., Zhou, Q., Yu, H., *et al.* (2014). Genetic variations of IL-12B, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 in Behcet's disease and VKH syndrome. *PLoS One* **9**, e98373.
- Lim, H.X., Hong, H.J., Jung, M.Y., Cho, D., and Kim, T.S. (2013). Principal role of IL-12p40 in the decreased Th1 and Th17 responses driven by dendritic cells of mice lacking IL-12 and IL-18. *Cytokine* **63**, 179–186.
- Longo, R., Ricci, C., Masutti, F., Vidimari, R., Crocè, L.S., Bercich, L., *et al.* (1993). Fatty infiltration of the liver. Quantification by 1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* **28**, 297–302.
- Mangino, M., Braund, P., Singh, R., Steeds, R., Stevens, S., Channer, K.S., *et al.* (2008). Association analysis of IL-12B and IL-23R polymorphisms in myocardial infarction. *J Mol Med* **86**, 99–103.
- Manolova, I., Ivanova, M., Vasilev, G., Stoilov, R., Miteva, L., and Stanilova, S. (2020). Impact of IL12B polymorphisms on genetic susceptibility and IL-12p40 and IL-23 serum levels in rheumatoid arthritis. *Immunol Invest* **49**, 1–14.
- Mautner, G.C., Mautner, S.L., Froehlich, J., Feuerstein, I.M., Proschan, M.A., Roberts, W.C., *et al.* (1994). Coronary artery calcification: assessment with electron beam CT and histomorphometric correlation. *Radiology* **192**, 619–623.
- McGovern, D.P.B., Rotter, J.I., Mei, L., Haritunians, T., Landers, C., Derkowski, C., *et al.* (2009). Genetic epistasis of IL23/IL17 pathway genes in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 883–889.
- Medina-Urrutia, A., Posadas-Romero, C., Posadas-Sánchez, R., Jorge-Galarza, E., Villarreal-Molina, T., González-Salazar, M.C., *et al.* (2015). Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* **14**, 20.
- Mohammadi, M., Hayatbakhsh, M.M., Zahedi, M.J., Jalalpour, M.R., and Pakgohar, A. (2011). Serum interleukin-23 levels in patients with ulcerative colitis. *Iran J Immunol* **8**, 183–188.
- Momiyama, Y., Ohmori, R., Nagano, M., Kato, R., Taniguchi, H., Egashira, T., *et al.* (2005). Polymorphism of the 3'-untranslated region of interleukin-12 p40 gene is not associated with the presence or severity of coronary artery disease. *Circ J* **69**, 793–797.
- Morahan, G., McKinnon, E., Berry, J., Browning, B., Julier, C., and Pociot, F. (2009). Evaluation of IL12B as a candidate type I diabetes susceptibility gene using data from the Type I Diabetes Genetics Consortium. *Genes Immun* **10 Suppl 1**, S64–S68.
- Morris, G.A.J., Edwards, D.R.V., Hill, P.C., Wejse, C., Bisseye, C., Olesen, R., *et al.* (2011). Interleukin 12B (IL12B) genetic variation and pulmonary tuberculosis: a study of cohorts from The Gambia, Guinea-Bissau, United States and Argentina. *PLoS One* **6**, e16656.
- Mudigonda, P., Mudigonda, T., Feneran, A.N., Alamdari, H.S., Sandoval, L., and Feldman, S.R. (2012). Interleukin-23 and interleukin-17: importance in pathogenesis and therapy of psoriasis. *Dermatol Online J* **18**, 1.
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Angeles-Martínez, J., López-Bautista, F., Villarreal-Molina, T., Rodríguez-Pérez, J.M., *et al.* (2017a). Interleukin 35 polymorphisms are associated with decreased risk of premature coronary artery disease, metabolic parameters, and IL-35 levels: the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Study. *Mediators Inflamm* **2017**, 6012795.
- Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J.M., Coral-Vázquez, R.M., Roque-Ramírez, B., Llorente, L., *et al.* (2017b). Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study. *Oncotarget* **8**, 64459–64470.
- Posadas-Sánchez, R., and Vargas-Alarcón, G. (2018). Innate immunity in coronary disease. The role of interleukin-12 cytokine family in atherosclerosis. *Rev Invest Clin* **70**, 5–17.
- Rong, C., Hu, W., Wu, F., Cao, X., and Chen, F. (2012). Interleukin-23 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem* **361**, 243–248.
- Ruggiero, C., Cherubini, A., Ble, A., Bos, A.J.G., Maggio, M., Dixit, V.D., *et al.* (2006). Uric acid and inflammatory markers. *Eur Heart J* **27**, 1174–1181.
- Savvatis, K., Pappritz, K., Becher, P.M., Lindner, D., Zietsch, C., Volk, H.D., *et al.* (2014). Interleukin-23 deficiency leads to impaired wound healing and adverse prognosis after myocardial infarction. *Circ Heart Fail* **7**, 161–171.
- Stanilova, S., and Miteva, L. (2005). Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. *Genes Immun* **6**, 364–366.
- Stein, R., Ferrari, F., and Scolari, F. (2019). Genetics, dyslipidemia, and cardiovascular disease: new insights. *Curr Cardiol Rep* **21**, 68.
- Tiong, A.Y., and Brieger, D. (2005). Inflammation and coronary artery disease. *Am Heart J* **150**, 11–18.
- Trinchieri, G., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines. *Immunity* **19**, 641–644.
- Tzamouris, M., Chiles, R., Ryan, J.M., and Skillman, T.G. (1968). Interrelationships of hyperinsulinism and hypertriglyceridemia in young patients with coronary heart disease. *Circulation* **38**, 1156–1163.
- van Veen, T., Crusius, J.B., Schrijver, H.M., Bouma, G., Killenstein, J., van Winsen, L., *et al.* (2001). Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol* **50**, 275.
- Vázquez-Vázquez, C., Posadas-Sánchez, R., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J.M., Fragoso, J.M., Cardoso-Saldaña, G., *et al.* (2019). The rs2066808 polymorphism located near the IL-23A gene is associated with premature coronary artery disease in Mexican population (GEA study). *DNA Cell Biol* **38**, 880–886.
- Vermeire, S., Van Assche, G., and Rutgeerts, P. (2010). Role of genetics in prediction of disease course and response to therapy. *World J Gastroenterol* **16**, 2609.
- Wang, E.Y.Y., Yang, Q., and Liao, Z.G.G. (2015). Association of polymorphisms in interleukin (IL)-12A and -B genes with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Clin Exp Immunol* **180**, 83–89.

- Waring, W., Maxwell, S.R.J., and Webb, D.J. (2002). Uric acid concentrations and the mechanisms of cardiovascular disease. *Eur Heart J* **23**, 1888–1889.
- Wei, P., Kou, W., Zhang, C., Kang, H., Yao, H., Tang, X., *et al.* (2016). Genetic variations in interleukin-12B in allergic rhinitis. *Immunol Res* **64**, 329–336.
- Wheeler, J.G., Juzwishin, K.D.M., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., and Danesh, J. (2005). Serum uric acid and coronary heart disease in 9,458 incident cases and 155,084 controls: prospective study and meta-analysis. *PLoS Med* **2**, e76.
- Windsor, L., Morahan, G., Huang, D., McCann, V., Jones, T., James, I., *et al.* (2004). Alleles of the IL12B 3'UTR associate with late onset of type 1 diabetes. *Hum Immunol* **65**, 1432–1436.
- Wong, R.H., Wei, J.C.C., Huang, C.H., Lee, H.S., Chiou, S.Y., Lin, S.H., *et al.* (2012). Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* **39**, 135–140.
- Xia, L.P., Li, B.F., Shen, H., and Lu, J. (2015). Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis. *Scand J Rheumatol* **44**, 200–205.
- Yaghini, N., Mahmoodi, M., Hassanshahi, G., Asadikaram, G., Arababadi, M.K., Rezaeian, M., *et al.* (2012). Genetic variation of IL-12B (+1188 region) is associated with its decreased circulating levels and susceptibility to type 2 diabetes. *Biomark Med* **6**, 89–95.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* **116**, 1310–1316.

Address correspondence to:
Gilberto Vargas-Alarcón, PhD
Department of Molecular Biology
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Mexico City 14080
Mexico

E-mail: gvargas63@yahoo.com

Received for publication February 27, 2020; received in revised form March 31, 2020; accepted April 2, 2020.