

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Determinación de los alelos, genotipos y combinaciones multialelicas en los genes *APOA4* y *APOA5* y su contribución al desarrollo de la aterotrombosis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JAVIER BELISARIO RAMÍREZ LÓPEZ



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre del 2022

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

Determinación de los alelos, genotipos y combinaciones multialelicas en los genes *APOA4* Y *APOA5* y su contribución al desarrollo de la aterotrombosis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

JAVIER BELISARIO RAMÍREZ LÓPEZ

Director(a)

Dra. María del Rocío Gómez Ortega

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
(Cinvestav)

Asesor(a)

Dra. María Adelina Schlie Guzmán

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH)

M. en C. Nelsi Alejandra Burguete Argueta

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH)

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Septiembre del 2022



AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi universidad, y a todas las personas que participaron en mi formación académica ya sea de manera directa o indirecta, ya que gracias a su apoyo se concluye una etapa importante en mi vida.

De igual manera a mi directora la Dra. María del Rocío Gómez Ortega por su paciencia en la elaboración de la tesis y sus sabios consejos para ser una mejor persona, ya que cada uno de ellos son recibidos con mucho cariño.

A mis asesoras de tesis la Dra. María Adelina y la M. en C. Nelsi Alejandra por su apoyo brindado y las facilidades prestadas para que la presente tesis se llevara a cabo de la mejor manera.

Así mismo por último y no menos importante, al comité evaluador por brindarme su apoyo y las atenciones prestadas para la presentación de esta.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi corazón y amor a mi familia.

A mis padres a la Sra. Concepción López Hernández y al Sr. Abelardo Muñoz Zúñiga por todos sus sacrificios realizados hacia mí persona y mis hermanos, al enseñarme el camino para ser un hombre de bien, por estar a mi lado en todo momento y sobre todo por su amor y su apoyo incondicional.

A mis hermanos Iván de Jesús, Itary Montserrat y Romina Alejandra por brindarme su hombro en los momentos difíciles y que sin esperar nada a cambio han estado conmigo a cada paso de mi vida.

Y sobre todo a la Memoria de mi Abuelo el Sr. Belizario López López, siendo una de las personas mas importantes en mi vida, que me vió como un hijo y creyó en mi en todo momento, brindándome todo su amor y apoyo incondicional; Tuviste que partir de este mundo terrenal, pero te quedas habitando en mi corazón y en mi alma.



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL

DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 09 de septiembre de 2022

C. Javier Belisario Ramírez López

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Determinación de los alelos, genotipos y combinaciones multialélicas en los genes

APOA4 y APOA5 y su contribución al desarrollo de la aterotrombosis

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dr. Eduardo Estanislao Espinoza Medinilla

Dr. José Antonio De Fuentes Vicente

Dr. María Adelina Schlie Guzmán

Firmas:

[Firma]
[Firma]
[Firma]

Ccp. Expediente



INDICE

I INTRODUCCIÓN	1
II JUSTIFICACIÓN	2
III OBJETIVOS	3
IV ANTECEDENTES.....	4
V AREA DE ESTUDIO	6
VI MARCO TEORICO.....	8
Generalidades de las enfermedades cardiovasculares	8
Fisiopatología	11
Factores de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares..	13
Apolipoproteínas y el metabolismo de lípidos	15
VII METODO.....	21
Universo de trabajo	21
Descripción operacional de las variables	22
Estrategia experimental	26
Análisis de datos	29
VIII RESULTADOS	31
Estadística genética poblacional	31
Contribución de los alelos, genotipos y combinación multiloci con el IAM	34
Diferenciación poblacional	37
IX DISCUSIÓN.....	40
X CONCLUSION	46
XI PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	47
XII REFERENCIAS DOCUMENTALES	48

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios genéticos asociados con distintas enfermedades de índole cardiovascular en distintas poblaciones.....	5
Cuadro 2. Panorama de las variaciones genéticas en los genes (<i>APOA4</i> y <i>APOA5</i>) con las ECVs.....	19
Cuadro 3. Ubicación de los genes y polimorfismos empleados para la discriminación alélica.....	27
Cuadro 4. Condiciones para la amplificación de los polimorfismos de los genes <i>APOA4</i> y <i>APOA5</i>	28
Cuadro 5. Frecuencias de distribución alélica y genotípica entre los tres grupos de estudio.....	32
Cuadro 6. Determinación del equilibrio de Hardy Weinberg en las poblaciones de estudio.....	33
Cuadro 7. Determinación del desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos (rs5104 y rs662799).....	34
Cuadro 8. Distribución genotípica de los modelos Codominante, Dominante y Recesivo, en los polimorfismos rs5104 y rs662799.....	35
Cuadro 9. Contribución alélica, genotípicas y combinación multiloci con el IAM...	36
Cuadro 10. Diferenciación poblacional (IAM, CTL y CG).....	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la República Mexicana.....	6
Figura 2. Localización del Departamento de Toxicología del CINVESTAV-IPN.....	7
Figura 3. Etapas en el desarrollo de la placa aterosclerótica y sus complicaciones.....	10
Figura 4. Pasos para el desarrollo de la aterosclerosis.....	13
Figura 5. Implicaciones funcionales de los SNPs dentro de un gen.....	23
Figura 6. Manifestaciones clínicas de la aterotrombosis.....	24
Figura 7. Diferencia entre infarto agudo de miocardio tipo 1 y tipo 2.....	25
Figura 8. Representación esquemática del fundamento de la técnica de PCR en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqMan®.....	28
Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de algunas poblaciones del proyecto de los mil genomas con los grupos de estudio.....	39
Figura 10. Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs5104 y rs662799 en poblaciones de mil genomas y nuestras poblaciones de estudio.....	42

RESUMEN

Los genes que codifican para las apolipoproteínas *APOA4* y *APOA5* han sido relacionados con el metabolismo de lípidos y consecuentemente con su contribución al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Dichas enfermedades son complejas, heterogéneas, discapacitantes y causantes de más de un tercio de las muertes registradas en el mundo. Los polimorfismos localizados en estos genes han sido poco estudiados en nuestra población, dando origen al presente trabajo cuyo objetivo fue determinar la contribución genética de los polimorfismos rs5104 (*APOA4*) y rs662799 (*APOA5*) al desarrollo del infarto agudo al miocardio (IAM) en una muestra de la población mestiza mexicana. Para ello, se analizaron 700 individuos no relacionados entre sí divididos en tres grupos: 1) grupo de IAM (n=100), 2) grupo control (n=200) y 3) grupo control genómico (n=400). Nuestros resultados mostraron una mayor frecuencia del alelo rs5104-C en los individuos con IAM en comparación con los otros grupos de estudio (OR = 2.455, $p \leq 0.0005$). Estos resultados fueron consistentes con el estado homocigoto (rs5104-CC; OR= 2.483 $p \leq 0.093$). Por su parte, el alelo rs662799-G mostró una mayor frecuencia en individuos con IAM (OR = 2.471, $p \leq 0.0004$), como con su estado homocigoto (rs662799-GG) sugiriendo un mayor riesgo al IAM en comparación con los demás grupos (OR = 2.966, $p \leq 0.036$). Estos hallazgos fueron consistentes al comparar la combinación multiloci (*APOA4/APOA5*; C+G) entre los grupos, en donde los portadores de esta combinación mostraron un mayor riesgo al IAM (OR = 2.039, $95\%IC = 1.232-3.376$, $p \leq 0.007$). Nuestros resultados sugieren que dichos polimorfismos podrían convertirse en marcadores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares en la población mestiza mexicana. Sin embargo, estos resultados son preliminares y se deben tomar con cautela, por lo que se requieren de más estudios.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de condiciones complejas y heterogéneas causantes de más de un tercio de las muertes registradas en todo el mundo (OMS, 2017). La aterosclerosis, detonante principal de estas enfermedades, antecede al desarrollo de manifestaciones clínicas como el Infarto agudo al miocardio (IAM), la cardiopatía isquémica (CI) y el accidente cerebrovascular (ACV) (Morera *et al.*, 2003). Fisiológicamente, la aterosclerosis se origina a partir de la pérdida gradual de la función endotelial, relacionado a la acumulación de grasas y a la formación de una capa adiposa que desencadena una respuesta inflamatoria (Portilla *et al.*, 2014). Los hábitos de vida adoptados por la sociedad mexicana en las últimas dos décadas han sido relacionados con el incremento de las ECV, por lo que cada día se manifiestan a edades más tempranas (Cortes, 2016). Factores de riesgo clásicos como la hipertensión arterial, la diabetes tipo 2 (DT2), el hábito de fumar y la obesidad incrementan notablemente el riesgo de ECV, pero no ejercen la suficiente presión para provocar el desarrollo de este tipo de condiciones complejas, por lo que la historia familiar, y por ende la carga genética de susceptibilidad, tienen un papel central en su desarrollo.

Los estudios epidemiológicos, en conjunto con los estudios de asociación de genoma completo han resaltado la participación de la inflamación, los desórdenes de la coagulación, el estrés oxidativo y el metabolismo de lípidos como puntos críticos para el estudio de las ECV (Camacho-Mejorado *et al.*, 2020). El estudio de las variantes genéticas relacionadas con la susceptibilidad a desarrollar ECV en otras poblaciones, no necesariamente es consistente en poblaciones hispanas (Qi y Campos, 2011). Lo anterior podría estar relacionado con la complejidad genética de la población mestiza, una población de reciente aparición (10 a 15 generaciones) con una heterogeneidad genéticamente prominente, resultante de las poblaciones a partir de las cuales se originó: Nativos Americanos, Europeos y Africanos (Santana *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2011). Lo anterior tiene especial relevancia en los estudios de asociación genética en donde el conocimiento de la arquitectura genética mexicana debería de ser considerada para evitar falsas asociaciones.

II. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de condiciones complejas y heterogéneas causantes de más de un tercio de las muertes registradas en el mundo; cerca de 17 millones de personas mueren anualmente por esta causa. En México, el sistema de salud gastó más de 863 mil millones de dólares en el tratamiento de pacientes con ECV en el año 2010; se estima que estas cifras aumentarán en un 22% en las próximas dos décadas. Estadísticamente, el sexo masculino presenta una incidencia más alta de este tipo de condiciones en comparación al sexo femenino, razón por la cual el presente proyecto se centra en el estudio de individuos del sexo masculino.

La alta incidencia de las ECV en nuestro país, en conjunto con las políticas de prevención en salud justifican la búsqueda de biomarcadores tempranos de susceptibilidad que conlleven a la medicina personalizada como un reto para el diagnóstico de prevención. La contribución de los factores de riesgo clásicos para el desarrollo de las ECV tiene un trasfondo genético fundamental. Sin embargo, solo el 4% de los estudios de asociación genética se llevan a cabo en poblaciones Latinas, mientras que la mayoría de los hallazgos, con respecto a las asociaciones fenotipo-genotipo, provienen de poblaciones europeas y asiáticas. Los desórdenes en la síntesis de lípidos son una piedra angular para el desarrollo de las ECV. Sin embargo, la búsqueda de biomarcadores que predispongan para su desarrollo no necesariamente se puede extrapolar de los hallazgos obtenidos en poblaciones genéticamente distintas a la población mexicana. Los estudios centrados en la búsqueda de variantes genéticas de riesgo constituyen una piedra angular para tratar de comprender la patofisiología de las ECV, dando origen a proyectos como el que a continuación se describe.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Determinar la contribución genética de algunos polimorfismos localizados en los genes que codifican para las apolipoproteínas A4 (*APOA4*) y A5 (*APOA5*) y determinar su contribución al desarrollo de la aterotrombosis en un grupo de 100 individuos del sexo masculino con infarto agudo al miocardio y 200 controles sanos.

3.2 Objetivos particulares

- Analizar la contribución de las variantes alélicas, genotípicas y haplotípicas de los polimorfismos rs5104 (*APOA4*) y rs662799 (*APOA5*) en un grupo de individuos con infarto agudo al miocardio, así como en un grupo de individuos sanos pertenecientes a la población mestiza mexicana.
- Comparar la distribución de los alelos, genotipos y haplotipos entre los grupos de estudio, así como con las poblaciones parentales y con otras poblaciones Latinas (obtenidas de la base de datos del proyecto de los 1000 genomas <https://www.internationalgenome.org/>).

IV. ANTECEDENTES

Estudios previos llevados a cabo en México, y el resto del mundo han demostrado la contribución genética al desarrollo de la aterotrombosis (Camacho-Mejorado *et al.*, 2020; López-Salazar *et al.*, 2017; Meraz-Ríos *et al.*, 2014)(Pestana *et al.*, 2009; Isordia-Salas *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018). Y el uso de los polimorfismos génicos como herramientas poderosas para la búsqueda de marcadores de predisposición (Fiatal y Ádány, 2018). Sin embargo, al comparar los resultados en diversas poblaciones éstos no son siempre consistentes, lo que podría estar relacionado con la carencia de controles poblacionales e incluso étnicos (Gómez R, 2017). Por ejemplo, en poblaciones de Europa y Asia hay variantes genéticas que predisponen al desarrollo de síndrome metabólico, a los altos niveles de triglicéridos (TG) y a la enfermedad de arteria coronaria; éstas mismas variantes muestran inconsistencias en poblaciones Latinas (Halalkhor *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Szalai *et al.*, 2004; Saavedra *et al.*, 2010; Mattie *et al.*, 2009) (cuadro1).

En la genética de poblaciones existen diferentes factores confusores como la estratificación poblacional o las mezclas recientes entre poblaciones con diversos orígenes étnicos, estos factores pueden provocar falsas asociaciones gen-enfermedad, sobre todo en estudios de casos y controles (Gómez R, 2017). Sin embargo, los efectos de la estratificación poblacional pueden ser minimizados en estos estudios por la combinación de un buen diseño epidemiológico, utilizando participantes pareados por sexo y carga ancestral e incluyendo a un grupo control genómico para conocer las frecuencias de distribución propias de la población; evitando así asociaciones espurias (Dadd *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Estudios genéticos asociados con distintas enfermedades de índole cardiovascular en distintas poblaciones.

Autor(s)	Año	Descubrimiento
Szalai <i>et al.</i>	2004	Asociaron el SNP (rs662799) con la enfermedad de la arteria coronaria en pacientes húngaros, encontraron una mayor frecuencia del alelo C en pacientes con dicha enfermedad.
Mattie <i>et al.</i>	2009	Hallaron que dos SNP (rs3135506, rs662799) no presentaron asociación con el síndrome metabólico en la población de Puerto Rico, aunque sí para los niveles de colesterol en plasma y altos niveles de (TG), respectivamente.
Smart <i>et al.</i>	2010	Encontraron asociación de los genotipos de <i>APOE</i> con los niveles de colesterol total, no encontrando asociación con <i>APOA4</i> , <i>APOA5</i> y <i>APOC3</i> , en niños Griegos.
Saavedra <i>et al.</i>	2010	Hallaron que las frecuencias tanto alélicas como genotípicas de los SNP (rs662799, rs3135506) se comportaron de manera similar en sus grupos de estudio (casos y controles) por ende no se asociaron a la enfermedad de la arteria coronaria para la población chilena, pero sí para el desarrollo de la dislipidemia diabética.
Caterina <i>et al.</i>	2011	Asociaron significativamente el SNP (rs662799) con altos niveles de triglicéridos (TG) en la población Italiana, los portadores del alelo C son los que presentaron riesgo en comparación con los no portadores, esto asociándolo con el riesgo temprano de infarto agudo de miocardio.
Gaio <i>et al.</i>	2014	Hallaron una asociación significativa del SNP (rs4244285) con el síndrome metabólico para la población de Portugal, encontrando también que portadores del alelo A tiene una protección contra el síndrome metabólico.
Li <i>et al.</i>	2014	Encontraron cuatro SNP (rs662799, rs3135506, rs2075291, rs2266788) estrechamente relacionados con los niveles de triglicéridos (TG) en la población Uigur.
Sohrab <i>et al.</i>	2014	Asociaron significativamente el SNP (rs662799) con altos niveles de triglicéridos en una población del norte de Irán.
Di taranto <i>et al.</i>	2015	Hallaron que el SNP (rs3135506) está estrechamente relacionado con la hiperlipidemia familiar combina, permaneciendo independiente de otras variables, en la población Italiana.
Mantilla <i>et al.</i>	2017	Encontraron una asociación del SNP (rs3135506) con niveles altos de triglicéridos (TG) en individuos residentes de Bucaramanga, Colombia.

V. AREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en un grupo de individuos no relacionados genéticamente autoidentificados como pertenecientes a la etnia mestiza (la más prominente del país) de la población mexicana del Valle Central de México (Figura 1). De acuerdo con el Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), se define a un Mestizo como un individuo nacido en la república mexicana, con apellidos derivados del español y con antecedentes familiares de antepasados mexicanos en al menos tres generaciones (Serrano-Sánchez *et al.*, 1996). El grupo Mestizo es el resultado de 500 años de mezcla principalmente entre españoles, Nativos Americanos y esclavos africanos siendo un grupo de formación reciente (10 a 15 generaciones) (Johnson *et al.*, 2011).

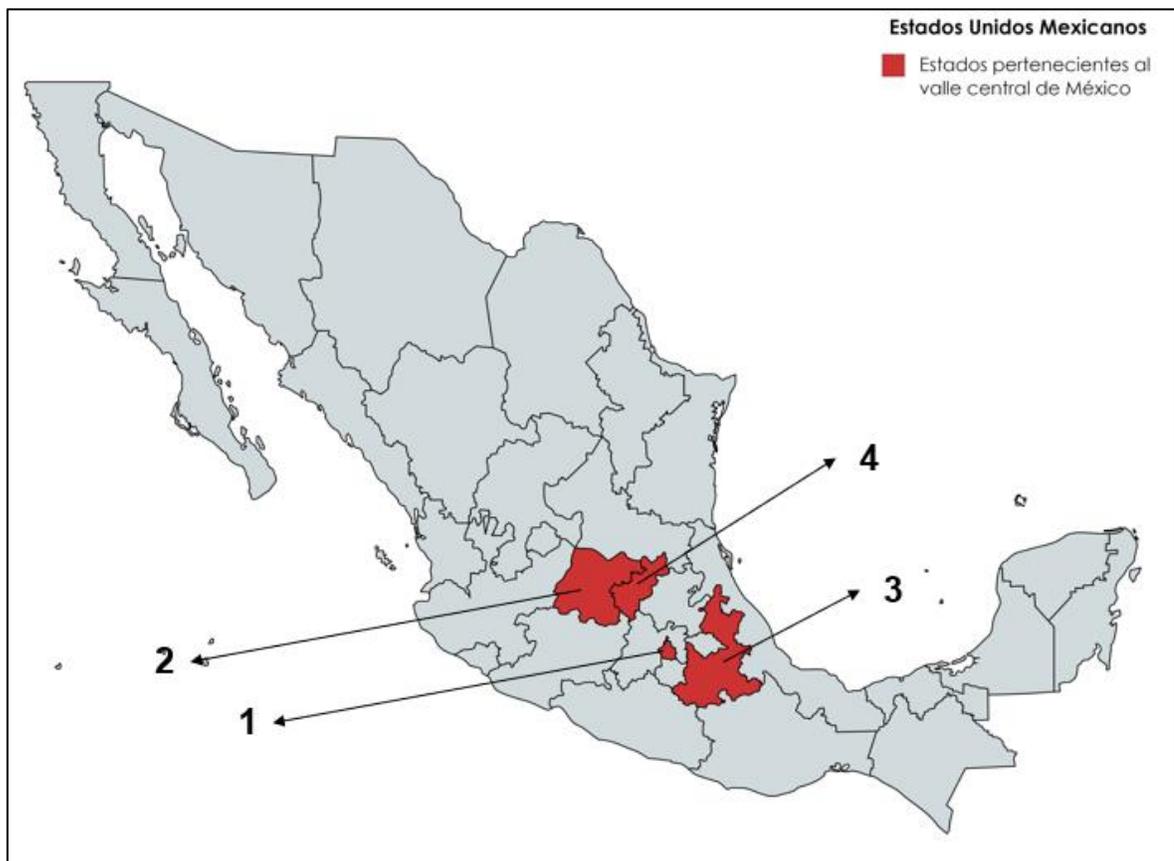


Figura 1. Mapa de la República Mexicana, resaltando en color rojo los estados del Valle Central de México incluidos en la presente tesis. 1. Ciudad de México; 2. Guanajuato; 3. Puebla; 4. Querétaro.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica Poblacional (Laboratorio 14) del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, ubicado en la Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, México (Figura 2).



Figura 2. Localización del Departamento de Toxicología del CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, alcaldía Gustavo A. Madero.

VI. MARCO TEORICO

6.1 Generalidades de las enfermedades cardiovasculares (ECV)

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ECV son un grupo de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos causantes primarios de muertes a nivel mundial y nacional, esto de acuerdo con los reportes de la secretaria de salud y protección de la salud (SSA, 2001). Entre las manifestaciones clínicas de este tipo de condiciones complejas, destacan la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular responsables colectivos de casi 13 millones de muertes en el 2010 a nivel mundial (Lozano *et al.*, 2010). En general, las ECV convergen en un detonante silencioso caracterizado por la retención de lípidos en la capa íntima de las arterias que conlleva a una inflamación crónica, lo que se conoce como **aterosclerosis**. (Summerhill *et al.*, 2019).

Para entender mejor el proceso de la formación de la placa aterosclerótica, empezaremos por conocer la anatomía arterial (Figura 3). Ésta se constituye de tres capas principales: 1) una capa íntima constituida por células endoteliales que están en contacto con el constante flujo sanguíneo, 2) una capa media comprendida por células de musculo liso y 3) una capa externa, formada por mastocitos y terminaciones nerviosas (Figura 3A; Lo y Plutzky, 2012). Existen diferentes factores que causan daños y desencadenan en la disfunción endotelial originando así la aterosclerosis. Entre ellos se encuentran a los radicales libres, la hipertensión, y la diabetes mellitus, entre otros (Ross, 1999). De manera general, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de las ECVs, ya que después de una lesión, las células endoteliales secretan en su superficie moléculas de adhesión para unirse a leucocitos, entre ellas la molécula de adhesión celular vascular VCAM-1 (por sus siglas en inglés *Vascular Cell Adhesión Molecule 1*) (Libby *et al.*, 2002). Una vez adheridos los leucocitos, éstos penetran la capa íntima, mediante quimiotrayentes de monocitos como la proteína 1 (MCP-1) la cual se cree que es la que se encarga de la trasmigración (Libby *et al.*, 2002). Subsecuentemente otras células están involucradas en el reclutamiento de la respuesta inflamatoria local (Conti y Shaik-DasthagirisaeB, 2015). Los macrófagos por su parte expresan receptores captadores de lipoproteínas modificadas, como el factor estimulante de colonias de

macrófagos ([M-CSF](#), por sus siglas en Inglés), lo que les permite ingerirlas y convertirse en células espumosas (Libby *et al.*, 2002). Este factor es una proteína multifuncional que regula la proliferación y la diferenciación de fagocitos, además de funcionar como quimiotáctico de monocitos (Qiao *et al.*, 1997).

Aunque la aterosclerosis se relaciona erróneamente con el envejecimiento y la dieta, estudios previos han demostrado que, desde el nacimiento, los seres humanos acumulamos grasas en las arterias (Hong, 2010). Un estudio reciente, realizado en momias egipcias de diferentes edades y periodos de tiempo, ha puesto en evidencia la presencia de aterosclerosis en 47 de 137 momias estudiadas (Thompson *et al.*, 2013). La edad media de las momias fallecidas por aterosclerosis fue de 43 años, los periodos de tiempo de la era Predinástico 3100 antes de cristo hasta el fin de la era Romana 364 (Thompson *et al.*, 2013). Lo anterior sugiere que la dieta no pareciera ser un factor determinante, soportando la carga genética de predisposición.

Otro ejemplo es la momia Ötzi hallado en los Alpes Italianos, el cual presentaba una serie de enfermedades, destacando la aterosclerosis, a pesar de llevar una vida de cazador-recolector; los análisis arrojan que existe una alta posibilidad de dieta alta en grasa, complementada con carne silvestre, cereales y trazas de helechos tóxicos (Keller *et al.*, 2012). Estos estudios soportan que, a pesar de tener dietas completamente distintas, la presencia de la aterosclerosis fue consistente en las diferentes civilizaciones, acompañándonos a lo largo del tiempo.

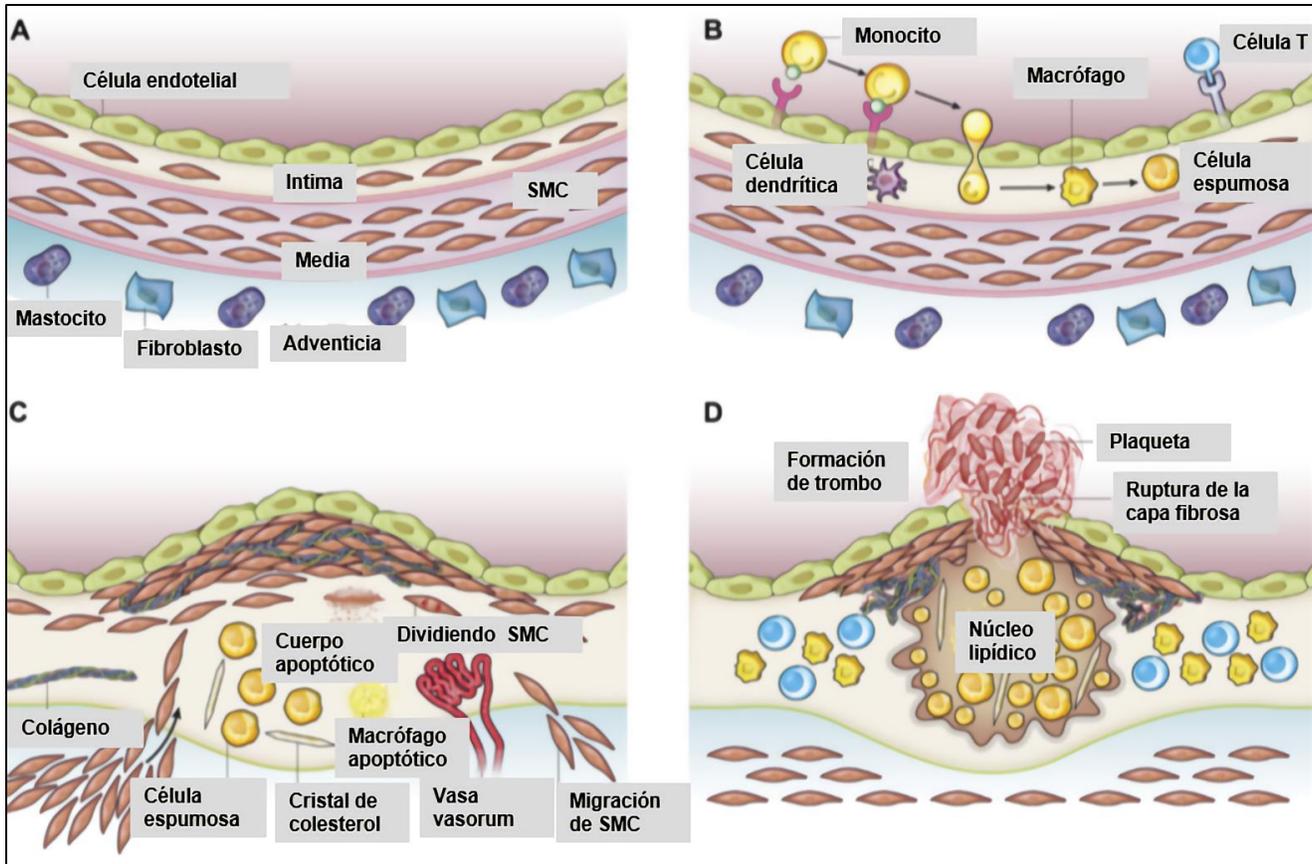


Figura 3. Etapas en el desarrollo de la placa aterosclerótica y sus complicaciones. **A)** Representación de una arteria normal, mostrando las capas íntima, media y adventicia. **B)** El proceso aterosclerótico inicia con la adhesión de leucocitos a la capa de células endoteliales, para su posterior migración a la capa íntima. **C)** la lesión progresa con la migración de células del músculo liso de la capa media a la capa íntima, lo cual deriva, en exceso de macromoléculas como colágeno, elastina y proteoglicanos. Los macrófagos y las células endoteliales pueden sufrir apoptosis, por lo cual los lípidos extracelulares de las células muertas se pueden acumular en la región central de la placa (núcleo necrótico). **D)** la trombosis es la última complicación de la aterosclerosis. Ésta inicia con la lesión de la placa aterosclerótica, permitiendo que los factores de coagulación entren en contacto, al interior de la placa, junto a los factores tisulares, formando así un trombo que se va extendiendo hacia la luz del vaso, limitando el flujo sanguíneo (modificado de Lo y Plutzky, 2012).

Si bien, no todos los individuos acumulan lípidos en las arterias (placa aterosclerótica, PA) con la misma velocidad, los hallazgos de los diversos grupos de investigación han evidenciado el impacto de la carga genética de predisposición (Indolfi, 2002). Los métodos utilizados para examinar los factores genéticos involucrados en enfermedades crónicas y complejas como la aterosclerosis y las

ECV están evolucionando rápidamente. Los estudios de asociación pueden proporcionar la información sobre qué genes están involucrados en el desarrollo de una determinada enfermedad. El diseño más simple es el de casos y controles, donde se recopilan una serie de individuos afectados por la enfermedad de interés (casos) y otra serie de no afectados (controles) (Lewis y Knight, 2012). Por otra parte, la selección de genes candidatos se basa en elegir genes que previamente se han relacionado con la enfermedad de interés o que participan en vías metabólicas relacionadas (Patnala *et al.*, 2013). Así, estos grupos deben estar bien definidos, para comparar las frecuencias alélicas de los polimorfismos en genes candidatos y evitar en la medida de lo posible el sesgo (Lewis, 2002).

Los polimorfismos son variaciones en la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) presentes en al menos el uno por ciento de la población. Entre los polimorfismos más comunes se encuentran los de un solo nucleótido (SNP; por sus siglas en Inglés *Single Nucleotide Polymorphism*). Estos polimorfismos se refieren a la sustitución de un nucleótido por otro en la secuencia de ADN. Dependiendo del sitio de localización, algunos SNPs pueden tener una consecuencia funcional, afectando la regulación génica o su producto proteico (Patnala *et al.*, 2013).

6.2 Fisiopatología

En muchos sentidos la aterosclerosis es considerada una enfermedad derivada de una lesión vascular que desencadena una serie de respuestas celulares mencionadas anteriormente (Libby *et al.*, 2002). Estos eventos son determinantes para el desarrollo de la placa por lo que consecuentemente se derivará en complicaciones clínicas tales como los síndromes coronarios y el accidente cerebrovascular, son causados por la acción plaquetaria y los factores de coagulación, resaltando el papel de la trombosis en este tipo de complicaciones, las que son secundarias a la ruptura de la placa y no solo una pérdida gradual de la luz arterial (Simon y Silverstein, 2015). El resultado final de la lesión es una placa fibrosa subendotelial compuesta por un núcleo lipídico rodeado de células musculares lisas y fibras de tejido conectivo (Aziz e Yadav, 2016; Simon y Silverstein, 2015). El estrechamiento de la PA se origina por el desarrollo y crecimiento de la acumulación

de macrófagos hacia la íntima, haciendo que la lesión evolucione hacia una capa fibrosa mediante la acumulación de macromoléculas extracelulares y de células de músculo liso (Jebari-Benslaiman *et al.*, 2022). Un crecimiento abrupto de la placa puede producir inestabilidad y consecuentemente sufrir una ruptura cuyas secuelas clínicas son el estrechamiento de los vasos sanguíneos (Gutstein y Fuster, 1999). Por lo que respecta a sus síntomas, éstos pueden ser la angina de pecho, la angina inestable, el síndrome coronario agudo, la isquemia de miembros inferiores y los aneurismas abdominales (Ruiz y Rados, 2002; Van der Wal y Becker, 1999).

La **aterotrombosis** definida como la ruptura de la placa aterosclerótica con trombosis arterial oclusiva sobre la placa, es la principal consecuencia de la aterosclerosis (Figura 4) (Viles-Gonzales *et al.*, 2004). Entre el 55 y el 65% de los trombos coronarios son debidos a la ruptura de la placa aterosclerótica. Dicha ruptura va acompañada de un trombo sobrepuesto a una matriz rica de proteoglicanos y células del músculo liso (30-35%) además de nódulos calcificados (2-7%) (Badimon y Vilahur, 2014). La inestabilidad de la placa puede ser debida a la secreción de metaloproteínas de los macrófagos, los que debilitan la capa fibrosa y así la fractura expone material trombogénico, acumulando plaquetas hasta formar un coágulo rico en fibrina y eritrocitos (Gutstein y Fuster, 1999).

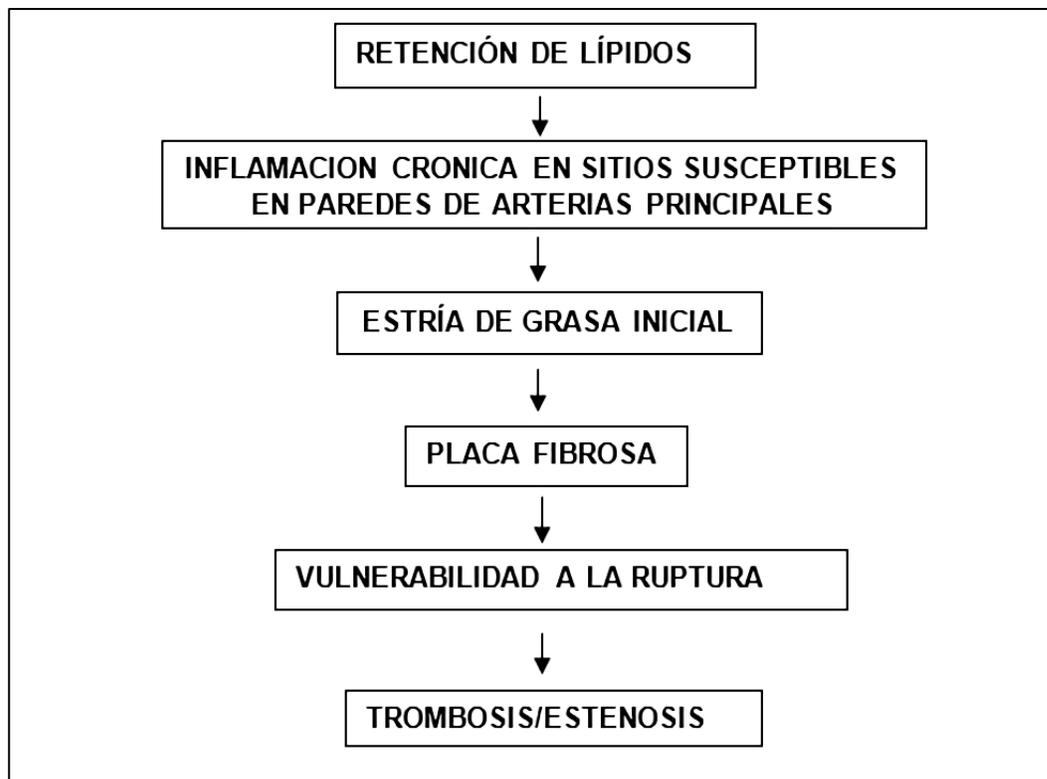


Figura 4. Pasos para el desarrollo de la aterosclerosis, iniciando con la retención de lípidos y culminando con la estenosis. (Modificado de Aziz e Yadav, 2016).

6.3 Factores de riesgo en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares

Las ECV presentan una gran relevancia por el número de muertes que provocan en el mundo, ocupando los primeros dos lugares en el *Top ten* de las enfermedades más mortíferas, incluso por encima del cáncer y la Diabetes Tipo 2. Sin embargo, dado su origen multifactorial están sujetas a diversos factores de riesgo que contribuyen a su desarrollo, dentro de los cuales se encuentran los **no modificables** y los **modificables** (Díez *et al.*, 2005).

6.3.1 No modificables

- **Edad.** Es un factor de riesgo sumamente conocido para la condición cardiovascular, siendo considerado un factor de riesgo independiente de los demás. Particularmente, la edad avanzada se asocia con un mayor riesgo de ECV, por lo que la esperanza de vida de una persona

dependerá de la modificación de los factores de riesgo tradicionales (la hipertensión arterial, la DT2, el hábito de fumar y la obesidad). Estos factores de riesgo, conjuntamente, ejercen una contribución para el desarrollo de ECV hasta de un 94 % entre individuos con antecedentes familiares de ECV (Dhingra y Vasan, 2012; Morillas *et al.*, 2002).

- **Género.** Para explicar las diferencias de morbilidad y mortalidad, el término género es el más viable, en comparación con el de “sexo”, pues el género es una construcción multidimensional que incluye diferencias biológicas/genéticas, psicológicas y sociales entre hombres y mujeres (Möller-Leimkühler, 2007). A pesar de que las ECV son la principal causa de muerte en el mundo, existen diferencias en la prevalencia entre hombres y mujeres; siendo de dos a cinco veces más frecuente en los hombres en el rango de edad de 40-50 años. En las mujeres, las frecuencias se modifican una vez que éstas se encuentren en menopausia, lo que se relaciona con la deficiencia de estrógenos (Maas y Appelman, 2010; Mosca *et al.*, 2011; Möller-Leimkühler, 2007; Andersson y Vasan, 2018).
- **Historia familiar.** La evaluación de los antecedentes familiares se puede utilizar para la promoción de la salud en toda la población y los esfuerzos de reducción de riesgos con el enfoque específico para ayudar a reducir la carga de ECV (Klemenc-Ketis y Pertelin, 2013). En los últimos años, los antecedentes familiares no solo se han utilizado como método de evaluación social, sino también como un predictor de riesgo, reflejando los efectos combinados de la susceptibilidad genética, la exposición ambiental compartida y los comportamientos comunes en los familiares (Klemenc-Ketis y Pertelin, 2013). Así, los individuos cuyos progenitores han presentado ECVs tienen un riesgo entre 60 a 70%, mientras que pacientes cuyos hermanos hayan padecido una ECV tienen un aumento en el riesgo de aproximadamente 40% (Kolber y Scrimshaw, 2014).

6.3.2 Modificables

- **Hipertensión arterial.** Considerado como el factor de riesgo modificable con más impacto para las ECV; un aumento en la presión sistólica y diastólica de 20 y 10 milímetros de mercurio, respectivamente, incrementa el riesgo vascular de dos a cinco veces más, esto independiente de otros factores de riesgo (Lira, 2015).
- **Diabetes tipo 2.** Esta condición compleja ha sido relacionada con un mayor riesgo de ECV; en general las ECV afectan alrededor del 32% de personas con DM2 (Einarson *et al.*, 2018). Lo anterior ha sido relacionado con la vulnerabilidad endotelial para la formación de PA en los individuos con DT2 en comparación con individuos sanos (Tousoulis *et al.*, 2011).
- **Dislipidemia.** Definida como altas concentraciones de lípidos en sangre, es considerada un factor de riesgo crítico para el desarrollo de las ECV. Existe una relación gradual entre la concentración total de colesterol en plasma (> 200mg/dL) y la morbilidad y mortalidad por cardiopatía isquémica; principal causa de muerte en países de altos ingresos (Fodor, 2010). Esta condición está estrechamente relacionada con el estilo de vida, pero los estudios han demostrado el papel de la genética y su relación con la aterosclerosis (Miller *et al.*, 2009; Nepal *et al.*, 2018; Stein *et al.*, 2019). En este sentido, los estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos han demostrado que la contribución genética tiene un mayor efecto que la exposición ambiental (Zhang *et al.*, 2010).

6.4 Apolipoproteínas y el metabolismo de lípidos.

Los lípidos son una fuente importante de energía, a su vez son un componente importante de la membrana celular y son sumamente fáciles de almacenarse en el cuerpo (Fahy *et al.*, 2011). Existen proteínas que interactúan con los lípidos, llamadas apolipoproteínas, las que forman complejos solubles de lípidos y proteínas llamados lipoproteínas (Cham, 1978). Las lipoproteínas son partículas de proteínas conjugadas con lípidos, que transportan sustancias hidrófobas en el entorno

hidrofílico en plasma (Rogers, 2019). Las lipoproteínas contribuyen al metabolismo del combustible corporal al permitir la distribución de triglicéridos (TG) entre los tejidos (Feingold *et al.*, 2018). También sirven como un depósito extracelular y un vehículo para el transporte del colesterol (Dominiczak y Caslake, 2011). Existen diferentes apolipoproteínas asociadas con las ECV, esto debido a su condición metabólica. Las lipoproteínas pueden ser clasificadas de acuerdo con su densidad hidratada en quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Dominiczak y Caslake, 2011). Las lipoproteínas difieren en tamaño, composición lipídica y contenido de apolipoproteína; sus características varían de acuerdo con la acción enzimática. La lipoproteína lipasa (LPL) y el triglicérido lipasa hepática (HTGL), son reguladas por las apolipoproteínas, por lo que su contenido afectará el ensamblaje y el metabolismo de la lipoproteína, controlando su captación celular mediante receptores de membrana como por ejemplo los receptores *Scavenger* clase B tipo 1 y tipo 2) (Dominiczak y Caslake, 2011; Dieckmann *et al.*, 2010).

- Apolipoproteína A1 (**APOA1**). Su principal función radica en activar a la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa que esterifica al colesterol libre en HDL y lo transfiere a la membrana celular (Martin *et al.*, 2015); Variaciones en la estructura de esta proteína han sido relacionadas con las ECV.
- Apolipoproteína A4 (**APOA4**). Es una apolipoproteína plasmática, que participa en la regulación de las vías metabólicas de lípidos y glucosa (Wai-man *et al.*, 2004). Se sintetiza predominantemente por los enterocitos dentro del intestino delgado. *APOA4*, presenta variación de formas por lo que han sido identificadas variaciones genéticas en distintas poblaciones (Wai-man *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2016) (Tabla 2). Los niveles de *APOA4* y la variante genética de esta misma (T347S; ACT>TCT) están relacionados con el riesgo de enfermedad coronaria; una relación inversa en comparación con lo que ha reportado en ratones (Wai-man *et al.*, 2004).
- Apolipoproteína A5 (**APOA5**). Se identificó por primera vez en el hígado, en donde tiene la función de sintetizar y unir lípidos necesarios para la síntesis

de lipoproteínas en los hepatocitos (Pennacchio *et al.*, 2001). Tiene un papel central la modulación de TG, por un lado, inhibe la producción hepática de LDL y mejora la hidrólisis de TG a través de la interacción con la enzima triacilglicerol hidrolasa que interactúa con proteoglicanos, induciendo a que las lipoproteínas ricas en TG se unan a la superficie de las células endoteliales. Por otro lado, la *APOA5* circundante, se une a receptores de LDL y proteoglicanos como heparán sulfato en la superficie de los hepatocitos, eliminando así a las lipoproteínas circundantes (Au *et al.*, 2017; Guardiola y Ribalta, 2017). Estudios en ratones sugieren que la sobreexpresión de *APOA5* da como resultado una disminución dramática en los niveles de TG, siendo el gen con el efecto más significativo en el metabolismo de TG (Fruchart-Najib *et al.*, 2004). Se han reportado diferencias poblacionales en la función metabólica en esta proteína y en el gen que la codifica (Guardiola y Ribalta, 2017).

- Apolipoproteína B (***APOB***). Es un importante transportador de TG en plasma; al quedar atrapado en la pared arterial puede provocar el proceso aterogénico (Walldius, 2012).

Apolipoproteína C1 (***APOC1***). Es un constituyente proteico de los quilomicrones y reguladores de triglicéridos. La *APOC1* se expresa principalmente en el hígado y se asocia con las HDL y en ayunas con las LDL. En pacientes con hipertrigliceridemia, los niveles en plasma de *APOC1* aumentan por lo que se sugiere que podría ser un factor de riesgo para la aterosclerosis y la enfermedad arterial coronaria (Hansen *et al.*, 2011).

- Apolipoproteína D (***APOD***). Se encarga de transportar el ácido araquidónico, la progesterona y la pregnenolona. De manera general estas moléculas convergen en una disminución al desarrollo de las ECV, principalmente en mujeres (Labrie *et al.*, 2015).
- Apolipoproteína E (***APOE***). Se ha relacionado con la prevención de aterosclerosis, manteniendo una homeostasis en el colesterol y el aclaramiento de lipoproteínas, ya que se encarga de eliminar a lipoproteínas que contienen ***APOB*** como las LDL (Linton *et al.*, 2019; Liehn *et al.*, 2018).

- Apolipoproteína M (**APOM**). Es producida mayoritariamente por los hepatocitos y es considerada ateroprotectora por su capacidad de exportar colesterol. Se asocia con un esfingolípido (S1P), que tiene un papel en la inflamación. (Tavernier *et al.*, 2020). La disminución en los niveles de **APOM**, se han asociado con el riesgo de tromboembolismo venoso, aunque aún se desconoce el mecanismo molecular (Ahmad *et al.*, 2018). Consecuentemente, variaciones genéticas en esta apolipoproteína se han relacionado con el riesgo de enfermedad coronaria (Sun *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2013). Por ser de interés del presente trabajo, en el cuadro 2 se muestra un panorama más amplio de la influencia de las variaciones genéticas en los genes de **APOA4** y **APOA5** y su relación con las ECVs.

Cuadro 2. Panorama de las variaciones genéticas en los genes (*APOA4* y *APOA5*) y su estrecha relación con ECVs.

Autor(s)	Año	Población	Variante(s) estudiada(s)	Descubrimiento
Ou <i>et al.</i>	2015	China	rs5104	Hallaron asociación significativa de la variante con la dislipidemia.
Fu <i>et al.</i>	2015	China	rs7396835	Encontraron relación de la variante y los niveles de TG.
Kumar <i>et al.</i>	2018	India	Thr347Ser	No hallaron relación con los niveles de TG, sin embargo, al ajustar por edad y sexo el genotipo AA presentó relación con los niveles bajos de LDL.
Bertocchini <i>et al.</i>	2017	Cagliari, Italia	rs77811484	Hallaron que la variación G>T se asocia con reducción en los niveles de TG en infantes.
Kim <i>et al.</i>	2018	Corea del sur	rs662799	Encontraron que el genotipo CC se asocia con riesgo de aterosclerosis.
You <i>et al.</i>	2018	Noreste de China	rs662799, rs651825	Descubrieron que las variantes se correlacionan con altos niveles de TG.
Bogari <i>et al.</i>	2019	Arabia Saudita	rs2075291	Hallaron que el Alelo T de la variante reduce los niveles de TG, en pacientes con la enfermedad de arteria coronaria.
Fiaz <i>et al.</i>	2019	Pakistán	rs662799	Encontraron que el Alelo C de la variante se asocia al desarrollo de síndrome metabólico.
Valente-Frossard <i>et al.</i>	2020	Brasil	rs662799	Encontraron que la variante no se asoció con los niveles de TG en infantes.

Como se mencionó anteriormente las variantes de estos genes (*APOA4* y *APOA5*) se han relacionado estrechamente con los niveles de TG (Mattie *et al.*,2009; De Caterina *et al.*,2011); *APOA5* con niveles altos en ayunas y *APOA4* con niveles bajos de HDL (Qi *et al.*,2007). El presente trabajo se centrará en el estudio de algunos polimorfismos en los genes ***APOA4*** y ***APOA5*** y su posible contribución al desarrollo de aterotrombosis.

VII MÉTODO

7.1 Universo de trabajo

Se analizaron los datos genéticos de 700 individuos (no relacionados entre sí) residentes del Valle Central de México y pertenecientes a la etnia mestiza mexicana, con apellidos derivados del español y con antecedentes familiares mexicanos en al menos tres generaciones. Los individuos fueron estratificados en tres grupos: 1) con manifestaciones clínicas de aterotrombosis (100 individuos con IAM), 2) controles sanos (200 individuos sin manifestaciones clínicas de aterotrombosis) y 3) control genómico (400 individuos pertenecientes a la etnia mestiza mexicana). El grupo del control genómico fue proporcionado, por el laboratorio 14 de genómica poblacional del Cinvestav, y corresponde a una parte de la tesis de maestría de la M. en C. Nadia Quiroz Jiménez (Quiroz-Jiménez, 2018).

El material genético empleado en el presente trabajo fue obtenido durante los años 2014-2015. Los individuos fueron obtenidos de la Unidad de Investigación Médica en trombosis, hemostasia y aterogénesis del Instituto Mexicano del Seguro Social, que acudieron a la unidad para un estudio de trombofilia.

7.2 Criterios de inclusión.

El grupo con manifestaciones clínicas de aterotrombosis se conformó por individuos que hubieran sufrido IAM antes de los 45 años. También se consideró que los individuos no estuvieran bajo tratamiento con medicamentos hipoglicemiantes, anticoagulantes o estatinas. Para el grupo sin manifestaciones clínicas de aterotrombosis se consideraron la historia clínica y los antecedentes heredo-familiares. En ambos grupos se contó con toda la información relacionada a los factores de riesgo clásicos como DT2, hipercolesterolemia, hipertensión arterial sistémica, índice de masa muscular, uso de hormonas y antecedentes heredofamiliares de ECVs (esta información se obtuvo del historial clínico de los individuos).

Mediante la aplicación de un cuestionario validado se obtuvieron los datos acerca del consumo de cigarro, consumo de alcohol, la dieta, el consumo de drogas estimulantes o depresivas, la edad, el género y el lugar de procedencia. En el caso de las mujeres se consideró el consumo de hormonas. También se preguntó sobre los antecedentes personales de enfermedades crónicas, así como los antecedentes familiares de aterotrombosis.

7.3 Criterios de eliminación.

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

7.4 Descripción operacional de variables.

7.4.1 Polimorfismo. Variantes alélicas cuya frecuencia en uno de sus alelos se presenta en al menos el 1% de la población. Entre los más abundantes en el genoma humano se encuentran los **SNP** (por sus siglas en Inglés *single nucleotide polymorphism*, **Figura 5**) identificados por la sustitución de una base nitrogenada por otra (*ejemplo*, A>C). Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNPs se les conoce como “no sinónimos”, puesto que afectan directamente la función de la proteína (Chen *et al.*, 2010). Otro tipo de SNPs son los llamados “sinónimos” (o silenciosos) lo cuales no alteran la formación del gen. Sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo desconocido (Caratachea, 2007). Algunos SNPs se encuentran localizados en regiones UTRs (por sus siglas en inglés, *untranslated regions*) y se han caracterizado a nivel funcional; la región UTR es de importancia ya que ahí se localizan diversas secuencias que regulan la traducción (Ramírez-Bello y Jiménez-Morales, 2017).

7.4.2 Aterotrombosis. Es una enfermedad inflamatoria crónica sistémica con manifestaciones clínicas o subclínicas locales. La patogénesis de esta condición

envuelve un largo números de rutas biológicas como los metabolismos de lípidos, hormonal, la inflamación y las cascadas de coagulación (Montagnana *et al.*,2014). Esta condición se caracteriza por la presencia de una placa, primordialmente de lípidos, en los vasos sanguíneos. Cuando esta placa se desprende o sufre una ruptura, desencadena una respuesta inflamatoria, que forma un trombo sobre la placa, limitando el flujo de sangre sobre está misma y desencadenando manifestaciones clínicas como el IAM y el ACV (Leys, 2001; Viles-Gonzales *et al.*, 2004). Estas manifestaciones tienen diferentes tipos de origen y dependiendo de ello será el lugar de la manifestación clínica (Figura 6) (Aguiar-Souto, *et al.*, 2009; Montagnana *et al.*, 2014; Viles-gonzalez *et al.*, 2004).

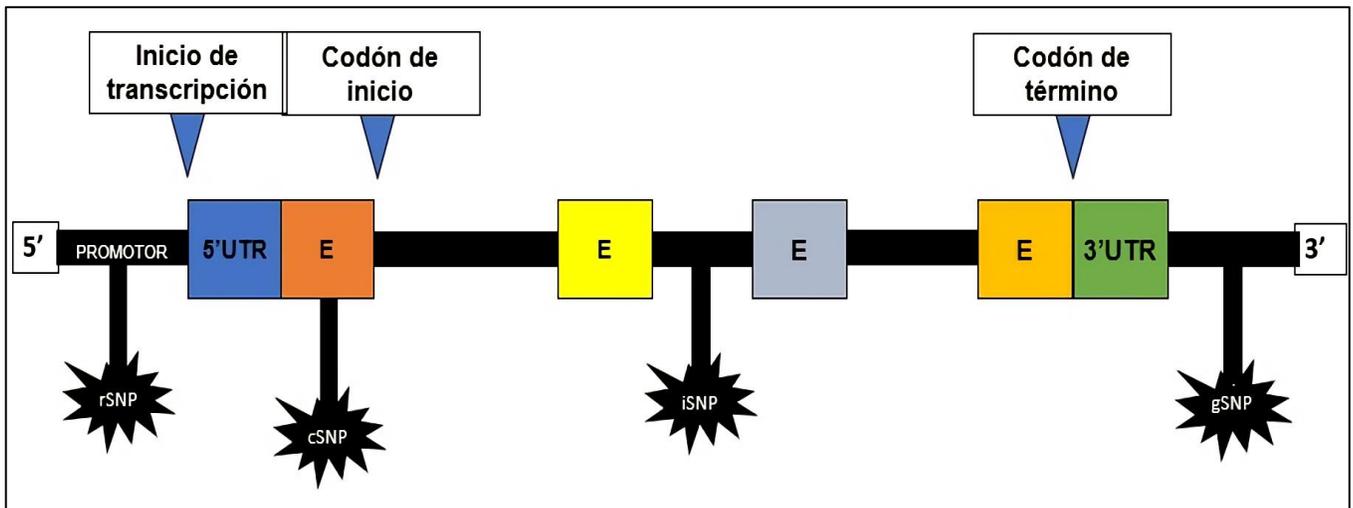


Figura 5. Implicaciones funcionales de los SNPs dentro de un gen, las que dependen de la región en donde se localizen: cSNP sobre regiones codificantes, gSNP: en regiones intergenómicas, iSNP: en regiones intrónicas y rSNP: sobre regiones reguladoras.

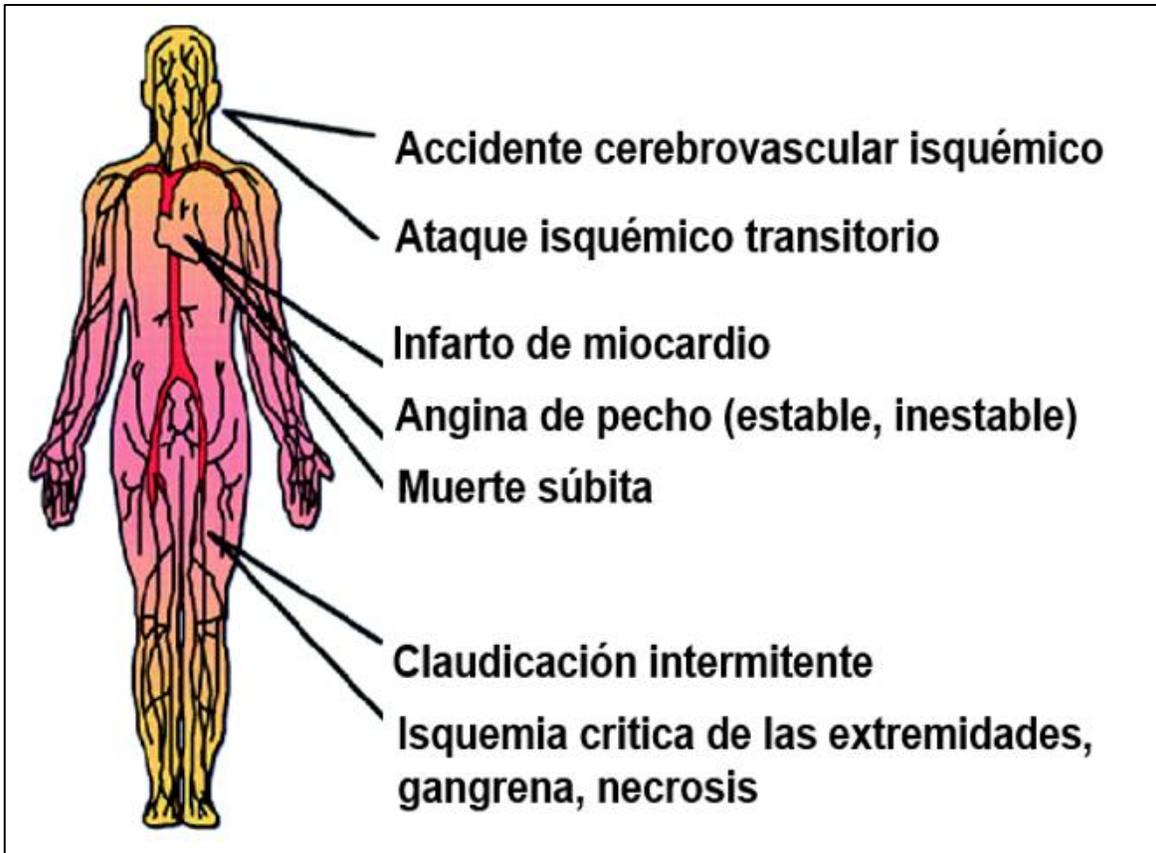


Figura 6. Manifestaciones clínicas de la aterotrombosis. En la parte anterior se muestra el accidente cerebrovascular junto con el ataque isquémico, en la parte media/anterior se presenta el infarto de miocardio y la angina de pecho, en las extremidades gangrena y necrosis (modificado de Viles-González, *et al.*, 2004).

7.4.3 Infarto agudo al miocardio (IAM). Se define como una afección miocárdica ocasionada por una desproporción entre el aporte del flujo sanguíneo, generada por cambios en la circulación coronaria, produciendo una necrosis miocárdica y afectando generalmente el ventrículo izquierdo, aunque la lesión puede extenderse al ventrículo derecho o a las aurículas (Thygesen *et al.*, 2019; Figura 7).

7.4.3.1 Clasificación del IAM. El IAM puede ser clasificado clínicamente (Figura 7), en pacientes con dolor en el pecho u otros síntomas isquémicos (Thygesen *et al.*, 2019):

- **IAM tipo 1.** Es relacionado por la ruptura, fisura o erosión de la PA, con la formación de trombos sobre una o más arterias coronarias, disminuyendo el flujo sanguíneo.
- **IAM tipo 2.** Se da cuando hay lesión de miocardio con necrosis, donde existe una descompensación en el suministro y demanda de oxígeno.
- **IAM tipo 3.** Es en donde los pacientes con manifestaciones clínicas y cambios electrocardiográficos fallecen antes de que se pueda realizar una troponina cardiaca o haya dado tiempo de que esta se eleve.
- **IAM tipo 4.** Se da cuando hay una elevación de troponina cardiaca > 5 veces más del percentil del límite superior de referencia; aquí se destaca la elevada incidencia de daño miocárdico y se enfatiza una intervención coronaria percutánea.
- **IAM tipo 5.** Se asocia con cirugía de revascularización miocárdica, con elevación de los valores de troponina cardiaca >10 veces el percentil 99 del límite superior de referencia en las primeras 48 horas poscirugía.

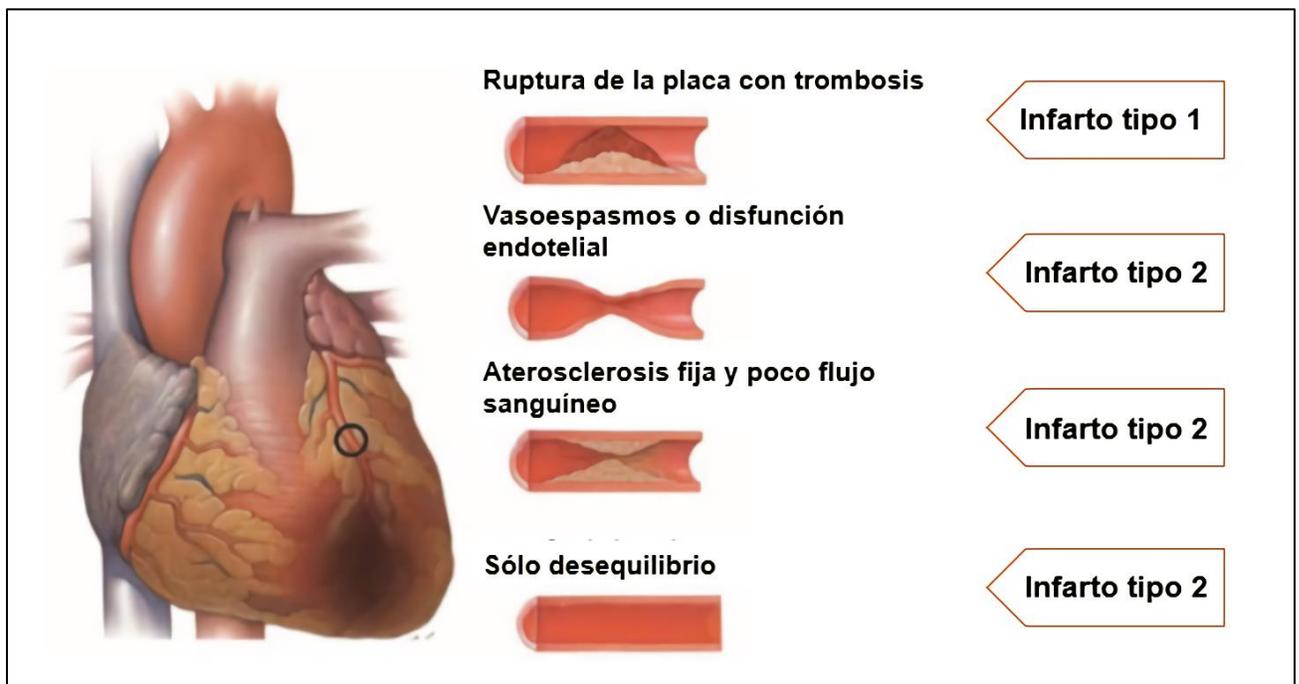


Figura 7. Diferencia entre infarto agudo de miocardio tipo 1 y tipo 2 según la condición de las arterias coronarias (Modificado de Thygesen *et al.*,2019).

7.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El material genómico se obtuvo a partir de sangre periférica con la ayuda de un *kit* comercial de aislamiento (Jena Bioscience, Alemania), siguiendo los pasos del fabricante. Este *kit* permite la obtención del ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de diferentes tipos de muestras; en este caso, se utilizaron muestras sanguíneas. Esta técnica se fundamenta en la lisis total de las células y sus estructuras subcelulares, dejando al ADN puro y listo para su separación por precipitación. La inactivación de nucleasas intracelulares previene la digestión enzimática de los ácidos nucleicos, lo que permite lograr la obtención de fragmentos relativamente largos de ADN y ácido ribonucleico. La lisis celular y la inactivación de nucleasas intracelulares en general se llevan a cabo en el mismo paso, ya que la solución de lisis está compuesta por sales caotrópicas (Sandoval *et al.*, 2013). Finalmente, el material genético se hidrata con agua libre de enzimas nucleicas y se almacena a -20°C (Anchordoquy y Molina, 2007).

7.5.1 Cuantificación. Existen diversos métodos de cuantificación de ácidos nucleicos; los más usados son la espectrofotometría y la fluorometría. El fundamento de la espectrofotometría es que cualquier solución que contenga moléculas suspendidas permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contiene. El ADN presenta una absorción máxima a una longitud de onda de 260 nm (Sandoval *et al.*, 2013). La densidad óptica (OD) es la unidad de absorbancia y tiene valores particulares para cada molécula. En el caso de los ácidos nucleicos, una OD a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN. De acuerdo con estos valores, se estableció la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L de ADN} = \text{OD a 260 nm} \times \text{Dilución} \times (50 \mu\text{g}/\mu\text{L})$$

Donde: OD a 260 nm corresponde a la absorbancia del ADN a 260 nm de longitud de onda; se asume que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/µL de ADN de doble cadena (constante).

7.5.2 Pureza. Dado que las proteínas (en particular los aminoácidos aromáticos) absorben luz a una longitud de onda de 280 nm, el índice de absorción 260/280nm se utiliza para valorar la pureza de los ácidos nucleicos con respecto a la contaminación con proteínas. Cuando éste se encuentra entre 1.8 y 2.0, se considera óptimo; valores cercanos a 1.8 indican que la muestra contiene casi exclusivamente ADN (Sandoval *et al.*, 2013).

7.5.3 Sondas. Las sondas son segmentos de ADN de cadenas sencilla marcadas con moléculas reporteras, como enzimas o radioisótopos, que permiten su fácil detección. Para este trabajo se llevó a cabo la detección de las variantes alélicas en los genes *APOA4* y *APOA5* mediante el empleo de las sondas TaqMan® (rs662799 y rs5104). Dichas sondas se encuentran relacionadas con el metabolismo de lípidos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ubicación de los genes y polimorfismos empleados para la discriminación alélica

SNP	Gen	Cromosoma	Sustitución	Marcador
rs5104	<i>APOA4</i>	11	C>T	C: Vic y T: Fam
rs662799	<i>APOA5</i>	11	A>G	A: Vic y G: Fam

Nota: VIC: victoria (fluoróforo color verde proveniente de *Aequorea victoria*), FAM: amidita de fluoresceína (fluoróforo color azul).

El diseño de la sonda, es decir, su secuencia nucleotídica, es lo que le permitirá, entre miles de fragmentos que forman parte del genoma de un ser humano, identificar a “un solo gen” o “al fragmento de un gen” (Didenko, 2001). Gran parte del éxito de este tipo de estrategias moleculares depende de la especificidad de la sonda (Sandoval *et al.*, 2013). Estos métodos son muy seguros, ya que mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia; es por eso por lo que la especificidad es muy alta (Figura 8; Tamay *et al.*, 2013).

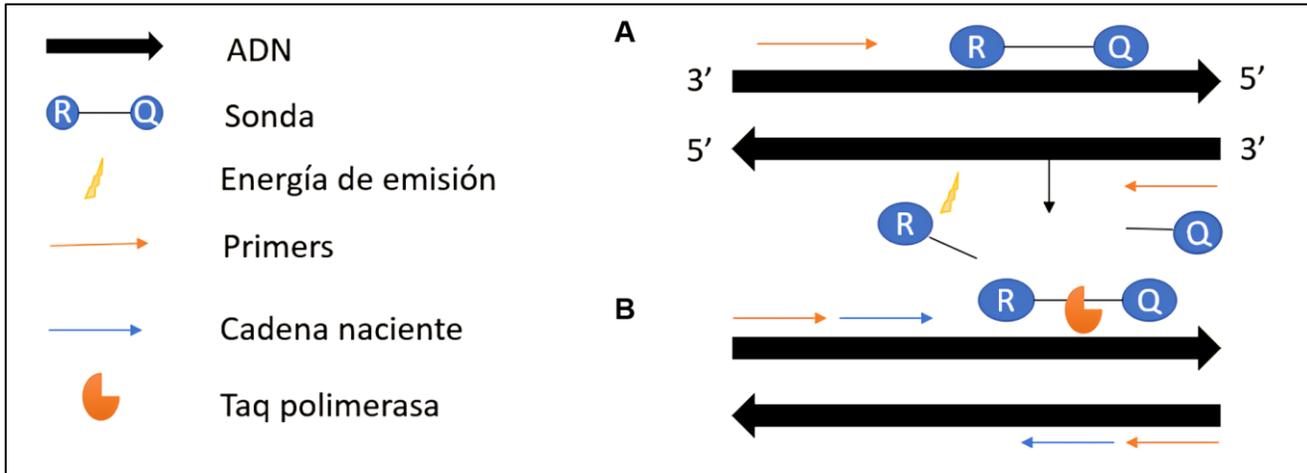


Figura 8. Representación esquemática del fundamento de la técnica de PCR en tiempo real mediante la utilización de sondas TaqMan®. (A) La sonda porta dos moléculas reporteras cercanas (R: fluoróforo y Q: *quencher* o apagador), las que permanecerán “pegadas” mientras no se hibride con la secuencia blanco. (B) Al hibridarse, permite que la Taq polimerasa rompa la unión de las moléculas reporteras, logrando la liberación de fluorescencia, permitiendo así la discriminación alélica.

7.5.4 Discriminación alélica. El análisis de los polimorfismos se realizó con la ayuda de sondas validadas y se amplificaron con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

7.5.5 PCR en tiempo real. La PCR se considera una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares. Se basa en una replicación exponencial *in vitro* de una molécula de ADN genómico, mediante ciclos repetitivos, que constan de tres temperaturas (cuadro 4).

Cuadro 4. Condiciones para la amplificación de los polimorfismos de los genes *APOA4* y *APOA5*.

Genes	Temperatura inicial	Extensión	Extensión final	Ciclos
<i>APOA4</i> y <i>APOA5</i>	95°C por 10 minutos	95°C por 15 segundos	60°C por 15 minutos	50 ciclos

La primera temperatura se conoce como desnaturalización y tiene como objetivo separar la doble cadena de ADN o destruir las estructuras secundarias del mismo. La segunda temperatura es de alineación, cuyo objetivo es generar la energía suficiente para que los iniciadores busquen su secuencia en la cadena de ADN; la tercera es extensión la cual proporciona la temperatura óptima para el funcionamiento de la polimerasa (Sandoval *et al.*, 2013). La longitud del producto amplificado la delimitan los iniciadores, también llamados *primers* u oligonucleótidos. Para que se lleve a cabo la PCR, se requiere de una cadena molde de ADN, una enzima (ADN polimerasa), cofactores necesarios para la actividad correcta de la ADN polimerasa (magnesio), desoxinucleótidos (dNTP) para la síntesis del producto de PCR y oligonucleótidos específicos (Sandoval *et al.*, 2013). Para la PCR en tiempo real, la detección del producto de PCR se realiza al mismo tiempo que sucede la amplificación, el fluoróforo (una molécula que emite luz a cierta longitud de onda) está unido a un extremo de la cadena del cebado o *primer*, mientras la sonda no se haya hidrolizado el quencher y el fluoróforo permanecen cercanos. Durante la reacción, la polimerasa lleva a cabo la extensión del cebador y replica a la secuencia a la que se une la sonda. Así, la polimerasa escinde la sonda, liberando la molécula reportera y dando como resultado el aumento de fluorescencia del fluorocromo indicador (Figura 8). Durante la reacción de amplificación, puede medirse la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de producto de PCR formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (Sandoval *et al.*, 2013). Para este trabajo se empleó con una concentración de 10 ng/ μ L de ADN por individuo.

7.5.6 Análisis de datos. Los datos se analizaron con ayuda del *software* Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2005), el cual integra varios métodos básicos y avanzados para el análisis de datos de genética de poblaciones tales como los índices de diversidad genética estándar y la estimación de frecuencias de alelos y genotipos, entre muchos otros. Este mismo programa nos permitió determinar el desequilibrio de ligamiento (LD), el análisis de varianza molecular (AMOVA). La determinación del equilibrio genético con respecto a la ecuación de Hardy-Weinberg

(HW) en los diferentes grupos, se calculó mediante la utilización de los estadísticos de Weir and Cockerham con ayuda del software Genetix v.4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1996).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) se llevó a cabo con el *software* GenAlex v.6.5 (Peakall y Smouse, 2006). Este análisis permite agrupar los datos genéticos de poblaciones y así poder determinar la estructura de la población (Meirmans, 2012). El análisis *multiloci* se llevó a cabo mediante conteo directo, considerando el efecto acumulativo de los alelos de riesgo de los polimorfismos estudiados.

La obtención de los valores de razón de momios (OR; *odds ratio* por sus siglas en Inglés) y las significancias estadísticas se llevaron a cabo con la ayuda de la página *VassarStats* (<http://vassarstats.net/>).

7.5.7 Poblaciones para comparación. Nuestros datos fueron comparados con los reportados en el proyecto de los mil genomas (<https://www.internationalgenome.org/>).

VIII. RESULTADOS

Estadística genética poblacional

- **Descripción de las frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos de estudio**

Las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en los grupos de casos (IAM), controles (CTL) y control genómico (CG) se muestran en el cuadro 5. De manera general, la distribución de la frecuencia de los alelos en las tres poblaciones fue similar. Sin embargo, el alelo C del polimorfismo rs5104 localizado en *APOA4* (rs5104-C) fue significativamente más frecuente en los individuos con IAM en comparación con los otros dos grupos CTL (OR = 2.455, $p = 0.0005$) y CG (OR = 2.087, $p = 0.001$). De manera similar, el alelo G del polimorfismo rs662799 (rs662799-G) localizado en el gen *APOA5* fue más frecuente entre los individuos con IAM en comparación con los grupos CTL y CG (OR = 2.471, $p = 0.0004$; OR = 1.991, $p = 0.003$, respectivamente).

Con respecto a las frecuencias genotípicas, el estado homocigoto del polimorfismo rs5104-CC mostró una mayor frecuencia en el grupo IAM, en comparación con los grupos CTL y CG (OR = 2.483 $p = 0.093$; OR = 2.623 $p = 0.024$, respectivamente). Siguiendo el comportamiento alélico, el genotipo rs662799-GG fue más frecuente en los individuos con IAM en comparación con los grupos CTL y CG (OR = 2.966, $p = 0.036$; OR = 2.231, $p = 0.061$, respectivamente) (cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencias de distribución alélica y genotípica entre los tres grupos de estudio.

Frecuencias Alélicas								
Locus	Alelo	SNP	IAM (200 Cromosomas)	CTL (400 Cromosomas)	CG (800 Cromosomas)	MAF (mil genomas)	MAF (mundial)	MAF (CTL)
APOA4	C	rs5104	0.320 (n=64)	0.208 (n=84)	0.230 (n=184)	0.24	0.21	0.21
	T		0.680 (n=136)	0.792 (n=316)	0.770 (n=616)			
APOA5	A	rs662799	0.720 (n=144)	0.826 (n=332)	0.805 (n=644)	0.16	0.15	0.17
	G		0.280 (n=56)	0.174 (n=68)	0.195 (n=156)			
Frecuencias Genotípicas								
Locus	Genotipo	SNP	IAM (n=100)	CTL (n=200)	CG (n=400)			
APOA4	CC	rs5104	0.110 (n=11)	0.050 (n=10)	0.045 (n=18)			
	CT		0.450 (n=45)	0.305 (n=61)	0.380 (n=152)			
	TT		0.440 (n=44)	0.645 (n=129)	0.575 (n=230)			
APOA5	AA	rs662799	0.550 (n=55)	0.705 (n=141)	0.665 (n=266)			
	AG		0.340 (n=34)	0.255 (n=51)	0.282 (n=113)			
	GG		0.110 (n=11)	0.040 (n=8)	0.052 (n=21)			

IAM: grupo de casos, CTL: grupo control, GC: control genómico, MAF: Frecuencia alélica mínima.

- **Equilibrio con respecto a la ecuación de Hardy Weinberg**

De manera general, las tres poblaciones de estudio mostraron encontrarse en equilibrio con respecto a la ecuación de HW (cuadro 6). Sin embargo, es importante destacar el exceso de individuos homocigotos en la población de IAM rs662799 ($F_{IS} = 0.162$). Esta situación no se presentó en los grupos CTL y CG.

Cuadro 6. Determinación del equilibrio de Hardy Weinberg en las poblaciones de estudio.

Población	SNP	Gen	He obs	He esp	Fis	p
	rs5104	<i>APOA4</i>	0.440	0.435	-0.006	0.600
Casos	rs662799	<i>APOA5</i>	0.340	0.403	0.162	0.089
	Total		-	-	0.075	0.192
	rs5104	<i>APOA4</i>	0.320	0.332	0.038	0.038
Control	rs662799	<i>APOA5</i>	0.275	0.292	0.061	0.06
	Total		-	-	0.049	0.208
	rs5104	<i>APOA4</i>	0.275	0.354	-0.043	-0.043
CG	rs662799	<i>APOA5</i>	0.285	0.313	0.093	0.093
	Total		-	-	0.021	0.297

He obs, heterocigotos observados; He esp, heterocigotos esperados; Fis, estadístico de F para determinar el coeficiente de consanguinidad.

- **Desequilibrio de ligamiento**

Nuestros resultados indicaron un claro equilibrio de ligamiento en los polimorfismos analizados (cuadro 7), mostrando que los alelos de los polimorfismos (rs5104 y rs662799) se segregan de forma independiente. Este análisis se ajustó a los valores nominales 5% ($p \leq 0.0016$), 1% ($p \leq 0.0003$) y 0.1% ($p \leq 0.00003$) y en ninguno de ellos se encontró desequilibrio de ligamiento.

Cuadro 7. Determinación del desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos (rs5104 y rs662799).

Población	SNP	Valor de p
Casos	rs5104 vs rs662799	0.00003
Controles		0.00003
CG		0.00003

Valor de $p \leq 0.00003$ ajustado al valor nominal 0.1%, valor de $p \leq 0.0003$ ajustado al valor nominal 1 % y valor de $p \leq 0.0016$ ajustado al valor nominal 5%.

- **Análisis Molecular de Varianza**

Con respecto a la varianza entre las poblaciones estudiadas, el porcentaje fue mínimo (2%; $p > 0.05$) mientras que dentro de las poblaciones el porcentaje tiene un valor del 98% ($p \leq 0.0039$).

- **Contribución de los alelos, genotipos y combinación multiloci con el IAM.**

Con la finalidad de determinar la contribución de los alelos, genotipos y de los genotipos multiloci al IAM, se realizó el cálculo de razón de momios -OR- (cuadros 8 y 9). De manera general, la razón de momios confirmó los hallazgos del análisis descriptivo poblacional. El alelo rs5104-C mostró mas de dos veces de riesgo al IAM al compararlo con el CTL ($p \leq 0.005$; OR= 2.455) y el CG ($p \leq 0.001$; OR= 2.087) (cuadro 8). En cuanto el alelo de G del polimorfismo rs662799, éste también mostró contribuir al IAM (*versus* CTL, OR= 2.471, $p \leq 0.004$; *versus* CG, OR= 1.991, $p \leq 0.003$).

Estos hallazgos se mantuvieron en la condición genotípica en donde el estado homocigoto (CC) del polimorfismo rs5104 mostró una contribución de mas

de dos veces al IAM. Esta contribución se presentó bajo los tres modelos de análisis (Codominante, dominante y recesivo (cuadro 9). De forma similar, el genotipo GG del polimorfismo rs662799 mostró un riesgo de casi tres veces (OR= 2.966, $p \leq 0.036$) al desarrollo del IAM. No obstante, cuando se comparó con el CG la contribución presento un comportamiento marginal (OR= 2.230, $p \leq 0.060$).

Cuadro 8. Distribución genotípica de los modelos Codominante, Dominante y Recesivo, en los polimorfismos rs5104 y rs662799.

APOA4 rs5104								
Modelo	Genotipo	IAM	CTL	OR (95% IC)	p	CG	OR (95% IC)	p
Codominante	CC	0.110 (n=11)	0.050 (n=10)	2.348 (0.961- 5.733)	0.093	0.045 (n=18)	2.623 (1.196- 5.749)	0.024
	CT	0.450 (n=45)	0.305 (n=61)	1.864 (1.135- 3.061)	0.018	0.380 (n=152)	1.334 (0.857- 2.078)	0.243
	TT	0.440 (n=44)	0.645 (n=129)	0.432 (0.265- 0.705)	0.001	0.575 (n=230)	0.580 (0.373- 0.903)	0.020
Dominante	TT	0.440 (n=44)	0.645 (n=129)	0.432 (0.265- 0.705)	0.001	0.575 (n=230)	0.580 (0.373- 0.903)	0.020
	CT + CC	0.56 (n=56)	0.35 (n=71)	2.312 (1.417- 3.773)	0.001	0.42 (n=170)	1.721 (1.107- 2.678)	0.020
Recesivo	CC	0.110 (n=11)	0.050 (n=10)	2.348 (0.961- 5.733)	0.093	0.045 (n=18)	2.623 (1.196- 5.749)	0.024
	TT + CT	0.89 (n=89)	0.95 (n=190)	0.425 (0.174- 1.039)	0.093	0.95 (n=382)	0.381 (0.173- 0.835)	0.024
APOA5 rs662799								
Modelo	Genotipo	IAM	CTL	OR (95% IC)	p	CG	OR (95% IC)	p
Codominante	AA	0.550 (n=55)	0.705 (n=141)	0.475(0.288- 0.784)	0.004	0.665 (n=266)	0.615 (0.394- 0.961)	0.042
	AG	0.340 (n=34)	0.255 (n=51)	1.505 (0.893- 2.536)	0.160	0.282 (n=113)	1.308 (0.819- 2.088)	0.314
	GG	0.110 (n=11)	0.040 (n=8)	2.966 (1.153- 7.630)	0.036	0.052 (n=21)	2.230 (1.037- 4.794)	0.060
Dominante	AA	0.550 (n=55)	0.705 (n=141)	0.475 (0.288- 0.784)	0.004	0.665 (n=266)	0.615 (0.394- 0.961)	0.042
	AG + GG	0.45 (n=45)	0.29 (n=59)	1.955 (1.188- 3.215)	0.011	0.33 (n=134)	1.624 (1.040- 2.535)	0.042
Recesivo	GG	0.110 (n=11)	0.040 (n=8)	2.966 (1.153- 7.630)	0.036	0.052 (n=21)	2.230 (1.037- 4.794)	0.060
	AA +AG	0.89 (n=89)	0.97 (n=195)	0.207 (0.070- 0.614)	0.004	0.94 (n=379)	0.448 (0.208- 0.963)	0.06

OR: Odds ratio; 95%IC: Intervalo de confianza.

Cuadro 9. Contribución alélica, genotípicas y combinación multiloci con el IAM.

Análisis Alélico									
Gen	SNP	Alelo	Frecuencia alélica (IAM)	Frecuencia alélica (CTL)	OR (95% IC)	<i>p</i>	Frecuencia alélica (CG)	OR (95% IC)	<i>p</i>
APOA4	rs5104	C	0.320 (n=64)	0.208 (n=84)	2.455 (1.495-4.0298)	0.005*	0.230 (n=184)	2.087 (1.326-3.283)	0.001*
		T	0.680 (n=136)	0.792 (n=316)	0.564 (0.385-0.828)	0.004*	0.770 (n=616)	0.634 (0.451-0.891)	0.010*
APOA5	rs662799	A	0.720 (n=144)	0.826 (n=332)	0.526 (0.351-0.789)	0.002*	0.805 (n=644)	0.623 (0.437-0.888)	0.011*
		G	0.280 (n=56)	0.174 (n=68)	2.471(1.511-4.038)	0.004*	0.195 (n=156)	1.991 (1.278-3.100)	0.003*
Análisis Genotípico									
Gen	SNP	Genotipo	Frecuencia alélica (IAM)	Frecuencia alélica (CTL)	OR (95% IC)	<i>p</i>	Frecuencia alélica (CG)	OR (95% IC)	<i>p</i>
APOA4	rs5104	CC	0.110 (n=11)	0.050 (n=10)	2.348 (0.962-5.733)	0.093	0.045 (n=18)	2.623 (1.196-5.749)	0.025*
		CT	0.450 (n=45)	0.305 (n=61)	1.864 (1.135-3.061)	0.018*	0.380 (n=152)	1.335 (0.8572.078)	0.243
		TT	0.440 (n=44)	0.645 (n=129)	0.432 (0.265-0.705)	0.001	0.575 (n=230)	0.581 (0.373-0.903)	0.020*
APOA5	rs662799	AA	0.550 (n=55)	0.705 (n=141)	0.511 (0.311-0.841)	0.011	0.665 (n=266)	0.615 (0.394-0.961)	0.042*
		AG	0.340 (n=34)	0.255 (n=51)	1.505 (0.893-2.536)	0.160	0.282 (n=113)	1.308 (0.819-2.088)	0.314
		GG	0.110 (n=11)	0.040 (n=8)	2.966 (1.153-7.630)	0.036*	0.052 (n=21)	2.230 (1.037-4.794)	0.060
Análisis Multiloci									
Genotipo (APOA4 y APOA5)		Frecuencias			OR (95% IC)	<i>p</i>	Frecuencias	OR (95% IC)	<i>p</i>
C + G		IAM	CTL	2.039 (1.232-3.376)	0.007 *	CG	1.781 (1.135-2.794)	0.015*	
		0.430 (n=43)	0.270 (n=54)			0.497 (n=119)			

OR: Odds ratio; 95%IC: Intervalo de confianza, * Valor de *p* estadísticamente significativo.

Una vez que se determinó la contribución por separado, se decidió analizar la combinación de los alelos rs5104-C y rs662799-G encontrados como de riesgo mediante un análisis multiloci (cuadro 9). Los resultados obtenidos continuaron corroborando la contribución de los dos alelos al desarrollo de IAM (*versus* CTL, OR= 2.039, $p \leq 0.007$; *versus* CG, OR= 1.781, $p \leq 0.015$).

Diferenciación poblacional

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de diferenciación poblacional para corroborar las diferencias entre los grupos de estudio (cuadro 10). Interesantemente, el grupo IAM tuvo un comportamiento totalmente diferente a los grupos CTL y CG, los que no mostraron diferencias entre ellos.

Cuadro 10. Diferenciación poblacional (IAM, CTL y CG).

	IAM	CTL	CG
IAM	-	< 0.0001	< 0.0001
CTL	0.02961	-	0.41441
CG	0.01831	-0.00046	-

En negritas valor significativo, debajo de la diagonal marcado se encuentran los valores de F_{ST} y por encima de la diagonal el valor de p .

Comparación con otras poblaciones

Finalmente se realizó una comparación con respecto al comportamiento de algunas poblaciones parentales a partir de las cuales se originó la población mestiza mexicana. Entre ellas se incluyeron a las poblaciones Ibérica de España (IBS), Yoruba en Ibadan, Nigeria (YRI), el pool genético de las poblaciones del Este de Asia (EAS), la población de mexicanos residentes en Los Angeles, California, USA (MXL) y los residentes de Utah con ancestría Europea del Norte y el Occidente, obtenidos a partir de la colección del Centro de Estudios Polimórficos Humanos (CEU). Asimismo, los datos se compararon con algunas poblaciones Latinas como la población Colombiana de Medellín (COL), la población Peruana de Lima, (PER), y la población de Puerto Rico (PUR).

El análisis de coordenadas principales (PCoA, Figura 12) muestra una separación contundente entre las poblaciones CTL, GC y MXL con respecto al grupo IAM. Vale la pena destacar que estos grupos (CTL, GC y MXL) se encuentran juntos en uno de los cuadrantes, mostrando sus similitudes genéticas. También es importante mencionar la conexión genética entre las poblaciones Latinas, principalmente con PUR y PEL, las que comparten la coordenada uno con CTL, GC y MXL. Llama la atención la cercanía entre las poblaciones IAM y EAS.

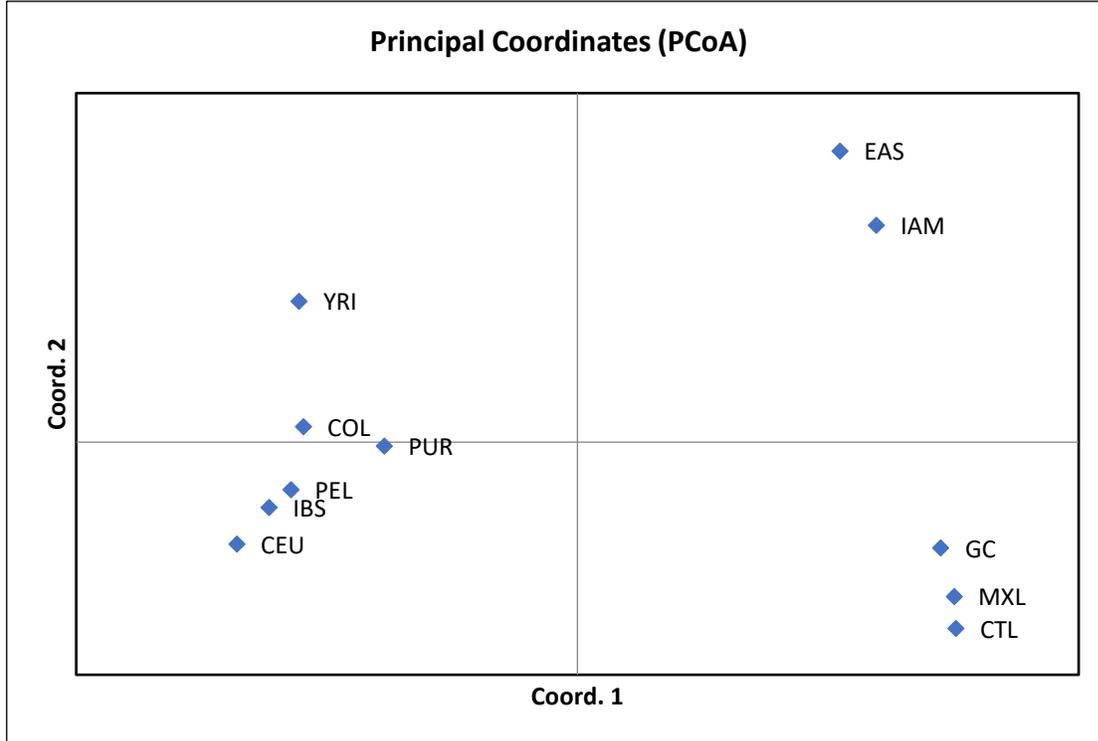


Figura 9. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de algunas poblaciones del proyecto de los mil genomas con los grupos de estudio (**GC**:control genómico; **CTL**: grupo control; **IAM**: población de casos; **COL**: Colombianos en Medellín, Colombia; **CEU**: Residentes de Utah con ascendencia Europea del norte y occidente; **EAS**: pool genético del Este de Asia, representado por Chinos de Beijing, Xishuangbanna y Han provenientes del sur de China, así como Japoneses residentes en Tokio y la población de Kinh en la ciudad de Ho Chi Minh, Vietnam; **YRI**: Yoruba en Ibadan, Nigeria; **PUR**: Puerto Rico; **IBS**: Ibericos en España; **PEL**: Peruanos en Lima, Perú; **MXL**: Mexicanos residentes en Los Ángeles, California.

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se buscó asociar la carga genética de predisposición al desarrollo de IAM empleando dos polimorfismos (rs5104 y rs662799) ubicados en los genes *APOA4* y *APOA5*, respectivamente. Para ello, se estudiaron tres grupos: 1) individuos con la manifestación clínica de IAM, el que fue comparado con 2) un grupo de controles clínicos y 3) un control genómico que nos permitió determinar que los resultados obtenidos no estuvieran relacionados con la arquitectura genética de nuestra población.

Entre nuestros primeros hallazgos, encontramos que los grupos CTL y CG mostraron una distribución de frecuencias similar a las reportadas en el proyecto mil genomas (<https://www.internationalgenome.org/>). Una de las explicaciones con respecto a dichas similitudes podría estar relacionado con una selección positiva. Si bien, la selección natural no es la fuerza principal de la variación del genoma humano, esta proporciona información de la evolución molecular humana, en donde la “variante ventajosa” se fija rápidamente en las poblaciones (Zheng-Bradley y Flicek, 2017). A nivel proteico se sabe que la variante *APOA5*-rs2075291 influye directamente en la función proteica y estructural, ya que esta variación proporciona un enlace disulfuro en la que se adiciona una cisteína pudiendo así delimitar ciertas funciones (Sharma *et al.*, 2014). Por otro lado, la metilación del tercer exón del gen que codifica para *APOA5* ha sido correlacionado con niveles altos de TG en plasma ($p \leq 0.003$) y la combinación de los portadores de al menos una variante de riesgo aumenta en un 80% el riesgo de aterogénesis (Oliva *et al.*, 2016). Hallazgos en poblaciones Europeas entre las combinación de los polimorfismos IVS3 y G473A de *APOA5* los polimorfismos IVS3 y G473A de *APOA5* y los niveles de TG soportan dichos hallazgos (Hadarits *et al.*, 2011). Finalmente, *APOA4* se deriva del gen *APOA1* y mediante un proceso evolutivo perdió un intrón. Mediante endonucleasas de restricción se han encontrado dos sitios polimórficos compartidos entre poblaciones del norte de Europa y del mediterráneo, mostrando un papel en la evolución temprana de la raza humana (Karathanasis *et al.*, 1986).

En cuanto las discrepancias en la distribución de las frecuencias alélicas en algunas poblaciones de mil genomas con respecto a los polimorfismos (rs662799 y rs5104), esto podrían estar relacionado con diferentes procesos evolutivos y demográficos. Como ejemplo están las diferencias entre la MAF entre Asiáticos (China, 0.30 y Singapur, 0.29) a las poblaciones Caucásicas (Jasim *et al.*, 2018). Con respecto a los resultados obtenidos en la presente tesis, la disimilitud en los grados de mestizaje podrían ser consecuencia de los cambios en las frecuencias, de allí la importancia de incorporar un control genómico (Bacanu *et al.*, 2000).

Las diferencias entre los grupos IAM vs CTL y CG, ($F_{ST} = 0.02961$, $F_{ST} = 0.01831$, $p \leq 0.0001$, respectivamente) refuerzan la posible contribución de estos polimorfismos al desarrollo de ECV. Por otro lado, el similar comportamiento entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos CTL y CG sugiere que nuestros hallazgos no estuvieron relacionados con la arquitectura genética de la población reforzando nuestros resultados. En este sentido, el análisis de varianza molecular mostró que no existen diferencias entre las poblaciones de estudio, pero sí entre los individuos. Si bien los estudios de casos y controles son muy comunes para determinar asociaciones genotipo-enfermedad, su fiabilidad se ve mermada debido a la estratificación poblacional, una manera de contrarrestar es el correcto uso del control genómico cuyo poder radica en utilizar individuos de la misma población en el cual el estado de salud es desconocido (Bacanu *et al.*, 2000; Shmulewitz *et al.*, 2004). Se ha demostrado bajo simulaciones que al utilizar el CG este resulta efectivo para poder controlar el efecto de la sub-estructuración genética y falsos positivos (Tsepilov *et al.*, 2013; Zang *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2005).

Por otro lado, vale la pena destacar la cercanía genética entre la población de IAM y el pool genético de las poblaciones del este de Asia (EAS). Lo anterior podría sugerir una posible contribución de la carga ancestral Nativo Americana al desarrollo de IAM. En este sentido, diversos estudios han soportado el poblamiento de las Américas a través de Beringia (Gómez R *et al.*, 2021; Pinotti *et al.*, 2019; Skoglund y Reich, 2016). La juventud de nuestra población ha mantenido la presencia de linajes patrilineales Nativos Americanos cuyas proporciones siguen

siendo altamente frecuentes en nuestra población, seguidos por los linajes provenientes de Europa (Gómez *et al.*, 2021; Santana *et al.*, 2014; v.Gr., R1b). Se sugiere realizar análisis con marcadores informativos de ancestría para así reforzar los hallazgos y evitar que la posible asociación encontrada se deba a la ascendencia en lugar a la enfermedad (Gómez R, 2017).

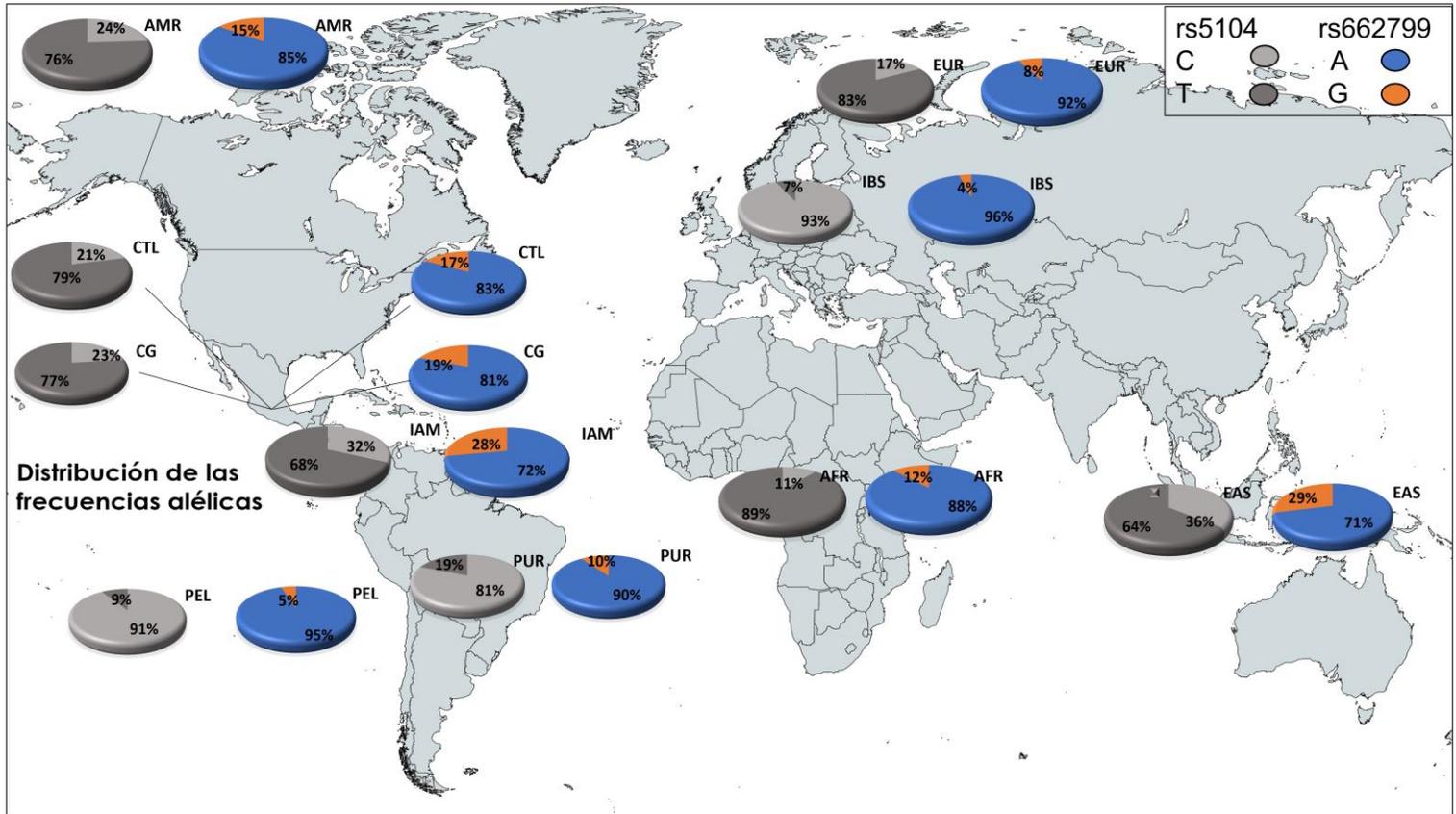


Figura 10. Distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos rs5104 y rs662799 en poblaciones de mil genomas y nuestras poblaciones de estudio. estudio (**GC**:control genómico; **CTL**: grupo control; **IAM**: población de casos; **AMR**: pool genético de America; **AFR**: pool genético de Africa; **COL**: población de Medellín, Colombia; **CEU**:Residentes de Utah; **EAS**:pool genético del Este de Asia; **EUR**: pool genético de Europa; **YRI**: Yoruba en Ibadan, Nigeria; **PUR**: Puerto Rico; **IBS**: Ibericos en España; **PEL**: Lima,Perú; : **MXL**: Mexicanos residentes en Los Angeles).

ASOCIACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

De manera general los alelos *APOA4*-rs5105-C y *APOA5*-rs662799-G mostraron cierta contribución al desarrollo de IAM, alelos que fueron significativamente más frecuentes en los individuos con IAM con respecto a los grupos CTL y CG. Vale la pena destacar que algunas poblaciones utilizadas del proyecto mil genomas como el *pool* genético de EAS mostraron ciertas similitudes con el grupo de IAM (Figura 13). Como se mencionó anteriormente, la carga ancestral Nativo Americana podría estar contribuyendo al desarrollo del IAM. En este sentido, la incidencia de ECV es mayor en Asia, particularmente en aquellas poblaciones de donde proceden los grupos Nativos que poblaron América (Este de Asia), reforzando nuestros hallazgos (Roth GA *et al.*, 2019; Gómez *et al.*, 2021). No obstante, las poblaciones de PUR y PEL mostraron una distribución totalmente distinta, muy similar al IBS. PUR tiene una población predominantemente derivada de Europa siendo escasa la presencia de linajes Nativos Americanos (Vilar *et al.*, 2014). Por lo que respecta a la población de PEL, parece tener una arquitectura genética similar a la de México, pero es posible que por ser individuos provenientes de una ciudad (Lima), la carga Europea haya sido prominente.

Por lo que respecta *APOA4*-rs5104 y su posible contribución a las ECVs, nuestros hallazgos fueron similares a los reportados por otros autores. Particularmente el alelo G de este mismo SNP ha sido relacionado con la presión arterial sistólica ($p \leq 0.001$) en una población de Puerto Rico (Mattei *et al.*, 2011). Una posible explicación de la contribución del polimorfismo *APOA4*-rs5104 al desarrollo del síndrome metabólico y sus condiciones subsecuentes es su localización. Particularmente *APOA5*-rs5104 se encuentra localizado, en el cromosoma 11 (posición ch11:116792991; GRCh38.p13) mostrando un desequilibrio de ligamiento con variantes del clúster de las APO (*APOA5*, *APOC3*; $p \leq 0.05$). De esta manera, la tasa de transcripción puede verse afectada por cualquiera de los miembros de los genes de dicho *cluster* (*APOA1*, *APOC3*, *APOA5*), pudiendo explicar su asociación con niveles altos de TG en plasma (Talmud *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 1997; Choi G R *et al.*, 2000). *APOA4* también

desempeña un papel crítico en el transporte inverso de colesterol, pudiendo influir en la absorción de lípidos. Particularmente, esta apolipoproteína se reconoce como una promesa terapéutica, al actuar como un factor de saciedad, además del transporte de lípidos (Wang F *et al.*, 2015; Wang F *et al.*, 2012). Hallazgos previos han sugerido la contribución de variantes genéticas de *APOA4* con el riesgo de síndromes metabólicos y con la hipertrigliceridemia (Bai *et al.*, 2019, Ou *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha observado que mujeres con depresión, portadoras del alelo G-rs5104 presentaron niveles más altos en plasma de la *APOA4* ($p \leq 0.05$) (Gou Q W *et al.*, 2021). Por su parte, la variante de *APOA4* (rs5072), localizada a 15 Kb de nuestra variante de estudio (rs5104) ha sido asociada con hipertrigliceridemia en mujeres (genotipo TC+ TT; OR=1.36; 95%IC=1.5-1.6, $p \leq 0.05$) (Bai w *et al.*, 2019). Lo anterior muestra la diferencia de acuerdo con el sexo y la predisposición a ECV. Consecuentemente, nuestros hallazgos tendrían que ser evaluados en mujeres mexicanas, dado que la presente tesis solo evaluó individuos del sexo masculino.

Sin embargo, los resultados de este trabajo fueron inconsistentes con otros estudios, esto porque las distintas historias demográficas de las poblaciones generan diferencias en las distribuciones de los alelos lo que podría explicar algunas discrepancias entre los estudios. Específicamente, los individuos homocigotos para el alelo T han mostrado un mayor riesgo a la cardiopatía coronaria en poblaciones de Europa (OR=2.04 95%IC=1.02-4.05) (Wong *et al.*, 2003).

Por lo que respecta *APOA5*, esta proteína desempeña un papel fundamental en la regulación de TG en plasma tanto en ratones como en humanos (Pennacchio y Rubin, 2003). Particularmente, el polimorfismo que se estudió en el presente trabajo (rs662799) ha mostrado contribuir con la hipertrigliceridemia y por ende con el IAM en poblaciones Europeas, en donde el alelo G (OR=1.44; 95%IC=1.23-1.69 $p \leq 0.05$) y su genotipo homocigoto (OR=1.39 95%IC= 0.98-1.95 $p \leq 0.001$) mostraron contribuir al desarrollo de estas patologías (De Caterina *et al.*, 2011; Ariza *et al.*, 2010). Otro estudio desarrollado con individuos de España, mostró asociación entre los niveles altos de TG en individuos portadores de al menos un alelo de la variante S19W (rs3135506) ($p \leq 0.05$) con una distancia de

1Kb con nuestra variante estudiada (rs662799) (Oliva I. *et al.*, 2016). En cuanto a las poblaciones de Asia, se ha reportado que el alelo G del polimorfismo (rs662799) se asocia con niveles altos de TG en poblaciones infantiles (OR=1.58; $p \leq 0.001$) de Corea (Park *et al.*, 2020) y China (OR=1,471; $95\%IC=1,058-2,046$; $p \leq 0.017$) (Zhu *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2010). Para el caso de las poblaciones Latinas, los estudios han mostrado la contribución del alelo G (rs662799) a los niveles altos de TG en plasma ($2,05 \pm 0,01$ mmol / L; $p = <0.0001$), lo que no solo se ha relacionado con obesidad sino también con las ECVS (Furuya *et al.*, 2013). Dentro de la población Mestiza mexicana el dicho polimorfismo (genotipo GG) ha sido previamente relacionado con niveles altos de TG (OR=2.96 $95\%IC = 1.86-4.71$; $p \leq 0.05$) en infantes entre 5-14 años (Suárez-Sánchez *et al.*, 2017). Similares hallazgos han sido reportados en el polimorfismo de APOA5 (rs964184; OR=2.3, $95\%IC=1.1-4.9$, $p \leq 0.05$) (Bautista Martínez *et al.*, 2022). Todos estos trabajos soportaron nuestros hallazgos.

En contraste, un estudio en Saltillo, Coahuila no presento asociación de la variante de APOA5 (rs662799) con niveles altos de HDL genotipo TC + CC (OR= 1.01, $95\%IC =0.99-1.02$, $p \leq 0.112$) (Carranza-González *et al.*, 2018). Dichos datos han sido replicados en la población de Brasil (Valente-Frossard *et al.*, 2020). Posiblemente esto se deba a la arquitectura genética de nuestra población, no olvidando que somos una población de reciente aparición (Johnson *et al.*, 2011).

Finalmente, como cualquier estudio, la presente tesis tuvo fortalezas y limitaciones. En cuanto, a las fortalezas, se encontraron la presencia de un control genómico, lo que permitió fortalecer nuestros hallazgos y disminuir las falsas asociaciones. Por lo que respecta a las limitaciones de este proyecto, es que a pesar de que el tamaño de muestra fue adecuado para realizar los análisis, esto sólo son datos preliminares. Por lo tanto, es necesario aumentar el tamaño de muestra, así mismo una limitante fue el no contemplar los factores antropométricos y el estudio en mujeres.

X. CONCLUSION

En conclusión, la presente tesis muestra datos contundentes que pone en evidencia la posible contribución genética de los alelos rs5104-C (*APOA4*) y rs662799-G (*APOA5*) con el desarrollo del IAM en la población mestiza mexicana. Nuestros hallazgos se suman a la extensa evidencia en cuanto contribución al desarrollo de las ECV en distintas poblaciones, siendo de los pocos estudios realizados en nuestra población. Si bien como anteriormente se mencionó, estos datos son preliminares, pueden servir como base para futuros estudios para que sean considerados como biomarcadores genéticos, todo esto con mira hacia la medicina personalizada.

XI. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Enriquecer este trabajo con mayor número de SNP en genes involucrados en vías metabólicas que contribuyan al desarrollo de las ECVS.
- Aumentar el número de individuos, así como la representación de los diferentes estados que conforman la República Mexicana para tener un panorama más completo de nuestra población.
- Realizar estudios antropométricos, lo que indudablemente traerá consigo un mejor diagnóstico sobre los niveles de TG en sangre de nuestra población.
- Añadir en este trabajo a individuos del sexo femenino, cuyo fin sería ver si existen diferencias en la contribución genética de acuerdo con el sexo.

XII. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Aguiar-Souto P, Cabanas-Grandío P, González-Juanatey J R. 2009. La enfermedad polivascular aterotrombótica: un enemigo común y distintos frentes. *Revista española de cardiología suplementos*.(4)9:4-10.
- Ahmad, A., Sundquist, K., Zöller, B., Dahlbäck, B., Elf, J., Svensson, P. J., Memon, A. A. 2018. Evaluation of expression level of apolipoprotein M as a diagnostic marker for primary venous thromboembolism. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 24(3), 416-422.
- Anchordoquy T, J, y Molina M, C. 2007. Preservation of DNA. *Cell Preservation Technology*. 5(4), 180-188.
- Andersson, C., Vasan, R. S. 2018. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nature Reviews Cardiology*. 15(4), 230-240.
- Ariza, MJ, Sánchez-Chaparro, M. Á., Barón, FJ, Hornos, AM, Calvo-Bonacho, E., Rioja, J., González-Santos, P. 2010. Additive Effects of LPL, APOA5, and APOE variant Combinations on Triglyceride Levels and Hypertriglyceridemia: Results of the ICARIA Genetic Substudy. *Genética médica BMC*. 11 (1), 1-10.
- Au A, Griffiths L R, Irene L, Kooi C W, Wei L K. 2017. The impact of APOA5, APOB, APOC3 and ABCA1 gene polymorphisms on ischemic stroke: Evidence from a meta-analysis. *Atherosclerosis*. (265), 60-70.
- Aziz M, Yadav K S. 2016. Pathogenesis of Atherosclerosis: A Review. *Medical & Clinical Reviews*. 2(3)22.
- Bacanu, S. A., Devlin, B., Roeder, K. 2000. The power of genomic control. *The American Journal of Human Genetics*. 66(6), 1933-1944.
- Badimon, L., Vilahur, G. 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *Journal of internal medicine*. 276(6), 618-632.

- Bai W, Kou C, Zhang L, You Y, Yu W, Hua W, Wu Y. 2019. Functional polymorphisms of the APOA1/C3/A4/A5-ZPR1-BUD13 gene cluster are associated with dyslipidemia in a sex-specific pattern. *PeerJ.* (6); e6175.
- Bautista-Martínez, J. S., Mata-Marín, J. A., Sandoval-Ramírez, J. L., Chaparro-Sánchez, A., Manjarrez-Téllez, B., Uribe-Noguez, L. A., Pompa-Mera, E. N. 2021. Contribution of APOA5, APOC3, CETP, ABCA1 and SIK3 genetic variants to hypertriglyceridemia development in Mexican HIV-patients receiving antiretroviral therapy. *Pharmacogenetics and Genomics*, 32(3), 101-110.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.
- Camacho-Mejorado R, Gómez R, Torres-Sánchez L E, Hernández-Tobías A, E Noris G, Santana C, Magaña J J, Orozco L, Peña-Díaz A, Arenas-Sordo M L, Meraz-Ríos, M A, Majluf-Cruz A. 2020. ALOX5, LPA, MMP9 and TPOX gene polymorphisms increase atherothrombosis susceptibility in middle-aged Mexicans. *Royal Society Open Science.* 7(1); 190775.
- Caratachea M A C. 2007. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.* 20(3); 213-221.
- Carranza-González, L., León-Cachón, R. B., González-Zavala, M. A., Ríos-Ibarra, C., Morlett-Chávez, J., Sánchez-Domínguez, C., Salinas-Santander, M. ACE. 2018. APOA5, and MTP gene polymorphisms analysis in relation to triglyceride and insulin levels in pediatric patients. *Archives of Medical research.* 49(2), 94-100.
- Cham B E. 1978. Importance of apolipoproteins in lipid metabolism. *Chemico-biological interactions.* 20(3); 263-277.
- Chen R, Davydov E V, Sirota M, Butte A J. 2010. Non-synonymous and synonymous coding SNPs show similar likelihood and effect size of human disease association. *PloS one.* 5(10).
- Choi, G. R., Suh, S. P., Song, J. W., Kee, S. J., Shin, J. H., Ryang, D. W. 2000. Genetic variation of the Apo AI-CIII-AIV gene cluster in hypertriglyceridemic patients with

chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Journal of Korean Medical Science*. 15(3), 289-294.

Cortes I. 2016. Ateroesclerosis, primera causa de muerte en México [internet].[consultado 13 de feb 2019]. Disponible en: <https://www.saludymedicinas.com.mx/centros-de-salud/colesterol/articulos/ateroesclerosis-primer-causa-de-muerte-en-mexico.html>

Conti, P., Shaik-Dasthagirisaeb, Y. 2015. Atherosclerosis: a chronic inflammatory disease mediated by mast cells. *Central European journal of immunology*. 40(3), 380-386.

Dadd T, Weale M E, Lewis C M. A critical evaluation of genomic control methods for genetic association studies. 2009. *Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society*. 33(4); 290-298.

De Caterina R, Talmud, Phillipa J, Merlin P A, Foco L, Pastorino R, Altshuler D, Mauri F, Peyvandi F, Lina D, Khatiresan S, Bernardinelli L, Ardissino D. 2011. Strong association of the APOA5-1131T> C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 214(2);397-403.

Dhingra R, Vasan R S. 2012. Age as a risk factor. *Medical Clinics*. 96(1);87-91.

Didenko V V. 2001. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*. 31(5); 1106-1121.

Díez J M B, del Val García J L, Pelegrina J T, Martínez J L. M, Peñacoba R M, Tejón I G, Forcadell P P, España M R, Colom M O, Quintana E M R, Pomares S M, Boranat A A, Alvarez P B. 2005. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo en atención primaria. *Revista Española de Cardiología*. 58(4); 367-373.

Dieckmann, M., Dietrich, M. F., Herz, J. 2010. Lipoprotein receptors—an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem*. 391(11): 1341–1363

Dominiczak, M. H, Caslake M. J. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Annals of clinical biochemistry*. 48(6); 498-515.

- Einarson T R, Acs A, Ludwig C, Panton U H. 2018. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007–2017. *Cardiovascular diabetology*. 17(1); 83.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*. 1, 47-50.
- Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. 2011. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1811(11); 637-647.
- Feingold K. R, Grunfeld C. 2018. Introduction to lipids and lipoproteins. In *Endotext [Internet]*. MDText. com, Inc.
- Fiatal, S, Adany R. 2018. Application of single-nucleotide polymorphism-related risk estimates in identification of increased genetic susceptibility to cardiovascular diseases: a literature review. *Frontiers in public health*. 5;358.
- Fodor G. 2010. Primary prevention of CVD: treating dyslipidaemia. *BMJ clinical evidence*. 12:215.
- Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu L S, Pham T, Thomas B, Rommens C, Fruchart J C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio A L. 2004. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochemical and biophysical research communications*. 319(2); 397-404.
- Furuya, T. K., Chen, E. S., Ota, V. K., Mazzotti, D. R., Ramos, L. R., Cendoroglo, M. S., Smith, M. A. 2013. Association of APOA1 and APOA5 polymorphisms and haplotypes with lipid parameters in a Brazilian elderly cohort. *Genet Mol Res*. 12(3), 3495-3499.
- Gaio V, Nunes B, Fernandes A, Mendonça F, Correia F H, Beleza Á, da Silva M B, Gil A P, Bourbon M, Vicente A, Días C M. 2014. Genetic variation at the CYP2C19 gene associated with metabolic syndrome susceptibility in a South Portuguese population: results from the pilot study of the European Health Examination Survey in Portugal. *Diabetology & metabolic síndrome*. 6(1); 23.

- Gómez R. 2017. The role of population genetics and its implications in the study of complex- Disease risk. *J Genet Mol Biol.* 1(1):12-13.
- Gómez R., Schurr T. G, Meraz-Ríos M. A. 2021. Diversity of Mexican Paternal Lineages Reflects Evidence of Migration and 500 Years of Admixture. En: De Lourdes Muñoz-Moreno, M., Crawford, M. H. Eds. *Human Migration: Biocultural Perspectives.* Oxford University Press.
- Guardiola M, Ribalta J. 2017. Update on APOA5 genetics: toward a better understanding of its physiological impact. *Current atherosclerosis reports.* 19(7); 30.
- Guo, Q. W., Si, Y. J., Shen, Y. L., Chen, X., Yang, M., Fang, D. Z., Lin, J. 2021. Depression Augments Plasma APOA4 without Changes of Plasma Lipids and Glucose in Female Adolescents Carrying G Allele of APOA4 rs5104. *Journal of Molecular Neuroscience.* 71(10), 2060-2070.
- Gutstein, D. E., Fuster, V. 1999. Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular research.* 41(2), 323-333.
- Hadarits, F., Kisfali, P., Mohás, M., Maász, A., Sümegi, K., Szabó, M., Melegh, B. 2011. Stepwise positive association between APOA5 minor allele frequencies and increasing plasma triglyceride quartiles in random patients with hypertriglyceridemia of unclarified origin. *Pathology & Oncology Research.* 17(1), 39-44
- Halalkhor S, Jalali F, Tilaki K H, Shojaei S. 2014. Association of two common polymorphisms of apolipoprotein A5 gene with metabolic syndrome indicators in a North Iranian population, a cross-sectional study. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders.* 13(1); 48.
- Hansen, J. B., Fernández, J. A., Deguchi, H., Björkegren, J., Mathiesen, E. B. 2011. The apolipoprotein C1 content of very-low-density lipoproteins is associated with fasting triglycerides, postprandial lipemia, and carotid atherosclerosis. *Journal of lipids.*
- Hong Y M. 2010. Atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Korean circulation journal.* 40(1); 1-9.

- Hong, S. H., Park, W. H., Lee, C. C., Song, J. H., Kim, J. Q. 1997. Association between genetic variations of apo AI-CIII-AIV cluster gene and hypertriglyceridemic subjects. *Clinical chemistry*. 43(1), 13-17.
- Indolfi C. 2002. Genetic factors in atherosclerosis: status and perspectives. *European Heart Journal Supplements*. 4(suppl_B), B14-B16.
- Isordia-Salas I, Jiménez-Alvarado R M, Cerda-Mancillas M C, Alvarado-Moreno J A, Hernández-Juárez J, Santiago-Germán D, Leños-Miranda A, Majluf-Cruz A. 2018. Polimorfismos asociados a disfunción endotelial ya un estado protrombótico en jóvenes mexicanos con infarto cerebral. *Gaceta medica de Mexico*. 154, S15-S21.
- Jebari-Benslaiman, S., Galicia-García, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J. R., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Benito-Vicente A., Martín, C. 2022. Pathophysiology of atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(6), 3346.
- Jiang, C. Q., Liu, B., Cheung, B. M., Lam, T. H., Lin, J. M., Li Jin, Y., Thomas, G. N. 2010. A single nucleotide polymorphism in APOA5 determines triglyceride levels in Hong Kong and Guangzhou Chinese. *European journal of human genetics*. 18(11), 1255-1260
- Johnson N A, Coram M A, Shriver M D, Romieu I, Barsh G S, London S J, Tang H. 2011. Ancestral components of admixed genomes in a Mexican cohort. *PLoS genetics*. 7(12) e1002410
- Karathanasis, S. K., Oettgen, P., Haddad, I. A., Antonarakis, S. E. 1986. Structure, evolution, and polymorphisms of the human apolipoprotein A4 gene (APOA4). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(22), 8457-8461.
- Keller A, Graefen A, Ball M, Matzas M, Boisguerin V, Maixner F, Stade, B, Franke A, Mayer J, Splangler J, McLaughlin S, Shah M, Lee C, Harkins T T, Sartori A, Moreno-Estrada A, Henn B, Sikora M, Semino O, Chironi J, Rootsi S, Myres N M, Cabrera V M, Underhill P A, Bustamante C D, Vigl E E, Samadelli M, Cipollini G, Haas J, Katus H, Connor B D, Carlson M R, Meder B, Meese E, Pusch M, Zink A. 2012. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nature Communications*. 3 (1); 1-9.

- Klemenc-Ketis Z, Peterlin B. 2013. Family history as a predictor for disease risk in healthy individuals: a cross-sectional study in Slovenia. *PLoS One*. 8(11).
- Kim M, Kim M, Yoo H J, Bang Y J, Lee S H, Lee J H. 2018. Apolipoprotein A5 gene variants are associated with decreased adiponectin levels and increased arterial stiffness in subjects with low high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Clinical genetics*. 94(5); 438-444.
- Kolber, M. R., Scrimshaw, C. 2014. Family history of cardiovascular disease. *Canadian Family Physician*. 60(11), 1016-1016.
- Labrie, M., Lalonde, S., Najyb, O., Thiery, M., Daneault, C., Des Rosiers, C., Mounier, C. 2015. Apolipoprotein D transgenic mice develop hepatic steatosis through activation of PPAR γ and fatty acid uptake. *PloS one*. 10(6), e0130230
- Leys D. 2001. Atherothrombosis: a major health burden. *Cerebrovascular diseases*. 11(Suppl. 2);1-4.
- Lewis, C. M. 2002. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Briefings in bioinformatics*. 3(2), 146-153.
- Lewis, C. M., Knight, J. 2012. Introduction to genetic association studies. *Cold Spring Harbor Protocols*. (3), pdb-top068163.
- Libby P, Ridker P M, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105(9); 1135-1143
- Li S, Hu B, Wang Y, Wu D, Jin L Wang X. 2014. Influences of APOA5 variants on plasma triglyceride levels in Uyghur population. *PloS one*. 9(10).
- Liehn E. A, Ponomariov V, Diaconu R, Streata I, Ioana M, Crespo-Avilan G E, Cabrera-Fuentes H A. 2018. Apolipoprotein E in cardiovascular diseases: novel aspects of an old-fashioned enigma. *Archives of medical research*. 49(8); 522-529.
- Linton M F, Yancey P G, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, Vickers KC. 2019. El papel de los lípidos y las lipoproteínas en la aterosclerosis. En *endotexto [Internet]*. MDText. com, Inc.

- Lira E M T. 2015. Impacto de la hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 26(2);156-163.
- Lo J, Plutzky J. 2012. The biology of atherosclerosis: general paradigms and distinct pathogenic mechanisms among HIV-infected patients. *Journal of infectious diseases*. 205(suppl_3); S368-S374.
- Lopez-Salazar LI, Hernández-Tobías E A, Noris G, Santana C, Meraz-Ríos M.A, Quiroz-Jiménez N, Brooks D, Calderón-Aranda E S, Majluf A, Gómez R. 2017. Lipoprotein (a) and Interleukin-6 Genetic Polymorphisms Interactions Associated with Cardiovascular Events in the Mexican Population. *Thrombosis & Haemostasis: Research*. 1(1): 1005.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, AlMazroa M A, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn S Y, Alvarado M, Anderson H R, Anderson L M, Andrews K G, Atkinson C, Baddour L M, Barker-Collo S, Bartels D H, Bell M L, Benjamin E J, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Abdulhak A B, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh S S, Coffeng L E, Colan S D, Colquhoun S, Colson E K, Condón J, Connor M D, Cooper L T, Corriere M, Cortinovis M, Courville K, Couser W, Cowie B C, Criqui M H, Cross M, Dabhadkar K C, Dahodwala L, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Jarlais D C, Dharmaratne S D, Dorsey E R, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin P J, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman A D, Forouzanfar M H, Fowkes F G, Franklin R, Fransen M, Freeman M K, Gabriel S E, Gakidou E, Gaspari F, Gillun F R, Gonzales-Medina D, Halasa Y A, Haring D, Harrison J E, Havmoeller R, Hay R J, Hoen B, Hotez P J, Hoy D, Jacobsen K H, James S L, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J P, Knowlton L M, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz S E, Ohno S L, Mabweijano J, MacIntyre M, Maginller L, March L, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi B M, McAnulty J H, McDermott M M, McGrath J, Mensah G, Merriman T, Michaud C, Miller M, Miller T R, Mock C, Mocumbi A O, Mokdad A A, Moran A, Mulholland K, Nair M N, Naldi L, Nayaran KM V, Nasser K, Norman P, Donnell M, Omer S B, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian J D,

Rivero A P, Perez Padilla R, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Porrioni E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm J, Rein D B, Remuzzi G, Rivara F P, Roberts T, Rodriguez L F, Rosenfeld L C, Rushton L, Sacco R L, Salomon J A, Sampson U, Sanman E, Schwebel D C, Segui-Gomez M, Shepard D S, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor J A, Thomas B, Tleyjeh I M, Towbin J A, Truelsen T, Undurraga E A, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner G R, Wang M, Watt K, Weinstock M A, Weintraud R, Wilkinson J D, Woolf A D, Wulf S, Pon-Hsiu Y, Yip P, Zabetian A, Zhi-Jie Z, Lopez A D, Murray C JL, Almazroa M A, Memish Z A. 2010. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *The lancet*. 380(9859);2095-2128.

Maas A H, Appelman Y E. 2010. Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands Heart Journal*. 18(12);598-603.

Martín S. M., I., Collado Yurrita, L., Cuadrado Cenxual, M. Á., Mendive Dubourdieu, P. 2015. Role of ApoA1 on high-density lipoprotein: an intervention with plant sterols in patients with hypercholesterolemia. *Nutricion Hospitalaria*. 31(1).

Mattei J, Demissie S, Tucker K L, Ordovas J M. 2009. Apolipoprotein A5 polymorphisms interact with total dietary fat intake in association with markers of metabolic syndrome in Puerto Rican older adults. *The Journal of nutrition*. 139;(12); 2301-2308.

Mattei, J., Demissie, S., Tucker, K. L., Ordovas, J. M. 2011. The APOA1/C3/A4/A5 cluster and markers of allostatic load in the Boston Puerto Rican Health Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. ;21(11), 862-870.

Meirmans P, G. 2012. AMOVA-based clustering of population genetic data. *Journal of Heredity*. 103(5), 744-75.

Meraz-Ríos M A, Majluf-Cruz A, Santana C, Noris G, Camacho-Mejorado R, Acosta-Saavedra L C, Calderón-Aranda E S, Hernández- Juárez J, Magaña J J, Gómez, R. 2014. Association of vWA and TPOX polymorphisms with venous thrombosis in Mexican mestizos. *BioMed research international*, (2014); 9

- Miller M. 2009. Dyslipidemia and cardiovascular risk: the importance of early prevention. *QJM: An International Journal of Medicine*. 102(9);657-667.
- Möller-Leimkühler A M. 2007. Gender differences in cardiovascular disease and comorbid depression. *Dialogues in clinical neuroscience*. 9(1); 71.
- Morera Castro A, González González L M, García Hernández M, Lozada García L. 2003. Factores de riesgo aterosclerótico y comunidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 19(2)
- Morillas P J, Cabadés A, Bertomeu V, Echanove I, Colomina F, Cebrián J, Sanz J C. 2002. Infarto agudo de miocardio en pacientes menores de 45 años. *Revista Española de Cardiología*. 55(11) ;1124-1131.
- Montagnana M, Danese E, Lippi G. 2014. Genetic risk factors of atherothrombosis. *Pol Arch Med Wewn*. 124(9); 474-82.
- Mosca L, Barrett-Connor E, Kass Wenger N. 2011. Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation*. 124(19); 2145-2154.
- Nepal G, Tuladhar E T, Acharya K, Bhattarai A, Sharma V K, Raut M, Yadav B K. 2018. Dyslipidemia and associated cardiovascular risk factors among young Nepalese university students. *Cureus*. 10(1);10 e2089.
- Oliva, I., Guardiola, M., Vallvé, J. C., Ibarretxe, D., Plana, N., Masana, L., Ribalta, J. 2016. APOA5 genetic and epigenetic variability jointly regulate circulating triacylglycerol levels. *Clinical Science*. 130(22), 2053-2059.
- Ou H J, Huang G, Liu W, Ma X L, Wei Y, Zhou T, Pan Z M. 2015. Relationship of the APOA5/A4/C3/A1 gene cluster and APOB gene polymorphisms with dyslipidemia. *Genet Mol Res*. 14; 9277-9290.
- Park, S., Kang, S. 2020. Alcohol, carbohydrate, and calcium intakes and smoking interactions with APOA5 rs662799 and rs2266788 were associated with elevated plasma triglyceride concentrations in a cross-sectional study of Korean adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 120(8), 1318-1329.

- Patnala, R., Clements, J., Batra, J. 2013. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC genetics*. 14(1), 1-11.
- Peakall R, O, D, y Smouse P E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Pennacchio, L. A., Olivier, M., Hubacek, J. A., Cohen, J. C., Cox, D. R., Fruchart, J. C., Rubin, E. M. 2001. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 294(5540), 169-173.
- Pennacchio, L. A., y Rubin, E. M. 2003. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(4), 529-534.
- Pestana C I, Torres A, Blanco S, Rojas M J, Mendez C, Lopez J L, Porco A. 2009. Factor V Leiden and the Risk of Venous Thrombosis, Myocardial Infarction, and Stroke: A Case–Control Study in Venezuela. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 13(4); 537-542.
- Pinotti, T., Bergström, A., Geppert, M., Bawn, M., Ohasi, D., Shi, W., Tyler-Smith, C. 2019. Y chromosome sequences reveal a short Beringian Standstill, rapid expansion, and early population structure of Native American founders. *Current Biology*. 29(1), 149-157.
- Portilla E C, Muñoz W, Sierra C H. 2014. Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*. 21(5);318-326.
- Qi L, Liu S, Rifai N, Hunter D, Hu F B. 2007. Associations of the apolipoprotein A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride and HDL cholesterol levels in women with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 192(1);204-210.
- Qi L, Campos H. 2011. Genetic predictors for cardiovascular disease in hispanics. *Trends in cardiovascular medicine*. 21(1);15-20.
- Qiao, J. H., Tripathi, J., Mishra, N. K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X. P., Imes S., Fishbein M. C., Clinton S. K., Libby P., Lusis A. J., Tripathi B., Rajavashisth, T. B. 1997. Role

of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *The American journal of pathology*. 150(5), 1687.

Qin, W., Li, X., Xie, L., Li, S., Liu, J., Jia, L., Dong X., Ren X., Xiao J., Yang C., Zhou Y., Chen, Z. 2016. A long non-coding RNA, APOA4-AS, regulates APOA4 expression depending on HuR in mice. *Nucleic acids research*. 44(13), 6423-6433.

Quiroz-Jiménez N. Polimorfismos involucrados en la oxidación de lípidos, el hábito de fumar y su asociación con la aterotrombosis [Tesis]. 2018. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de IPN.

Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. 2017. Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gaceta médica de México*. 153(2); 238-250.

Ruiz A B, Rados Z. 2002. La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas. *Medicina integral*. 394-405.

Rogers K. 2019. Lipoprotein. Encyclopedia Britannica. internet].[consultado 27 de Mar 2020]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/lipoprotein>

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. 2020. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982-3021.

Ross, R. 1999. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*. 340(2), 115-126.

Saavedra N, Cuevas A, Hernández A, Caamaño J, Jaramillo P, Lanás F, Salazar L A. 2010. Polimorfismos genéticos de APOA5 se asocian a hipertrigliceridemia e hiperglicemia en individuos chilenos con enfermedad coronaria y controles. *Revista chilena de cardiología*. 29(1); 19-27.

- Sharma, V., Witkowski, A., Witkowska, H. E., Dykstra, A., Simonsen, J. B., Nelbach, L., Ryan, R. O. 2014. Hypertriglyceridemia associated with the c. 553G> T APOA5 SNP results from aberrant hetero-disulfide bond formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 34(10), 2254.
- Shmulewitz, D., Zhang, J., Greenberg, D. A. 2004. Case-control association studies in mixed populations: correcting using genomic control. *Human Heredity*. 58(3-4), 145-153
- Skoglund, P., Reich, D. 2016. A genomic view of the peopling of the Americas. *Current opinion in genetics & development*. 41, 27-35.
- Sandoval Rodríguez A S, Meza Ríos A, Floresvillar Mosqueda J F. 2013. Reacción en cadena de la polimerasa. En: Salazar Montes A, Sandoval Rodríguez A, Armendáriz Borunda. *Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Mc Graw Hill, México D. 145-159.
- Santana C, Noris G, Meraz-Ríos M A, Magaña J J, Calderon-Aranda E S, de Lourdes Muñoz M, Gómez R. 2014. Genetic analysis of 17 Y-STRs in a Mestizo population from the Central Valley of Mexico. *Human biology*. 86(4);289-312.
- Serrano-Sánchez C. 1996. Mestizaje e historia de la población de México (con un esbozo antropológico de los lacandones de Chiapas). *Municipio MA and Garcia Barreno P (eds). Plimorfismo Génico (HLA) en poblaciones hispanoamericanas. Real Academia de Ciencias Exactas, Física y Naturales: Madrid*. 171-194.
- Simon D I, Silverstein R L. 2015. Atherothrombosis: seeing red?. *Author Manuscript*. 1860-1862.
- Stein, R., Ferrari, F., Scolari, F. 2019. Genetics, dyslipidemia, and cardiovascular disease: new insights. *Current cardiology reports*. 21(8), 1-12.
- Suárez-Sánchez, F., Klunder-Klunder, M., Valladares-Salgado, A., Gómez-Zamudio, J., Peralta-Romero, J., Meyre, D., Cruz, M. 2017. APOA5 and APOA1 polymorphisms are associated with triglyceride levels in Mexican children. *Pediatric obesity*, 12(4), 330-336.

- Summerhill V I, Grechko A V, Yet S F, Sobenin I A, Orekhov A N. 2019. The Atherogenic Role of Circulating Modified Lipids in Atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*. 20(14); 3561.
- Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohászka Z, Kozma GT, Császár A, Balogh S, Almássy Z, Fust G, Czinner A. 2004. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 173(1), 109-114.
- Sun, H., Shen, D., Zhang, C., Huang, D., Wang, Y., Zhang, L. 2016. Meta-analysis on the correlation between APOM rs805296 polymorphism and risk of coronary artery disease. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 22, 8.
- Talmud, P. J., Palmen, J., Putt, W., Lins, L., Humphries, S. E. 2005. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *Journal of Biological Chemistry*. 280(31), 28215-28220.
- Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2(2);70-78.
- Tavernier G, Caspar-Bauguil S, Viguerie N. 2020. Apolipoprotein M: new connections with diet, adipose tissue and metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology*. 31(1); 8-14.
- Thompson R C, Allam A H, Lombardi G P, Wann L S, Sutherland M L, Sutherland J D, Vallodolid C M. 2013. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *The Lancet*. 381(9873);1211-1222.
- Thygesen K, Alpert J S, Jaffe A S, Chaitman B R, Bax J J, Morrow D A, White H D. 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 72(18); 2231-2264.
- Tousoulis D, Kampoli A M, Papageorgiou N, Androulakis E, Antoniadis C, Toutouzas K, Stefanadis C. 2011. Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. *Current pharmaceutical design*. 17(37); 4089-4110.

- Tsepilov, Y. A., Ried, J. S., Strauch, K., Grallert, H., van Duijn, C. M., Axenovich, T. I., Aulchenko, Y. S. 2013. Development and application of genomic control methods for genome-wide association studies using non-additive models. *PLoS One*. 8(12), e81431.
- Valente-Frossard, T. N. S., Cruz, N. R. C., Ferreira, F. O., Belisario, A. R., Pereira, B. M., de Freitas Gomides, A. F., Velloso-Rodrigues, C. 2020. Polymorphisms in genes that affect the variation of lipid levels in a Brazilian pediatric population with sickle cell disease: rs662799 APOA5 and rs964184 ZPR1. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 80, 102376.
- Van der Wal, A. C., Becker, A. E. 1999. Atherosclerotic plaque rupture—pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovascular research*. 41(2), 334-344.
- Vilar M G, Melendez C, Sanders A, Walia A, Gaies ki, J, Owings A, Schurr TG, and Genographic Consortium. 2014. Genetic Diversity in Puerto Rico and its implications for the Peopling of the Island and the West Indies. *Am J Phys Anthropol*.
- Viles-Gonzalez J F, Fuster V, Badimon J J. 2004. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *European heart journal*. 25(14); 1197-1207.
- Wai-man R W, Stephens J W, Acharya J, Hurel S J, Humphries S E, Talmud P J. 2004. The APOA4 T347S variant is associated with reduced plasma TAOS in subjects with diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Journal of lipid research*. 45(8); 1565-1571.
- Walldius, G. 2012. The apoB/apoA-I ratio is a strong predictor of cardiovascular risk. *Lipoproteins in health and diseases*. 95-148.
- Wang, F., Kohan, A. B., Lo, C. M., Liu, M., Howles, P., Tso, P. 2015. Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *Journal of lipid research*. 56(8), 1403-1418.

- Wang, F., Kohan, A. B., Kindel, T. L., Corbin, K. L., Nunemaker, C. S., Obici, S., Tso, P. 2012. Apolipoprotein A-IV improves glucose homeostasis by enhancing insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(24), 9641-9646.
- Wong, W. M. R., Hawe, E., Li, L. K., Miller, G. J., Nicaud, V., Pennacchio, L. A., Talmud, P. J. 2003. Apolipoprotein AIV gene variant S347 is associated with increased risk of coronary heart disease and lower plasma apolipoprotein AIV levels. *Circulation research*. 92(9), 969-975.
- Zang, Y., Zhang, H., Yang, Y., Zheng, G. 2007. Robust genomic control and robust delta centralization tests for case-control association studies. *Human heredity*. 63(3-4), 187-195.
- Zheng, G., Freidlin, B., Li, Z., Gastwirth, J. L. 2005. Genomic control for association studies under various genetic models. *Biometrics*. 61(1), 186-192.
- Zheng-Bradley, X., Flicek, P. 2017. Applications of the 1000 Genomes Project resources. *Briefings in functional genomics*. 16(3), 163-170
- Zhang S, Liu X, Necheles J, Tsai H J, Wang G, Wang B, Xu X. 2010. Genetic and environmental influences on serum lipid tracking: a population-based, longitudinal Chinese twin study. *Pediatric research*. 68(4); 316-322.
- Zhang Z, Chu G, Yin R X. 2013. Apolipoprotein M T-778C polymorphism is associated with serum lipid levels and the risk of coronary artery disease in the Chinese population: a meta-analysis. *Lipids in health and disease*, 12(1); 135.
- Zhu, W. F., Wang, C. L., Liang, L., Shen, Z., Fu, J. F., Liu, P. N., Zhu, Y. M. 2014. Triglyceride-raising APOA5 genetic variants are associated with obesity and non-HDL-C in Chinese children and adolescents. *Lipids in Health and Disease*. 13(1), 1-7.