



ORIGINAL

Identificación de factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad vascular cerebral de tipo isquémico en jóvenes mexicanos



M.C. Jiménez-González^{a,1}, D. Santiago-Germán^{b,1}, E.F. Castillo-Henkel^a,
J.A. Alvarado-Moreno^c, J. Hernández-Juárez^c, A. Leños-Miranda^d,
A. Majluf-Cruz^c e I. Isordia-Salas^{c,*}

^a Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

^b Servicio de Urgencias, H.G.R. No 1. Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^c Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, H.G.R. No 1. Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^d Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, UMAE HGO 4. Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

Recibido el 11 de agosto de 2017; aceptado el 10 de enero de 2018

Accesible en línea el 8 de marzo de 2018

PALABRAS CLAVE

TAFI;
PAI-1;
GP IIb/IIIa;
eNOS;
5,10 MTHFR;
EVC

Resumen

Introducción: Diversos polimorfismos en genes candidatos que codifican proteínas del sistema hemostático se han propuesto como factores de riesgo para el desarrollo de trombosis.

Métodos: Casos y controles, sobrevivientes de enfermedad vascular cerebral (EVC) isquémica idiopática ≤ 45 años de edad del servicio de neurología incluidos de manera consecutiva de 2006 a 2014. Por PCR-RFLP se identificaron los polimorfismos: Thr325Ile y Ala147Thr del gen de TAFI, 4G/5G del gen de PAI-1, PLA1/A2 del gen de la glucoproteína plaquetaria IIb/IIIa, Glu298Asp del gen de eNOS, y C677T del gen de la 5,10 MTHFR. Se realizó un análisis multivariado de regresión logística para calcular el riesgo independiente de EVC.

Resultados: Doscientos cuatro casos y 204 controles pareados por edad y sexo. Se asoció al polimorfismo Glu298Asp (genotipo $p=0,001$ y frecuencia alélica $p=0,001$), C677T (genotipo $p=0,01$), hipertensión ($p=0,03$) y tabaquismo ($p=0,02$) con la presencia de EVC isquémica, no así para los polimorfismos Ala147Thr, Thr325Ile, 4G/5G y PLA1/A2. Se identificó como factor de riesgo independiente al alelo 298Asp ($p=0,03$), T ($p=0,01$), hipertensión ($p=0,03$), tabaquismo ($p=0,01$) y AHFEAT ($p=0,04$).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: irmaiso.2016@gmail.com (I. Isordia-Salas).

¹ M.C.J.G. y D.S.G. contribuyeron por igual en el estudio.

KEYWORDS

TAFI;
PAI-1;
PG IIb/IIIa;
eNOS;
5,10-MTHFR;
Ischaemic stroke

Conclusiones: Los polimorfismos Glu298Asp y C677T de los genes que codifican a la enzima eNOS y 5,10 MTHFR, tabaquismo, hipertensión y AHFEAT se asociaron a la presencia de EVC isquémico en jóvenes mexicanos, no así el Thr325Ile, Ala147Thr, 4G/5G, PLA1/A2 en genes que codifican proteínas del sistema de fibrinólisis y receptores plaquetarios.

© 2018 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Identification of genetic risk factors associated with ischaemic stroke in young Mexican patients

Abstract

Introduction: Numerous polymorphisms in candidate genes coding for haemostatic system proteins have been proposed as risk factors for thrombosis.

Methods: We performed a case-control study of consecutive ischaemic stroke survivors aged ≤ 45 years, treated at our neurology department from 2006 to 2014. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism identified the following polymorphisms: Thr325Ile and Ala147Thr in TAFI, 4G/5G in PAI-1, PLA1/A2 in platelet glycoprotein IIb/IIIa, Glu298Asp in eNOS, and C677T in 5,10-MTHFR. A multivariate logistic regression analysis was performed to evaluate the independent risk of stroke.

Results: 204 cases and 204 age- and sex-matched controls were included in the study. Clinical and genetic variables associated with ischaemic stroke were hypertension ($P=.03$), tobacco use ($P=.02$), and the polymorphisms Glu298Asp (genotype: $P=.001$, allele frequency: $P=.001$) and C677T (genotype: $P=.01$); the Ala147Thr, Thr325Ile, 4G/5G, and PLA1/A2 mutations were not associated with ischaemic stroke. The 298Asp ($P=.03$) and T ($P=.01$) alleles, hypertension ($P=.03$), tobacco use ($P=.01$) and family history of stroke ($P=.04$) were identified as independent risk factors.

Conclusions: The polymorphisms Glu298Asp and C677T, affecting the eNOS and 5,10-MTHFR enzymes, respectively, and smoking, hypertension, and family history of stroke were associated with ischaemic stroke in young Mexican patients; this was not the case for the Thr325Ile, Ala147Thr, 4G/5G, and PLA1/A2 polymorphisms of the genes coding for fibrinolytic proteins and platelet receptors.

© 2018 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares se han convertido en la primera causa de muerte en el mundo, y es la trombosis el mecanismo etiológico en común¹. Aproximadamente el 67% de los casos de enfermedad vascular cerebral (EVC) son isquémicos, y se ha observado una notable reducción en su incidencia probablemente por la identificación temprana y adecuado control de los factores de riesgo tradicionales^{1,2}. Su prevalencia en pacientes de edad < 45 años varía del 3% al 5%, y en más de la mitad de los casos no se identifica la etiología³. Debido al menor tiempo de exposición a los factores de riesgo cardiovascular ambientales se considera que los factores de riesgo genéticos tienen una participación crucial en el desarrollo de trombosis en pacientes jóvenes⁴. Diversos polimorfismos en genes candidatos que codifican proteínas del sistema hemostático han sido propuestos como factores de riesgo para el desarrollo de trombosis⁵. El inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI) es una procarboxipeptidasa que atenúa la fibrinólisis, al eliminar los residuos de lisina C-terminal de la fibrina en la superficie del coágulo,

disminuyendo la afinidad de la plasmina a su sustrato⁶. El polimorfismo Thr325Ile en el gen que codifica a TAFI, localizado en el cromosoma 13q14.11, resulta en la sustitución de treonina (Thr) por isoleucina (Ile) en la posición 325, confiriéndole una vida media más larga y un incremento de hasta el 60% en su actividad^{7,8}. El polimorfismo Ala147Thr en el gen de TAFI se ha asociado a un incremento en sus niveles, que explica hasta el 61,6% de su variabilidad plasmática⁹. El inhibidor del activador del plasminógeno tisular tipo-1 (PAI-1) disminuye la fibrinólisis al inhibir la conversión de plasminógeno en plasmina, e inhibir la migración y proliferación de células musculares lisas entre el núcleo lipídico de la placa de ateroma y la luz arterial, predisponiendo la rotura de la placa al disminuir la síntesis de colágeno^{10,11}. La inserción de una guanina (5G) en la posición 675 corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen que codifica al PAI-1, localizado en el cromosoma 7q22.1, se asocia con un incremento en su expresión¹⁰. El receptor plaquetario más abundante, la glucoproteína plaquetaria (GP) IIb/IIIa, es un heterodímero dependiente de calcio que al activarse sufre un cambio estructural que le

Tabla 1 Genotipos propuestos como factores de riesgo de enfermedad vascular cerebral de tipo isquémico idiopático

Proteína	Función	Polimorfismo	Mecanismo propuesto
TAFI	Disminuye la afinidad de la plasmina a la fibrina atenuando la fibrinólisis ⁶	Thr325Ile Ala147Thr	Vida media más larga e incremento de su actividad hasta el 60% ^{7,8} Incremento en los niveles de TAFI ⁹
PAI-1	Disminuye la fibrinólisis al inhibir la conversión de plasminógeno en plasmina ^{10,11}	–675 4G/5G	Incremento en la expresión de PAI-1 ¹⁰
GP IIb/IIIa	Receptor plaquetario más abundante, que al activarse, se enlaza al FvW, fibrinógeno y otros receptores IIb/IIIa ¹²	PLA1/A2	Se cree mejora la agregación plaquetaria ¹³
eNOS	Sintetiza óxido nítrico a partir de L-arginina, regulando el tono vascular e inhibiendo la activación leucocitaria, plaquetaria y proliferación de células musculares lisas ¹⁴	Glu298Asp	Induce disfunción endotelial ^{15,16} .
MTHFR	Sintetiza homocisteína a partir de metionina, su incremento se ha asociado a disfunción del metabolismo cerebral ³⁹	C677T	Reduce la actividad de la enzima ¹⁷

eNOS: enzima óxido nítrico sintasa endotelial; FvW: Factor de Von Willebrand; GP IIb/IIIa: glucoproteína plaquetaria IIb/IIIa; 5,10 MTHFR: 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno tisular tipo-1; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

permite enlazarse a ligandos que contienen la secuencia de aminoácidos: arginina-glicina-ácido aspártico-serina, como el factor de Von Willebrand, fibrinógeno y otros receptores IIb/IIIa¹². La sustitución de timidina (T) por citosina (C) en la posición 1565 en el exón 2 del gen que codifica a la subunidad IIIa, localizado en el brazo largo del cromosoma 17, induce la sustitución de leucina por prolina en la posición 33, que se cree mejora la agregación plaquetaria¹³. La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) cataliza la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina; el óxido nítrico regula el tono vascular y previene la enfermedad aterotrombótica al inhibir la activación leucocitaria, plaquetaria y proliferación de células musculares lisas¹⁴. El cambio de una G por T en la posición 894 en el exón 7 del gen que codifica a la enzima eNOS, localizado en el cromosoma 7q35-36, se traduce en la sustitución de glutamina (Glu) por aspargina (Asp) en la posición 298, induciendo disfunción endotelial^{15,16}. El polimorfismo C677T en el gen que codifica a la enzima 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (5,10 MTHFR), localizado en el cromosoma 1p36.3, resulta en la sustitución de valina (Val) por alanina (Ala), y es responsable de una reducción en la actividad de la enzima¹⁷ (tabla 1).

El objetivo del presente estudio es identificar la asociación e interacción entre los polimorfismos: Thr325Ile y Ala147Thr en el gen que codifica a TAFI, 4G/5G en el gen que codifica a PAI-1, PLA1/A2 en el gen que codifica la subunidad IIIa de la GP, Glu298Asp en el gen que codifica a eNOS y C677T

en el gen que codifica a la 5,10 MTHFR, con la presencia de EVC de tipo isquémico en pacientes jóvenes mexicanos.

Pacientes y métodos

Se realizó un estudio de casos y controles en pacientes con diagnóstico de EVC isquémico idiopático ≤ 45 años de edad, ingresados de manera consecutiva de 2006 a 2014. Previo consentimiento informado los pacientes fueron referidos a la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital General Regional n.º 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se obtuvieron las variables: edad, sexo, antecedente de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial sistémica (HAS), dislipidemia, tabaquismo, y antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica (AHFEAT). Los polimorfismos: Thr325Ile, Ala147Thr, 4G/5G, PLA1/A2, Glu298Asp y C677T fueron determinados en todos los participantes. Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social, conforme a las directrices de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y la Organización Mundial de la Salud, modificada en Tokio, Japón.

Todos los pacientes con diagnóstico de EVC isquémico confirmado por tomografía axial computarizada fueron previamente protocolizados mediante la realización de

los siguientes estudios: ultrasonido Doppler carotídeo y vertebral, ecocardiograma transtorácico o transefágico, angiografía, resonancia magnética cardíaca, electrocardiograma de 12 derivaciones y monitorización del ritmo cardíaco automatizado por al menos 24 horas, para descartar aquellos pacientes con factores de riesgo para EVC cardioembólico como: fibrilación auricular, trombo intra-ventricular, infarto agudo de miocardio, prótesis valvular, cardiomiopatía, endocarditis, mixoma auricular, persistencia del foramen oval, aneurisma del septum auricular, estenosis de la arteria carotídea $\geq 50\%$, disección de la arteria vertebrobasilar y arteritis. Se determinaron las concentraciones de antitrombina, proteína C y proteína S (Diagnostica Stago), anticoagulante lúpico (DVV test, DVV confirm®; American Diagnostic, EE. UU.), resistencia a la proteína C activada modificada (rango normal $> 2,0$, Coatest+APC Resistance V-S; Chromogenix, Suecia) y anticuerpos anticardiolipinas (valor normal < 10 U; Sanofi Diagnostics Pasteur, Francia) en todos los participantes a los 6 meses posteriores al ictus.

El diagnóstico de EVC isquémico se realizó de acuerdo con los criterios *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*¹⁸. El grupo control se integró por sujetos voluntarios aparentemente sanos, que acudieron al banco de sangre de manera consecutiva como potenciales donadores, sin antecedente de enfermedad (DM, HAS, EVC o enfermedad trombótica), con parámetros bioquímicos en rangos normales y que aceptaron participar en el estudio, pareados por edad y género con el grupo de casos.

Identificación de polimorfismos

Los polimorfismos Thr325Ile y Thr147Ala del gen del TAFI se amplificaron bajo las siguientes condiciones térmicas: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 60 segundos por 30 ciclos. Mediante la enzima de restricción *SpeI* se obtuvo una banda de 245 pb para el alelo Thr y 364 pb para el alelo Ile del polimorfismo Thr325Ile. Con la enzima *BbvI* se obtuvieron bandas de 124 y 304 pb para el alelo Ala y 428 pb para el alelo Thr del polimorfismo Thr147Ala.

Para el polimorfismo 4G/5G del PAI-1 se aplicó una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 3 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos, y una extensión final a 72 °C por un minuto. Se utilizó la enzima *Bsl I* y se obtuvo una banda de 99 pb para el alelo 5G y 98 pb para el 4G.

Para el polimorfismo PLA1/A2 en el gen de la subunidad IIIa de la GP: una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineación a 57 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 60 segundos, y una extensión final a 72 °C por 15 minutos. Se empleó la enzima *MspI* y se obtuvo una banda de 221 pb para el alelo PLA1 y 177 pb para PLA2.

El polimorfismo Glu298Asp del gen de eNOS requirió una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación a 60 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 30 segundos, por 30 ciclos. Se utilizó la enzima *Mbo I* y se obtuvo 2 fragmentos de 119 y 87 pb para el alelo Asp298 y 206 pb para el Glu298.

El polimorfismo C677T del gen de la 5,10 MTHFR ameritó una desnaturalización a 94 °C por 20 segundos, alineación a 62 °C por 20 segundos y extensión a 72 °C por 20 segundos, por 30 ciclos. Se utilizó la enzima *Hinf I* y se obtuvo una banda 175 pb para el alelo T y 198 pb para el alelo C.

Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron en media $\pm$ desviación estándar. Las variables categóricas se expresaron en número de pacientes (n) y porcentajes (%). Las variables continuas fueron comparadas entre el grupo de casos y controles utilizando la prueba «t» de *Student*. Las variables categóricas fueron comparadas entre ambos grupos a través de la prueba Chi cuadrado. Todas las variables fueron sometidas a pruebas de normalidad (test Shapiro-Wilk) para determinar la distribución de los datos. La frecuencia alélica de cada polimorfismo fue evaluada en cada grupo utilizando la prueba Chi cuadrado conforme a las proporciones de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg. Se realizó un análisis multivariado de regresión logística para calcular el riesgo independiente de presentar EVC isquémica expresada con la razón de momios, incluyendo en el modelo como variables independientes las variables clínicas y los polimorfismos que resultaron con significación estadística en el análisis univariado. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa un valor de $p \leq 0,05$. Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

Resultados

Se incluyeron 251 pacientes de edad ≤ 45 años con diagnóstico de EVC isquémico, en un periodo de 8 años, de 2006 a 2014. Se excluyeron 33 pacientes por presentar: deficiencia de proteína S (n=7), deficiencia de proteína C (n=1), anticuerpos anticardiolipinas (n=15), anticoagulante lúpico (n=6), resistencia adquirida a la proteína C activada (n=4), deficiencia de antitrombina (n=1) y 14 pacientes por hemorragia cerebral. La muestra analizada estuvo constituida por 204 pacientes jóvenes con EVC isquémica de origen idiopático y 204 controles pareados por edad y sexo. En la [tabla 2](#) se muestran las características clínicas y demográficas del grupo de casos y controles. En el grupo de casos la edad promedio fue de $34,1 \pm 5,4$ años, predominando el sexo femenino en el 58,3% (n=119), con un IMC de $30,9 \pm 2,6$ kg/m². Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales por orden de frecuencia fueron: dislipidemia en 42,6% (n=87), tabaquismo en 25,5% (n=52), AHFEAT en 24% (n=49), HAS en 13,2% (n=27) y DM2 en 8,8% (n=18). Se observó una mayor frecuencia de HAS (13,2% vs. 6,7%, $p=0,03$), tabaquismo (25,5% vs. 16,9%, $p=0,02$) y AHFEAT (24% vs. 13,7%, $p=0,02$) en el grupo de casos vs. controles. No hubo diferencia estadística para las variables edad, sexo, IMC, dislipidemia y DM2 entre ambos grupos.

La [tabla 3](#) muestra la distribución genotípica de los polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr, 4G/5G, PLA1/A2, Glu298Asp y C677T en el grupo de casos y controles.

Tabla 2 Características clínicas y demográficas de 204 pacientes de edad ≤ 45 años con EVC de tipo isquémica idiopática y 204 controles

Variable	Casos n = 204	Controles n = 204	Valor de p
Edad, años $\pm$ DE	34,1 $\pm$ 5,4	33,5 $\pm$ 6,1	NS
Mujeres, n (%)	119 (58,3)	120 (58,8)	NS
IMC, kg/m ² $\pm$ DE	30,9 $\pm$ 2,6	29,3 $\pm$ 1,7	NS
Dislipidemia, n (%)	87 (42,6)	91 (44,5)	0,70
HAS, n (%)	27 (13,2)	14 (6,7)	0,03
DM2, n (%)	18 (8,8)	11 (5,4)	0,18
Tabaquismo, n (%)	52 (25,5)	33 (16,9)	0,02
AHF de EAT, n (%)	49 (24,0)	26 (13,7)	0,02

AHF de EAT: antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HAS: hipertensión arterial sistémica; IMC: índice de masa corporal; NS: no significativa.

Tabla 3 Distribución genotípica de los polimorfismos Ala147Thr, Thr325Ile, 4G/5G, PLA1/A2, Glu298Asp y C677T en 204 pacientes de edad ≤ 45 años con EVC isquémica idiopática y 204 controles

Locus	Genotipo	Casos n = 204	Controles n = 204	Valor de p*
Thr147Ala TAFI	Ala/Ala	109 (53,4)	95 (46,6)	0,09
	Thr/Ala	84 (41,2)	91 (44,6)	
	Thr/Thr	11 (5,4)	18 (8,8)	
	Thr/Thr+Thr/Ala vs. Ala/Ala	95 vs. 109 (46,6 vs. 53,4)	109 vs. 95 (53,4 vs. 46,6)	0,16
Thr325Ile TAFI	Thr/Thr	132 (64,7)	143 (70,1)	0,23
	Thr/Ile	65 (31,8)	56 (27)	
	Ile/Ile	7 (3,5)	5 (2,9)	
	Thr/Thr vs. Thr/Ile+Ile/Ile	132 vs. 72 (64,7 vs. 35,3)	143 vs. 61 (70,1 vs. 29,9)	0,24
–675 4G/5G PAI-1	4G/4G	23 (11,3)	16 (7,8)	0,40
	4G/5G	94 (46,1)	87 (42,6)	
	5G/5G	87 (42,6)	101 (49,6)	
	4G/4G+4G/5G vs. 5G/5G	117 vs. 87 (57,4 vs. 42,6)	103 vs. 101 (50,4 vs. 49,6)	0,14
PLA1/A2 subunidad IIIa de la GP	A1/A1	167 (83,5)	164 (82)	0,61
	A1/A2	32 (16)	36 (18)	
	A2/A2	1 (0,5)	0 (0)	
	A1/A2+A2/A2 vs. A1/A1	33 vs. 167 (83,5 vs. 16,5)	33 vs. 164 (82 vs. 18)	0,69
Glu298Asp eNOS	Glu/Glu	107 (52,4)	146 (71,6)	0,001
	Glu/Asp	86 (42,2)	52 (25,5)	
	Asp/Asp	11 (5,4)	6 (2,9)	
	Glu/Glu vs. Glu/Asp+Asp/Asp	107 vs. 97 (52,4 vs. 47,6)	146 vs. 58 (71,6 vs. 28,4)	0,001
C677T MTHFR	C/C	35 (19,7)	60 (32,8)	0,01
	C/T	105 (60)	83 (45,4)	
	T/T	38 (20,3)	40 (21,8)	
	CC vs. CT+TT	35 vs. 143 (19,7 vs. 80,3)	60 vs. 123 (32,8 vs. 67,2)	0,001

eNOS: enzima óxido nítrico sintasa endotelial; GP IIb/IIIa: glucoproteína plaquetaria IIb/IIIa; 5,10 MTHFR: 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno tisular tipo-1; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

* Prueba Chi cuadrado.

En la [tabla 4](#) se muestra la frecuencia alélica de los polimorfismos Thr325Ile, Ala147Thr, 4G/5G, PLA1/A2, Glu298Asp y C677T en el grupo de casos y controles.

Se identificó como factor de riesgo independiente al alelo 298Asp ($p=0,03$), T ($p=0,01$), hipertensión ($p=0,03$), tabaquismo ($p=0,01$) y AHFEAT ($p=0,04$) ([tabla 5](#)).

Discusión

En el presente estudio se analizaron 6 diferentes polimorfismos localizados en genes que codifican proteínas del sistema fibrinolítico, y relacionados con la disfunción endotelial e hiperagregabilidad plaquetaria.

Tabla 4 Frecuencia alélica de los polimorfismos Ala147Thr, Thr325Ile, 4G/5G, PLA1/A2, Glu298Asp y C677T en 204 pacientes de edad ≤ 45 años con EVC de tipo isquémico idiopático y 204 controles

Locus	Alelo	Casos n = 204	Controles n = 204	Valor de p
Ala147Thr	Ala	302 (74,0)	281 (68,9)	0,10
TAFI	Thr	106 (26)	127 (31,1)	
Thr325Ile	Thr	329 (80,6)	342 (83,8)	0,21
TAFI	Ile	79 (19,4)	66 (16,2)	
–675	4G	140 (34,35)	119 (29)	0,13
4G/5G	5G	268 (65,65)	289 (71)	
PAI-1/A2 subunidad IIIa de la GP	PLA1	366 (91,5)	364 (91)	0,80
	PLA2	34 (8,5)	36 (9)	
Glu298Asp	Glu	300 (73,5)	344 (84,35)	0,001
eNOS	Asp	108 (26,5)	64 (15,65)	
C677T	C	175 (49,7)	203 (55,5)	0,09
MTHFR	T	181 (50,3)	163 (44,5)	

eNOS: enzima óxido nítrico sintasa endotelial; GP IIb/IIIa: glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa; 5,10 MTHFR: 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa; PAI-1: inhibidor del activador de plasminógeno tisular tipo-1; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina.

*Prueba Chi cuadrado.

Tabla 5 Análisis multivariado de regresión logística considerando a la EVC isquémica como variable dependiente

Factor de riesgo	Razón de momios (IC 95%)	Valor de p
Glu298Asp	1,4 (1,0-3,8)	0,02
C677T	2,3 (1,3-4,2)	0,001
HAS	2,7 (1,2-4,6)	0,03
Tabaquismo	2,4 (1,1-4,5)	0,01
AHF de EAC	1,6 (1,3-2,7)	0,04

AHF de EAT: antecedente heredofamiliar de enfermedad aterotrombótica; HAS: hipertensión arterial sistémica.

Se ha asociado el aumento en la concentración plasmática de TAFI a un mayor riesgo y severidad de EVC isquémico^{19–21}. Aunque los niveles plasmáticos de TAFI están determinados al menos en un 25% por diversos polimorfismos ubicados en el gen CPB2²², el efecto de los polimorfismos Thr325Ile y Ala147Thr en el incremento del riesgo cardiovascular no es concluyente²³. En el presente estudio los polimorfismos Ala147Thr y Thr325Ile del gen de TAFI no se asociaron con la presencia de EVC isquémico (genotipo $p=0,09$ y frecuencia alélica $p=0,10$; y genotipo $p=0,23$ y frecuencia alélica $p=0,21$, respectivamente) en jóvenes de edad ≤ 45 años. Resultados negativos también fueron reportados por Ladenvall et al. en sujetos < 70 años de edad con EVC isquémico²⁴, y por Akatsu et al. en 253 pacientes con una edad promedio de 80 años²⁵. En contraste, Kozian et al., en una cohorte > 3.300 individuos, demostraron una asociación entre el genotipo homocigoto Ile del gen de TAFI con una mayor incidencia de EVC isquémica prematura, pero no para el polimorfismo Ala147Thr²⁶. La EVC isquémica posee un espectro clínico y etiológico altamente heterogéneo, la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales y ambientales varía en distintas poblaciones, así como el trasfondo genético entre distintos grupos étnicos. La combinación específica entre factores de riesgo genéticos y ambientales en las diferentes etapas de la vida probablemente determine el desarrollo y la edad de presentación de EVC isquémica²⁷, explicando en parte la inconsistencia de los resultados.

El rol del PAI-1 en la fisiopatología de la EVC isquémica es más complejo en comparación con el de otras enfermedades tromboticas, como el infarto de miocardio. Aunque el PAI-1 promueve la aterosclerosis y es considerado el principal inhibidor de la fibrinólisis, paradójicamente su expresión por los astrocitos del parénquima cerebral es un factor protector contra la lesión de la barrera hematoencefálica por tPA, el edema cerebral y la transformación hemorrágica de la zona de infarto^{28,29}. Estudios recientes sugieren que el alelo 4G del gen del PAI-1 tiene un efecto neuroprotector para EVC isquémica, y de riesgo para infarto de miocardio³⁰. Sin embargo, la distribución genotípica del polimorfismo 4G/5G en distintas áreas geográficas alrededor del mundo es muy variable, tanto en sujetos sanos como en pacientes con EVC isquémica (del 28% al 90% para el heterocigoto 4G/5G)³¹. En nuestra muestra ni el genotipo ($p=0,40$) ni la frecuencia alélica ($p=0,13$) con el alelo de riesgo 4G del gen que codifica a PAI-1 se asoció con la presencia de EVC isquémica en sujetos jóvenes mexicanos de edad ≤ 45 años. En contraste, Ranellou et al. reportaron una frecuencia mayor del genotipo heterocigoto 4G/5G en sujetos griegos con EVC de edad < 50 años vs. controles ($p=0,02$)³¹. Hu et al., en un metaanálisis que incluyó 8.336 casos y 14.403 controles, identificó al homocigoto 4G/4G como factor de riesgo para EVC isquémico³². Por otra parte, nuestro grupo de investigación ha identificado un incremento en los niveles séricos de PAI-1 en pacientes jóvenes con EVC isquémico. Se han observado niveles más elevados de PAI-1 en sujetos con EVC

isquémico en fase aguda en comparación con sujetos convalcientes y en fase crónica³³. En ratones con oclusión transitoria la arteria cerebral media, la inhibición de TAFI y PAI-1 por anticuerpos monoclonales disminuyó significativamente la formación de fibrina y el tamaño del infarto cerebral en un 50%³⁴. La evidencia sugiere que el PAI-1 tiene un efecto dual en la fisiopatología del EVC isquémico, interviniendo en el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica, pero también como neuroprotector, limitando la severidad de la lesión.

En nuestra muestra el polimorfismo Leu33Pro en el gen que codifica a la subunidad IIIa de la GP no se asoció con la presencia de EVC isquémico (genotipo $p=0,61$ y frecuencia alélica $p=0,80$) en jóvenes de edad ≤ 45 años. Resultados similares fueron reportados por Van Goor et al., al no encontrar asociación entre el alelo PLA2 con la presencia de EVC criptogénico en 80 pacientes de edad ≤ 45 años³⁵. Sin embargo, demostró una interacción entre el genotipo PLA1/A2 y el antecedente de tabaquismo en un subgrupo de pacientes de 55 a 69 años de edad con EVC lacunar ($p=0,024$)³⁶. En nuestro estudio el antecedente de tabaquismo se presentó con mayor frecuencia en el grupo de casos vs. controles ($p=0,02$). Se ha observado en pacientes con EVC isquémico con el genotipo heterocigoto PLA1/A2 un incremento en la agregación plaquetaria, en la expresión del receptor GP IIb/IIIa y en su capacidad de unión al fibrinógeno, en comparación con aquellos sujetos con el genotipo PLA1/A1 en estudios *in vitro*³⁷. Esta variabilidad de los resultados entre diferentes estudios pudiera deberse a la interacción entre diversos factores ambientales y genéticos. Se requieren más estudios que evalúen la interacción entre el tabaquismo, las concentraciones séricas de fibrinógeno y polimorfismos en genes que codifican receptores plaquetarios.

En el presente estudio el polimorfismo Glu298Asp del gen de eNOS se asoció con la presencia de EVC isquémico en sujetos jóvenes mexicanos de edad ≤ 45 años (genotipo $p=0,001$ y frecuencia alélica $p=0,001$, respectivamente). Kumar et al., en un estudio de casos y controles, identificaron el polimorfismo Glu298Asp como factor de riesgo para EVC isquémica en sujetos del norte de la India ($p=0,028$)³⁸. En un metaanálisis que incluyó un total de 6.733 casos y 7.305 controles se observó una asociación significativa ($p<0,001$) del polimorfismo Glu298Asp con la presencia de EVC isquémico³⁹.

La homocisteína es un aminoácido formado durante el metabolismo de la metionina; el incremento en sus concentraciones plasmáticas se ha asociado a disfunción del metabolismo cerebral, y es considerado un factor de riesgo independiente de EVC isquémico⁴⁰. En el presente estudio se asoció al genotipo homocigoto TT y heterocigoto CT del polimorfismo C677T en el gen de la 5,10 MTHFR con la presencia de EVC isquémica en sujetos jóvenes mexicanos de edad ≤ 45 años ($p=0,01$). Jiang et al., en una cohorte de 39.165 individuos, identificaron 251 casos de EVC isquémica en un periodo de 6,2 años; aquellos sujetos con HAS y el genotipo TT presentaron un mayor riesgo de desarrollar EVC con una razón de momios $=10,6$ ⁴¹. En contraste, Ranellou et al. no observaron diferencia significativa en la frecuencia alélica del polimorfismo C677T en pacientes griegos de edad < 50 años con EVC isquémico vs. controles ($p=0,78$)³¹.

Un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación identificó un incremento significativo ($p<0,001$) en los niveles séricos de homocisteína posterior a una carga oral de metionina en un grupo de pacientes jóvenes con EVC isquémica vs. controles⁴².

La inconsistencia de los resultados entre los diferentes estudios sugiere que los pacientes con EVC isquémica poseen un genotipo cerebrovascular complejo; se necesita de una cuidadosa estratificación etiológica de los pacientes, estudios epidemiológicos en poblaciones más grandes, una detallada evaluación funcional de la variante genética, y de la validación de los resultados en diferentes grupos étnicos para determinar el rol exacto de estos genes en el desarrollo de EVC isquémica⁴³.

En relación con los factores de riesgo modificables pudimos identificar la hipertensión, el tabaquismo y la historia familiar de enfermedad arterial cerebral como factores de riesgo independiente para EVC isquémica en este grupo de pacientes.

Algunas fortalezas del estudio son: 1) los grupos de estudio fueron pareados por edad y sexo, 2) la edad se limitó a ≤ 45 años para minimizar el efecto del tiempo de exposición a los factores de riesgo tradicionales; y 3) se analizaron 6 polimorfismos en 5 genes candidatos del sistema hemostático en un mismo individuo. Las limitantes del estudio fueron la falta de medición de los niveles séricos de TAFI, óxido nítrico y pruebas de agregometría.

De acuerdo con los resultados obtenidos proponemos a los polimorfismos Glu298Asp y C677T de los genes que codifican a la enzima eNOS y 5,10 MTHFR, respectivamente, como posibles factores de riesgo de EVC isquémico. Los resultados sugieren como mecanismo fisiopatológico implicado la disfunción endotelial. Se requiere de más estudios en el futuro que exploren los mecanismos tromboticos del paciente con EVC idiopático, y esperar si nuestros resultados son consistentes en otras poblaciones.

Financiación

El proyecto fue financiado por los apoyos económicos del CONACyT Fondo Sectorial de investigación en Salud y Seguridad Social (No.261887) (FIS/IMSS/PROT/PRI0/13/023) (FIS/IMSS/PROT/G13/1195) (FIS/IMSS/PROT/G16/1616) del Fondo de Investigación en Salud IMSS y la Fundación IMSS.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Wendelboe AM, Raskob GE. Global burden of thrombosis: Epidemiologic aspects. *Circ Res*. 2016;118:1340–7.
2. Bang OY, Ovbiagele B, Kim JS. Nontraditional risk factors for ischemic stroke: An update. *Stroke*. 2015;46:3571–8.
3. Putaala J, Metso AJ, Metso TM, Konkola N, Kraemer Y, Haapaniemi E, et al. Analysis of 1008 consecutive patients aged 15

- to 49 with first-ever ischemic stroke: The Helsinki young stroke registry. *Stroke*. 2009;40:1195–203.
4. Ferro JM, Massaro AR, Mas JL. Aetiological diagnosis of ischaemic stroke in young adults. *Lancet Neurol*. 2010;9:1085–96.
5. Isordia-Salas I, Mendoza-Valdez AL, Almeida-Gutiérrez E, Borrayo-Sánchez G. Factores genéticos del sistema hemostático en pacientes jóvenes con infarto agudo de miocardio. *Cir Cir*. 2010;78:93–7.
6. Nesheim M, Bajzar L. The discovery of TAFI. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2139–46.
7. Brouwers GJ, Vos HL, Leebeek FW, Bulk S, Schneider M, Boffa M, et al. A novel, possibly functional, single nucleotide polymorphism in the coding region of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene is also associated with TAFI levels. *Blood*. 2001;98:1992–3.
8. Schneider M, Boffa M, Stewart R, Rahman M, Koschinsky M, Nesheim M. Two naturally occurring variants of TAFI (Thr-325 and Ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. *J Biol Chem*. 2002;277:1021–30.
9. Henry M, Aubert H, Morange PE, Nanni I, Alessi MC, Tiret L, et al. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: Evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. *Blood*. 2001;97:2053–8.
10. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342:1792–801.
11. Sobel BE. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and vasculopathy. A reconcilable paradox. *Circulation*. 1999;99:2496–8.
12. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. *Circulation*. 1999;99:E1–11.
13. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens PLA1 and PLA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*. 1989;83:1778–81.
14. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med*. 1996;47:365–75.
15. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993;268:17478–88.
16. Naber CK, Baumgart D, Altmann C, Siffert W, Erbel R, Heusch G. eNOS 894T allele and coronary blood flow at rest and during adenosine-induced hyperemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H1908–12.
17. Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nutr Genet*. 1995;10:111–3.
18. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial: TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35–41.
19. Montaner J, Ribó M, Monasterio J, Molina CA, Alvarez-Sabín J. Thrombin-activable fibrinolysis inhibitor levels in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:1038–40.
20. Leebeek FW, Goor MP, Guimaraes AH, Brouwers GJ, Maat MP, Dippel DW, et al. High functional levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2211–8.
21. Ladvall C, Gils A, Jood K, Blomstrand C, Declercq PJ, Jern C. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:955–62.
22. de Bruijne EL, Gils A, Guimaraes AH, Dippel DW, Deckers JW, van den Meiracker AH, et al. The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: The ATTAC study. *J Thromb Haemost*. 2009;7:919–27.
23. Shi J, Zhi P, Chen J, Wu P, Tan S. Genetic variations in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor gene and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Thromb Res*. 2014;134:610–6.
24. Leebeek FW, Goor MP, Guimaraes AH, Brouwers GJ, Maat MP, Dippel DW, et al. High functional levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor are associated with an increased risk of first ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2005;3:2211–8.
25. Akatsu H, Yamagata H, Chen Y, Miki T, Kamino K, Takeda M, et al. TAFI polymorphisms at amino acids 147 and 325 are not risk factors for cerebral infarction. *Br J Haematol*. 2004;127:440–7.
26. Kozian DH, Lorenz M, März W, Cousin E, Mace S, Deleuze JF. Association between the Thr325Ile polymorphism of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and stroke in the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Thromb Haemost*. 2010;103:976–83.
27. You RX, McNeil JJ, O'Malley HM, Davis SM, Thrift AG, Donnan GA. Risk factors for stroke due to cerebral infarction in young adults. *Stroke*. 1997;28:1913–8.
28. Aburto-Mejía E, Santiago-Germán D, Martínez-Marino M, Galván-Plata ME, Almeida-Gutiérrez E, López-Alarcón M, et al. Hypofibrinolytic state in subjects with type 2 diabetes mellitus aggravated by the metabolic syndrome before clinical manifestations of atherothrombotic disease. *Biomed Res Int*. 2017;2017, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6519704>.
29. Tjærnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases. *Stroke*. 2012;43:2833–9.
30. Bentley P, Peck G, Smeeth L, Whittaker J, Sharma P. Causal relationship of susceptibility genes to ischemic stroke: Comparison to ischemic heart disease and biochemical determinants. *PLoS One*. 2010;5:e9136, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009136>.
31. Ranellou K, Paraskeva A, Kyriazopoulos P, Batistatou A, Evangelou A, El-Aly M, et al. Polymorphisms in prothrombotic genes in young stroke patients in Greece: A case-controlled study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26:430–5.
32. Hu X, Zan X, Xie Z, Li Y, Lin S, Li H, et al. Association between plasminogen activator inhibitor-1 genetic polymorphisms and stroke susceptibility. *Mol Neurobiol*. 2017;54:328–41.
33. Brouns R, Heylen E, Willemse JL, Sheorajpanday R, de Surge-loose D, Verkerk R, et al. The decrease in procarboxypeptidase U (TAFI) concentration in acute ischemic stroke correlates with stroke severity, evolution and outcome. *J Thromb Haemost*. 2010;8:75–80.
34. Denome F, Wyseure T, Peeters M, Vandeputte N, Gils A, Deckmyn H, et al. Inhibition of thrombin-activable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 reduces ischemic brain damage in mice. *Stroke*. 2016;47:2419–22.
35. Van Goor ML, Gómez García E, Brouwers GJ, Leebeek FW, Koudstaal PJ, Dippel DW. PLA1/A2 polymorphism of the platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa in young patients with cryptogenic TIA or ischemic stroke. *Thromb Res*. 2002;108:63–5.
36. Oksala NK, Heikkinen M, Mikkelsen J, Pohjasvaara T, Kaste M, Erkinjuntti T, et al. Smoking and the platelet fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa PLA1/A2 polymorphism interact in the risk of lacunar stroke and midterm survival. *Stroke*. 2007;38:50–5.
37. Pongrácz E, Schweitzer K, Furész J, Fent J, Tordai A, Nagy Z. The effects of platelet receptor GPIIb/IIIa polymorphism (Leu Pro33) on the receptor expression and platelet aggregation in patients with ischaemic stroke. *Turk J Haematol*. 2007;24:155–63.
38. Kumar A, Misra S, Kumar P, Sagar R, Prasad K, Pandit AK, et al. Association between Endothelial nitric oxide synthase G894T

- gene polymorphism and risk of ischemic stroke in North Indian population: A case-control study. *Neurol Res.* 2016;38:575–9.
39. Kumar A, Misra S, Kumar P, Prasad K, Pandit AK, Chakravarty K, et al. Association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of ischemic stroke: A meta-analysis. *Neurol India.* 2017;65:22–34.
40. Miao Y, Liao JK. Potential serum biomarkers in the pathophysiological processes of stroke. *Expert Rev Neurother.* 2014;14:173–85.
41. Jiang S, Li J, Zhang Y, Venners SA, Tang G, Wang Y, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, hypertension and risk of stroke: A prospective, nested case-control study. *Int J Neurosci.* 2017;127:253–60.
42. Isordia-Salas I, Barinagarrementeria-Aldatz F, Leños-Miranda A, Borrayo-Sánchez G, Vela-Ojeda J, García-Chávez J, et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with idiopathic ischemic stroke in the young Mexican-Mestizo population. *Cerebrovasc Dis.* 2010;29:454–9.
43. Maasz A, Melegh B. Three periods of one and a half decade of ischemic stroke susceptibility gene research: Lessons we have learned. *Genome Med.* 2010;2:64, <http://dx.doi.org/10.1186/gm185>.