

**ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO, POLIMORFISMOS
GENÉTICOS Y ANCESTRÍA CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA
EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA-COLOMBIA**

Astrid Lorena Urbano Cano, Biol, MsC.

Tesis para Optar al Título de Doctora en Ciencias Biomédicas

**Doctorado en Ciencias Biomédicas
Código 9695
Escuela de Ciencias Básicas
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad del Valle
Cali
2017**

**ASOCIACIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO, POLIMORFISMOS
GENÉTICOS Y ANCESTRÍA CON ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA
EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA-COLOMBIA**

Astrid Lorena Urbano Cano, Biol, MsC.

**Carlos Hernán Sierra Torres, PhD, MBE.
Director**

**Adalberto Sánchez, PhD.
Asesor**

**Doctorado en Ciencias Biomédicas
Código 9695
Escuela de Ciencias Básicas
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad del Valle
Cali
2017**

Nota de aceptación:

Firma del jurado 1

Firma del jurado 2

Firma del jurado 3

Cuidad, Fecha: 20 de febrero de 2017

Dedicatoria

Con todo mi corazón A Dios, mis padres, hermana y demás familiares.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) quien financió esta investigación (No 110351929119). La Universidad del Cauca, la Vicerrectoría de Investigaciones y los Departamentos de Ciencias Fisiológicas, Ciencias Quirúrgicas y Medicina Interna de la Facultad de Ciencias de la Salud, al Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada (GIGHA), a mi tutor, el doctor Hernán Sierra, los docentes Sulma Muñoz, Rosa Alvarez, Patricia Acosta y Wilson Muñoz, quienes fueron partícipes de mi formación, a los investigadores Yexania Arboleda, Alejandra Dominguez, Eliana Portilla y Aldair Rosero por su amistad. A la Universidad del Valle donde cursé el doctorado y a mi co-tutor el doctor Adalberto Sanchez. Al Hospital Universitario San José y demás hospitales de los municipios del departamento del Cauca y por supuesto a las personas que aceptaron participar en el estudio.

Contenido

Resumen	1
Introducción	3
Objetivos	6
Capítulo I – Marco teórico	7
Epidemiología de la Enfermedad Arterial Periférica	8
Historia Natural de la EAP	8
Fisiopatología de la Enfermedad Arterial Periférica.....	9
Mecanismos de Formación de la Placa de Ateroma	10
Bibliografía	16
Capitulo II – Prevalencia de la Enfermedad Arterial Periférica	20
Introducción.....	21
Metodología.....	23
Resultados	27
Discusión.....	33
Bibliografía	36
Capitulo III – Factores de riesgo Cardiovascular asociados a la Enfermedad Arterial Periférica	39
Introducción.....	40
Metodología.....	43
Resultados	44
Discusión.....	48
Bibliografía	52

Capitulo IV – Ancestría y su asociación con la Enfermedad Arterial Periférica	56
Introducción.....	57
Metodología.....	59
Resultados	66
Discusión.....	75
Bibliografía	78
Capitulo V – Ancestría, polimorfismos genéticos y su asociación con la Enfermedad Arterial Periférica	82
Introducción.....	83
Metodología.....	92
Resultados	99
Discusion.....	108
Bibliografía	113
Capitulo VI – Conclusiones.....	122
Capitulo VII – Recomendaciones.....	125

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación Fontaine de la EAP	13
Tabla 2. Clasificación valores ITB.....	25
Tabla 3. Prevalencia de EAP	28
Tabla 4. Factores de Riesgo Cardiovascular para EAP	29
Tabla 5. Perfil Lipídico y odds ratio (95% IC) para EAP.....	30
Tabla 6. Interacción entre factores de riesgo y EAP	32
Tabla 7. Características Sociodemográficas de la Población de Estudio.	44
Tabla 8. Características Clínicas de Pacientes con EAP	45
Tabla 9. Factores de Riesgo Cardiovascular de la Población de Estudio	45
Tabla 10. Odds Ratio (95% CI) Factores de Riesgo Asociados con EAP	46
Tabla 11. Interacción entre factores de Riesgo y odds ratio (95% CIs) en pacientes con EAP	48
Tabla 12. Descripción de primers específicos para InDels	60
Tabla 13. Mezcla de reactivos para PCR.....	63
Tabla 14. Perfil térmico para PCR multiplex	63
Tabla 15. Equilibrio HWE.....	71
Tabla 16. Frecuencia InDels en individuos del departamento del Cauca	72
Tabla 17. Frecuencias de poblaciones ancestrales en casos y controles Caucanos	74
Tabla 18. Clasificación de Genes y SNPs asociados con a ECV y EAP	93
Tabla 19. Mix para TaqManSNP genotyping assay	95
Tabla 20. Fase de Amplificación de la PCR.....	95
Tabla 21. Indicador de lectura para las señales de fluorescencia.....	98
Tabla 22. Distribución de frecuencias de genotipo según Hardy-Weinberg.....	100
Tabla 23. Asociación alélica Simple.....	101
Tabla 24. Asociación del alelo de riesgo.....	102
Tabla 25. Asociación del alelo de riesgo con la ancestría	103
Tabla 26. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen MTHFR con EAP	104
Tabla 27. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen VEGF con EAP	105
Tabla 28. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen ICAM-1 con EAP	106
Tabla 29. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen NOS3 con EAP	107

Lista de Figuras

Figura 1. Inicio de la aterosclerosis precursora de EAP.	12
Figura 2. Cálculo del Índice Tobillo Brazo (ITB).....	14
Figura 3. Mapa de la prevalencia mundial de la EAP.	22
Figura 4. Criterios de Selección para el reclutamiento de individuos.....	23
Figura 5. Prevalencia de la enfermedad arterial periférica por grupos de edad.....	29
Figura 6. Frecuencia de factores de riesgo.....	31
Figura 7. Frecuencia de factores de riesgo de ECV en casos y controles.....	48
Figura 8. Mapa de la distribución ancestral del Departamento del Cauca:	66
Figura 9. Marcadores InDels M1 marcados con verde fluorescencia GFP	67
Figura 10. Marcadores InDels M1 marcados con fluorescencia Rojo Rodamina...68	
Figura 11. Marcadores InDels M2 marcados con verde fluorescencia.	69
Figura 12. Marcadores InDels M2 marcados con fluorescencia Rojo Rodamina...70	
Figura 13. Escala Multidimensional de distancias genéticas	72
Figura 14. Estimaciones de ascendencia individuales.....	73
Figura 15. Triángulo de la ancestría individual.....	73
Figura 16. Distribución Ancestral	75
Figura 17. Distribución de casos y controles según la ancestría	75
Figura 18. Gen <i>MTHFR</i>	84
Figura 19. Gen <i>NOS3</i>	85
Figura 20. Gen <i>SCARB1</i>	86
Figura 21. Gen <i>ApoA5</i>	86
Figura 22. Gen <i>IL6</i>	87
Figura 23. Gen <i>COX-2</i>	88
Figura 24. Gen <i>ICAM-1</i>	89
Figura 25. Gen <i>FGB</i>	89
Figura 26. Gen <i>F5</i>	90
Figura 27. Gen <i>VEGF</i>	90
Figura 28. Esquematización de la búsqueda electrónica.....	92
Figura 29. Pasos PCR.	96
Figura 30. Sonda TaqMan	97

Glosario

%: Porcentaje.

°C: Grado centígrado.

±: Más o menos.

>: Mayor que.

<: Menor que.

≥: Mayor o igual.

≤: Menor o igual.

μL: Microlitro.

μM: Micromolar.

χ²: Prueba de chi cuadrado.

5': Extremo 5' de la cadena de DNA.

3': Extremo 3' de la cadena de DNA.

Accidente Cerebrovascular: sucede cuando el flujo de sangre a una parte del cerebro se detiene al no recibir nutrientes ni oxígeno, las células cerebrales pueden morir, lo que causa daño permanente.

ADN: Acido Desoxirribonucleico, conocido como el material genético que contiene las instrucciones necesarias para el desarrollo y funcionalidad de los organismos.

AHA: Asociación Americana del Corazón por sus siglas en inglés, es el máximo referente científico en cardiología de Estados Unidos y el resto del mundo.

Alelo: formas alternativas de un gen que se diferencian en su secuencia.

Apolipoproteína: Es una proteína que contiene y transporta lípidos por el torrente sanguíneo.

Aterosclerosis: Depósito e infiltración de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias de mediano y grueso calibre, en forma de placas de ateroma, que origina una reacción inflamatoria y la proliferación de las células musculares lisas de la pared. Todo ello produce el estrechamiento de la luz arterial y la pérdida de elasticidad de las arterias.

Ateroma: Lesiones que se inician en la capa más interna de la arteria, con acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y migración de células inflamatorias.

Claudicación Intermittente: es el síntoma más común de la patología aterosclerótica, se caracteriza por dolor en los miembros inferiores.

DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística, que tiene como objetivo la difusión de estadísticas poblacionales, económicas e industriales en el territorio Colombiano.

Desnaturalización: ruptura por medios químicos o físicos de las interacciones no covalentes, como los enlaces de hidrógeno del ADN.

Diabetes Mellitus tipo 2: La diabetes mellitus tipo 2 es un trastorno metabólico que se caracteriza por hiperglucemia (nivel alto de azúcar en la sangre).

Dominante: El alelo que se expresa en el heterocigoto.

Enfermedad Arterial Periférica: Obstrucción aterosclerótica de arterias periféricas

Enfermedades Cardiovasculares: Se relaciona con todo tipo de enfermedades relacionadas con el corazón y los vasos sanguíneos cuyo origen puede ser aterosclerótico.

EC: Enfermedad Coronaria.

EDTA: Ácido etilen diamino tetra-acético.

EHW: Prueba de Equilibrio de Hardy Weinberg.

eNOS: Sintetasa de óxido nítrico endotelial.

EROS: Especies reactivas de oxígeno.

F_{ST} : Medida de diferenciación genética poblacional.

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

Hg: Mercurio.

HTA: Hipertensión.

IL-1: Interleuquina 1.

IL-6: Interleuquina 6.

IAM: Infarto Agudo de Miocardio.

ICAM-1: Molécula de Adhesión celular tipo 1.

ITB: Índice Tobillo Brazo.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad.

LOX-1: Receptor 1 de LDL oxidada.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos.

mg: Miligramo.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

mL: Mililitro.

mm: milímetros.

MMP-1: Metaloproteinasa-1.

NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa.

NO: Óxido Nítrico.

NaCl: Cloruro de Sodio.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

oxLDL: Proteína LDL oxidada

PA: Presión Arterial.

PAD: Presión Arterial Diastólica.

PAS: Presión Arterial Sistólica.

PGI: Prostaciclina .

PON-1: Paraoxonasa-1.

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta.

TNFα: Factor de necrosis tumoral alpha.

VCAM-1: Moléculas de adhesión vascular endotelial.

Resumen

Introducción: Las Enfermedades Cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en América Latina, mientras que la Enfermedad Arterial Periférica (EAP) es la tercera causa de morbilidad cardiovascular aterosclerótica. El hallazgo de los factores de riesgo, la interacción con polimorfismos y marcadores genéticos de ancestría, proporcionan información acerca de la etiología de la enfermedad.

Objetivo: Determinar la asociación entre factores de riesgo, ancestría y polimorfismos genéticos con EAP, en una población del departamento del Cauca.

Métodos: Se realizó un estudio de corte transversal en 10.000 sujetos ≥ 40 años de 36 municipios, a partir de esta población se tamizaron 500 casos y 500 controles (1:1) mediante el índice tobillo brazo, se tomaron datos epidemiológicos y una muestra de sangre periférica previa firma del consentimiento informado, posteriormente se calculó la razón de momios (Odds Ratio, OR), con intervalos de confianza del 95%, utilizando tablas de 2x2 y Chi-cuadrado para estimar significancia, en un modelo de regresión logística. Se utilizó como nivel de significancia un $p < 0.05$ y las pruebas estadísticas fueron de dos colas. Se utilizó El programa STRUCTURE v2.3.4 para determinar la mezcla ancestral de la población. Para los análisis genéticos se utilizaron los programas PLINK (Versión 1.07; <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>) y SNPAssoc del programa R versión 2.6.1.

Resultados: La prevalencia de EAP fue 4.4%; (4.7% en mujeres vs. 4.0% en hombres), siendo la diabetes el factor de riesgo más prevalente (23%). La EAP estuvo asociada con hipertensión (OR =4.6), diabetes (OR=4.3), dislipidemia (OR=3.1), obesidad (OR=1.8) y cigarrillo (OR=1.6). El análisis de interacción entre los factores de riesgo mostró que diabetes, dislipidemia y obesidad presentaron 13.2 veces más riesgo para EAP y cuando se agregó hipertensión al modelo, el riesgo fue el más alto (OR=17.2). En los casos y los controles, se observó un mayor porcentaje de mujeres con EAP (53,4%), respecto a los hombres (46,6%), el número de individuos con EAP se incrementó en el rango de 70 a 79 años de edad (43.25%). La proporción de pacientes según la Clasificación de Fontaine mostró que el 33% fueron asintomáticos y el síntoma más frecuente fue claudicación intermitente no limitante reportada por el 34,3% de los hombres y el 36% de las mujeres. Los resultados mostraron una base genética ancestral diversa, la cual fue 48% Nativos Americanos, el 39% Europeos y el 14% Africanos. Los polimorfismos de los genes *MTHFR* rs1801133 (OR=1,4), *VEGF* rs699947 (OR =2.7) y rs2010963 (OR=1,5), *NOS3* rs891512 (OR=1,7) e *ICAM-1* rs5498 (OR=2,1), fueron asociados con EAP. La ancestría amerindia se comportó como factor protector, mientras que la ancestría europea incrementó la asociación del polimorfismo rs1801133 del gen *MTHFR* (OR=1,5) y la ancestría africana se asoció con el polimorfismo rs2010963 el gen *VEGF* (OR=2,4). **Conclusiones:** La presencia de factores de riesgo como, hipertensión, diabetes, dislipidemia y cigarrillo, con variantes polimórficas de *MTHFR*, *VEGF*, *NOS3*, e *ICAM* en personas con ancestría africana y europea incrementaron el riesgo a EAP mientras que la ancestría amerindia se comportó con efecto protector para la enfermedad en el departamento del Cauca.

Palabras clave: Enfermedad arterial periférica; Índice tobillo-brazo; factores de riesgo; polimorfismos: ancestría.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular disease are the main cause of mortality in Latin America, and the Peripheral Artery Disease (PAD) is the third cause of cardiovascular morbidity. Assessing cardiovascular risk factors and the interaction between genetic polymorphisms and ancestry genetic markers, provide information regarding the etiology of the disease. **Aim:** To identify the association of risk factors, ancestry and genetic polymorphisms with PAD in a population from Department of Cauca, Colombia. **Methods:** We conducted a cross-sectional study including 10.000 subjects aged 40 years and over from 36 municipalities and we identified 500 PAD cases and 500 controls (1:1) by using ankle-brachial index as a screening method. We further collected epidemiological data and a blood samples from cases and controls. We conducted logistic regressions and determined associations based on Odds Ratios, considering 95% confidence intervals, and a significance threshold of $p < 0.05$ obtained from Chi-squared test. STRUCTURE v2.3.4 was used to determine the ancestry admixture of the study population. PLINK V1.07 and SNPAssoc, implemented in R v2.6.1, were used to perform genetic association analyses. **Results:** The prevalence of PAD was 4.4% (4.7% in women and 4% in men) and the most prevalent risk factor was diabetes (23%). PAD was associated with hypertension (OR=4.6), diabetes (OR=4.3), dyslipidemia (OR=3.1), obesity (OR=1.8) and smoking (OR=1.6). We found, based on the interaction analyses, diabetes, dyslipidemia and obesity showed 13.2 higher risk for PAD and the risk increased when hypertension was added to the model (OR=17.2). In the case-control study, we observed a higher prevalence of PAD in women (53.4%) compared to men (46.6%) and in the age group of 70-79 years (43.25%). According to the Fontaine Classification, we observed that 33% of the population were asymptomatic; on the other hand, a mild intermittent claudication was reported for 34.3% of men and 36% of women. Furthermore, the results showed a diverse admixture of ancestries composed by 48% of native American, 39% of European and 14% of African-Americans. In addition, we found significant association between PAD and genetic polymorphisms rs1801133 (OR=1.4), rs699947 (OR=2.7) and rs2010963 (OR=1.5), rs891512 (OR=1.7) and rs5498 (OR=2.1) located in *MTHFR*, *VEGF*, *NOS3* and *ICAM-1*, respectively. We identified a smaller ORs in the native-american population compared to Europeans where rs1801133 located in *MTHFR* showed an increased OR (OR=1.5) and African-americans where an OR=2.4 was identified for rs2010963 located in *VEGF*. **Conclusions:** risk factors including hypertension, diabetes dyslipidemia and smoking, as well as the presence of polymorphic genetic variants in *MTHFR*, *VEGF*, *NOS3*, and *ICAM* were associated with an increased PAD risk in African-American and European population from the Department of Cauca.

Key words: Peripheral artery disease, ankle-brachial index, risk factors, genetic polymorphisms, ancestry

Introducción

La enfermedad arterial periférica (EAP), después del infarto agudo miocardio (IAM) y el accidente cerebrovascular (ACV), es la tercera causa de morbilidad y mortalidad cardiovascular aterosclerótica en todo el mundo (1). La EAP en los países occidentales es responsable de la discapacidad y el deterioro funcional de quienes la padecen (2). Se calcula que 202 millones de personas en el mundo se ven afectadas por la enfermedad, de las cuales se espera que 45 millones mueran por enfermedad coronaria o cerebrovascular durante un período de 10 años (3). Aunque el número de individuos con EAP ha aumentado en la última década en un 28,7% en países de ingresos medianos o bajos, se han realizado pocos estudios epidemiológicos para establecer estimaciones confiables de prevalencia y distribución de factores de riesgo; especialmente en América Latina, donde las enfermedades cardiovasculares (ECV) se han convertido en la principal causa de muerte y discapacidad (4).

En sujetos con EAP sin sintomatología, la incidencia de mortalidad cardiovascular es del 0,5% en controles y del 2,5% en individuos con EAP, adicionalmente si llegasen a existir antecedentes de ECV, como lo es la enfermedad coronaria, el tener EAP incrementaría el riesgo de muerte en un 25% (5). Por todo esto es importante la tamización de la EAP mediante la implementación de la prueba índice tobillo brazo (ITB) en pacientes asintomáticos, incluso, para controlar precozmente los factores de riesgo y reducir la mortalidad (6). En Colombia, las ECV tienen una tasa de mortalidad de 107.3/100.000 hombres y 50.6/100.000 mujeres, por lo que la EAP también representa un problema de salud pública (7, 8). Sin embargo en Colombia y el departamento del Cauca aún no se han establecido datos claros acerca de la epidemiología de esta enfermedad, por tanto se hace necesario el esclarecimiento de los factores de riesgo cardiovascular asociados al desarrollo de la EAP.

La EAP, es una enfermedad multifactorial, resultado de la interacción de factores ambientales y genéticos. Esta enfermedad de base aterosclerótica se ha convertido en un interesante blanco de estudios genéticos a nivel mundial, lo cual ha permitido identificar las vías moleculares implicadas en cada estadio de la enfermedad y los diversos genes asociados, e incluso se ha logrado identificar como los factores de riesgo (potencialmente modificables como: dislipidemia, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y tabaquismo así como los no modificables edad, género, ancestría y susceptibilidad genética), pueden modular el efecto de estos genes, contribuyendo o protegiendo con el desarrollo de algunas ECV (9, 10).

En este trabajo de investigación, se pretenden identificar los factores de riesgo que disparan el inicio y la progresión de la enfermedad, así como los polimorfismos de genes asociados al desarrollo de EAP caracterizándolos a partir de las vías moleculares patológicas de la enfermedad, con el uso de biomarcadores, los cuales se han establecido como parámetros biológicos que aportan información de la

enfermedad en la población. Por último, se busca reconocer posibles asociaciones con los marcadores moleculares de ancestría y así llenar vacíos de conocimiento y brindar perspectivas de investigación futuras y de esta forma tratar de elucidar la etilogía de la enfermedad en el departamento del Cauca, para poder establecer mecanismos de prevención y diagnóstico de la EAP.

Teniendo en cuenta lo anterior, este estudio pretende responder, entre otras, las siguientes preguntas de investigación:

- 1) ¿Existe asociación entre factores de riesgo, ancestría y polimorfismos genéticos con enfermedad arterial periférica, en una población del departamento del Cauca, comparados con el grupo control?
- 2) Cuáles factores de riesgo cardiovasculares incrementan el desarrollo de enfermedad arterial periférica en el departamento del Cauca?
- 3) La asociación de factores de riesgo y polimorfismos genéticos, es modulada por la ancestría de tres poblaciones continentales que hoy conocemos, como europeos, amerindios y africanos?

Bibliografía

1. Fowkes DR, I. "Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. The Lancet. 2013;382:1329–440.
2. de Franciscis S, Metzinger L, Serra R. The Discovery of Novel Genomic, Transcriptomic, and Proteomic Biomarkers in Cardiovascular and Peripheral Vascular Disease: The State of the Art. BioMed Research International. 2016;2016.
3. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. The Lancet. 2013;382:1329-40.
4. Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, et al. Risk Factors for Acute Myocardial Infarction in Latin America The INTERHEART Latin American Study. Circulation. 2007;115:1067-74.
5. Hernando FJS, Conejero AM. Enfermedad arterial periférica: aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. Revista española de cardiología. 2007;60:969-82.
6. Norgren L HW, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA,. TASC II Working Group. Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg. 2007;33:75.
7. Gómez JE. Cardiovascular morbidity and mortality in the world. Revista Colombiana de Cardiología. 2012;19:298-9.
8. Cantú-Brito C, Chiquete E, Duarte-Vega M, Rubio-Guerra A, Herrera-Cornejo M, Nettel-García J. Estudio multicéntrico INDAGA. Índice tobillo-brazo anormal en población mexicana con riesgo vascular. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2011;49:239-46.
9. Toth P. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. International journal of clinical practice. 2008;62:1246-54.
10. Díaz Campos A. Fisiopatología de la aterosclerosis:[revisión]. Acta neurol colomb. 2010;26:4-15.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la asociación entre factores de riesgo, ancestría y polimorfismos genéticos con enfermedad arterial periférica, en una población del departamento del Cauca.

Objetivos específicos

- 1** Determinar la prevalencia de la enfermedad arterial periférica en una población del departamento del Cauca.
- 2** Identificar las características sociodemográficas y los factores de riesgo cardiovasculares de un estudio caso-control, en una población del departamento del Cauca.
- 3** Caracterizar la composición genética ancestral (Europea, Amerindia y Africana) de una población del departamento del Cauca y establecer su asociación con enfermedad arterial periférica.
- 4** Determinar la asociación de la enfermedad arterial periférica con factores de riesgo, polimorfismos genéticos implicados en estrés oxidativo (*MTHFR*, *NOS3*), metabolismo lipídico (*SCARB1*, *apoA5*), respuesta inflamatoria (*IL6*, *COX-2*, *ICAM-1*), coagulación (*FGB*, *F5*), angiogénesis (*VEGF*) y la ancestría en una población del departamento del Cauca.

Capítulo I – Marco teórico

Epidemiología de la Enfermedad Arterial Periférica

A nivel mundial más de 200 millones de personas se encuentran afectadas por la EAP, de esta cifra mas de 27 millones de personas en Europa, Norteamérica y Latinoamérica se han identificado con esta patología (1). En el departamento del Cauca no se han realizado estudios contundetes acerca de la prevalencia, morbilidad y mortalidad de esta enfermedad.

La EAP es un fuerte predictor de la morbilidad y la mortalidad cardiovascular ocasionada por aterosclerosis (2, 3), alcanzando una mortalidad del 30% en un periodo de 5 años y del 50% en 10 años (4). La aparición de la EAP se incrementa con la edad y afecta a un 15-20% de los sujetos mayores de 70 años (5, 6). A esar de que a manifestación mas frecuente de la enfermedad es la cludicación intermitente (CI), del 70 al 80% de los individuos afectados se encuentran asintomáticos, siendo mas frecuente este signo en el género masculino respecto al femenino, por otra parte, el porcentaje restante requiere revascularización ó amputación (7).

Historia Natural de la EAP

La EAP se caracteriza por la presencia de una placa de ateroma compuesta de lípidos, células inflamatorias y tejido fibroso que ocasiona un estrechamiento progresivo de las paredes de arterias periféricas, lo cual conlleva a una disminución del flujo sanguíneo a las extremidades inferiores (8, 9). Los mecanismos implicados desde el inicio, progresión y complicaciones del proceso aterosclerótico implicado en la EAP, se encuentran mediados por la acción de factores de riesgo cardiovasculares. Actualmente, estos factores de riesgo son reconocidos como factores modificables y no modificables. Los principales factores de riesgo potencialmente modificables corresponden a: Diabetes mellitus (DM), hipertensión arterial (HTA), tabaquismo y dislipidemia. Igualmente, se ha reconocido la participación de otros factores, conocidos como no modificables, los cuales corresponden a la edad, antecedentes familiares de la enfermedad y patrones individuales de susceptibilidad genética (10).

En la última década a partir de estudios epidemiológicos se han determinado factores de riesgo cardiovasculares para EAP que son concordantes con los factores de riesgo para enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica (11, 12), donde se reconoce que la prevalencia de la EAP, tanto sintomática como asintomática, es levemente mayor en varones que en mujeres, además, la prevalencia en los varones es mayor en los grados de afectación más severa (isquemia crítica), lo anterior se da sobre todo en la población más joven, ya que en edades muy avanzadas prácticamente no se alcanzan diferencias entre ambos grupos (1, 13). Se estima por grupos etarios que la prevalencia del principal síntoma de la EAP (CI) en sujetos entre 60 a 65 años es del 35%, mientras que en individuos de 70 s 75 años, se incrementa hasta alcanzar un 70% (6).

Por otra parte los consumidores activos de cigarrillo, tienen un mayor riesgo de desarrollar EAP, llegando incluso hasta la isquemia crítica de las extremidades (6), sin embargo el dejar de fumar produce la reducción en el riesgo de EAP (14). Si adicionalmente en la población afectada se desarrolla diabetes, la cuál es considerada, como uno de los factores de riesgo de mayor peso, esta podría estar presente hasta en el 41% (15). Es importante conocer que la diabetes mellitus tipo 2, cuando aumenta en un 1% la hemoglobina glucosilada, incrementa el riesgo en un 25% para EAP (16). En personas con diabetes, la afectación de las extremidades periféricas, condicionan un riesgo de amputación hasta 10 veces superior al de los pacientes no diabéticos (6). También es considerado que el riesgo de EAP es el doble en los pacientes hipertensos respecto al de los controles y que el incremento del colesterol total y el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) Vs el descenso del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL) se asocian con una mayor mortalidad cardiovascular (6).

Fisiopatología de la Enfermedad Arterial Periférica

La EAP es referida por lo general a la isquemia de los vasos de las extremidades inferiores (17). El Colegio Americano de Cardiología la clasifica como un trastorno clínico vascular aterosclerótico periférico (18), asociado a factores de riesgo cardiovascular (19, 20), los cuales facilitan el desarrollo de la aterosclerosis, por disminuir la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) en el endotelio vascular (21), promover la acumulación de lípidos y sobre-expresión de moléculas proinflamatorias, dando paso a una cascada inflamatoria en el interior del vaso, una vez las células inmunes como monocitos y macrófagos, ingresan a la arteria, se inicia una serie de eventos que incluye la internalización de partículas lipídicas en el macrófago y la formación de las células espumosas y estrías grasas (22). Posteriormente, la respuesta inflamatoria se agudiza y continúa la formación del núcleo lipídico y el desarrollo de la placa de ateroma, lo cual disminuye la capacidad de conducción del flujo, por lo que queda limitada la cantidad de sangre que llega a los tejidos (23). El proceso inflamatorio modula la sobre-expresión de mecanismos protrombóticos que actúan en respuesta a la ruptura o erosión de la placa aterosclerótica y desencadena eventos trombóticos o embólicos (24).

El proceso fisiopatológico principalmente implicado en EAP es la aterosclerosis, la cual es una condición inmuno-inflamatoria y fibro-proliferativa de las arterias que involucra procesos fisiológicos a nivel celular y molecular; donde las células endoteliales, lípidos, leucocitos y células musculares lisas de la íntima son los principales actores en el desarrollo de esta enfermedad (25). La aterosclerosis se describe en diferentes fases que explican los mecanismos de formación de la placa de ateroma.

Mecanismos de Formación de la Placa de Ateroma

Primera fase: Disfunción endotelial

Se inicia con el paso de la lipoproteína de baja densidad (LDL), a través de las células endoteliales disfuncionales y su entrada a la íntima arterial donde LDL se oxida (26), dando inicio a la disfunción del tejido endotelial arterial, en esta etapa el endotelio no mantiene el equilibrio homeostático vascular cuando se pierde ON, ocasionado por estrés oxidativo en las células endoteliales (27). El estrés oxidativo es promovido por la exposición a factores de riesgo cardiometabólicos, mientras esto ocurre se da la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno EROs, como por ejemplo el anión superóxido, que al interactuar con el ON elimina la acción del mismo (28). La sobreproducción de EROs inducen la expresión de moléculas de adhesión celular para receptores de linfocitos y monocitos, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y moléculas de adhesión vascular endotelial-1 (VCAM-1), lo que permite el reclutamiento de células inflamatorias y el depósito constante de lípidos en la capa íntima de la arteria (29).

Segunda Fase: Mecanismos inflamatorios y migración de los monocitos

Los fosfolípidos liberados de la oxidación del LDL activan el endotelio después de que se da la disfunción del tejido endotelial, proceso caracterizado por la expresión de moléculas inflamatorias que median la atracción de leucocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos, y células dendríticas) (30). Los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo deben establecer contacto con la pared vascular y adherirse a ella soportando fuerzas de cizallamiento para iniciar la respuesta inflamatoria (26). Una vez adheridos al endotelio, los leucocitos detectan la inflamación local y migran a la íntima arterial en respuesta a la acción de las quimiocinas MCP1, las cuales son proteínas quimio-atrayentes secretadas por plaquetas que favorecen el proceso de adhesión endotelial (31, 32).

Tercera fase: Formación de la estría grasa

La estría grasa es característica de la primera lesión aterosclerótica y se ocasiona por la acumulación de LDL oxidadas dentro de la íntima, se ve favorecida por una mayor permeabilidad de células endoteliales y por la unión de los componentes de la matriz extracelular conocidos como proteoglicanos y glicosaminoglicanos, lo que beneficia su retención, agregación e internalización en las células musculares lisas (33). Esta acumulación de LDL oxidadas estimula el ingreso de monocitos al espacio sub-endotelial de la arteria, lo que promueve la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el cual participa en la conversión de monocitos a macrófagos (34). Posteriormente los macrófagos fagocitan las LDL oxidadas, convirtiéndose en células espumosas cargadas de lípidos (lipidóforas), que aparecen histológicamente como una estría grasa, cuando las células espumosas mueren, liberan su contenido en lípidos creando un núcleo lipídico (26, 35).

Cuarta fase: Lesión fibrograsa

Las células musculares lisas proliferan y forman una capa fibrosa sobre el núcleo de lípidos (26). La transformación de las células musculares lisas productoras de la matriz extracelular, constituye un cambio fenotípico pues dejan de ser contráctiles, no proliferativas y empiezan a producir factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y citosinas como la interleuquina-1 (IL-1) (36). Todos estos cambios unidos a la acción del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB) en las células musculares lisas, promueven un fenotipo proliferativo y migratorio de la capa media de la arteria hacia la capa íntima, rodeando el núcleo lipídico necrótico y ocasionando que la estría grasa se convierta en una lesión fibrosa o fibroateroma característico de una lesión aterosclerótica (37). NFkB también promueve la expresión de metaloproteinasa-1 (MMP-1), potente collagenasa implicada en la degradación de colágeno, componente de la matriz extracelular, haciendo mucho más susceptible la formación de una placa aterosclerótica inestable.

Quinta fase: Evolución de ateroma

La evolución del ateroma puede ser atenuada por acción de la lipoproteína de alta densidad (HDL) en el transporte reverso de colesterol, que unido a la enzima paraoxonasa (PON1) eliminan los lipoperóxidos que participan en la formación de la placa. Si el anterior mecanismo no es óptimo más LDL se acumulan, la membrana elástica externa se expande en un esfuerzo para mantener el flujo de sangre. Eventualmente, la arteria no es capaz de compensar la placa y sobresale en el lumen, aumentando así tanto la resistencia como la rigidez; con el tiempo se da la ruptura de la placa, seguida por la liberación del trombo (26). Los productos de la coagulación sanguínea y la trombosis contribuyen a la evolución del ateroma y sus complicaciones (20). La trombina actúa suprimiendo péptidos de bajo peso molecular del fibrinógeno, dando formación a monómeros de fibrina que se aglomeran conformando y estabilizando el retículo del trombo.

Adicionalmente durante el proceso de mantenimiento del trombo se produce la inducción de moléculas protrombóticas como el factor tisular, citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF α) y neutrófilos activados. La producción de las anteriores moléculas, afectan las vías anticoagulantes naturales (antitrombina, el sistema de proteína C e inhibidores de la vía del factor tisular), las cuales son propias de un proceso hemostático sin alteraciones (38). Finalmente, si existe rotura del extremo fibroso de la placa, se produce trombosis originando oclusión arterial (39) Figura 1.

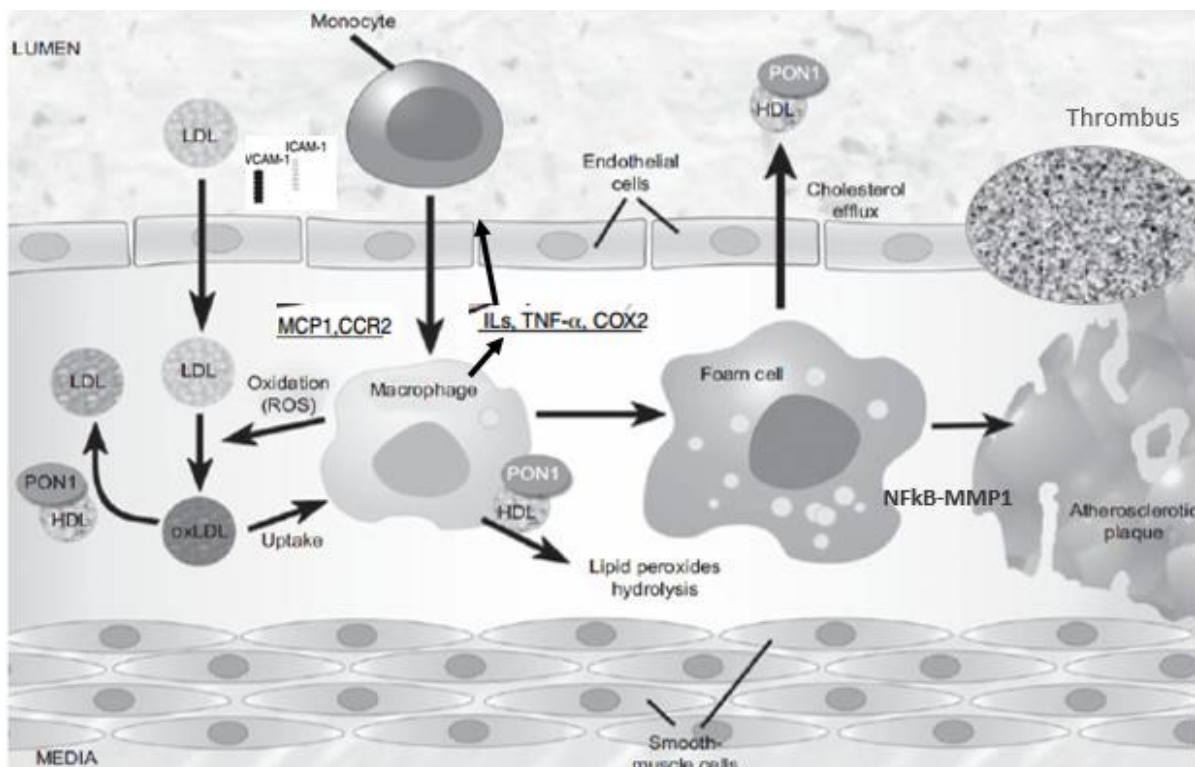


Figura 1. Inicio de la aterosclerosis precursora de EAP.

Los monocitos circulantes se activan, como consecuencia de un entorno pro-oxidativo y pro-inflamatorio, diferenciándose en macrófagos. Las partículas de LDL atraviesan la pared. Los macrófagos promueven la oxidación de LDL mediante la liberación de radicales libres. Las LDL oxidadas son fagocitadas por los macrófagos y contribuyen a su conversión en células espumosas. La acumulación progresiva de lípidos y el incremento en la respuesta inflamatoria determinan la formación y ruptura de la placa. CCR2: receptor de quimiocina, COX2: ciclo-oxigenasa 2, HDL: lipoproteína de alta densidad, ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1, ILs: interleuquinas, LDL: lipoproteína de baja densidad, MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1, PON- 1: paraoxanasa-1, TNF-: factor de necrosis tumoral, VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1. Modificado de Camps et al. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science, 2009; 46 (2): 83-106.

Dependiendo del grado de obstrucción del vaso, la sintomatología de los pacientes con insuficiencia arterial en las extremidades inferiores se estratifica en etapas clínicas: EAP asintomática, claudicación intermitente (CI) e isquemia crítica (40). En cuanto a la EAP asintomática es detectada únicamente por exploración física o pruebas diagnósticas como el ITB, que permite conocer el grado de obstrucción de la arteria (41).

A nivel de los miembros inferiores la aterosclerosis produce cambios que causan signos clínicos como la pérdida de pulso, disminución en el aporte de oxígeno a los

tejidos, dando como origen la aparición del síntoma más reconocido de la EAP, la CI (42, 43). La CI afecta los músculos de la pantorrilla, puede estar presente en sólo el 10% de los pacientes con EAP sintomática; por otra parte el 50% de los pacientes son asintomáticos, lo cual conduce a un sub-diagnóstico de la enfermedad. EAP se considera un predictor independiente de mortalidad cardiovascular (44) su presencia se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares, independientemente de su género o su forma clínica de presentación sintomática o asintomática. La CI se caracteriza por un dolor intenso en las piernas originado por el insuficiente abastecimiento de sangre y oxígeno a los músculos tras la actividad física, lo que obliga a parar el ejercicio y cede tras unos minutos de reposo (45).

La isquemia crítica, es una característica más avanzada de la enfermedad, se presenta cuando la reducción del flujo distal es tan grave que el paciente presenta dolor en reposo, en esta etapa puede darse la muerte celular que se traduce en necrosis tisular y un elevado riesgo de pérdida de la extremidad (42). Cuando la enfermedad progresa el paciente quizá sufra dolor en reposo o isquemia crítica de miembros, con una tasa mayor entre sujetos mayores a 70 años de edad, fumadores y diabéticos (46). La condición puede empeorar tras la isquemia crónica con dolor en reposo, úlceras o gangrena en una o ambas extremidades, atribuibles objetivamente a la enfermedad arterial oclusiva (47).

En 1954 Rene Fontaine generó una clasificación para la Arteriopatía de los miembros inferiores (48), la cual es relacionada a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación Fontaine de la EAP

Clasificación	Descripción
-Grado I	Arteriopatía asintomática presente (ITB<0.9), con obstrucción incompleta de los vasos sanguíneos.
-Grado IIa	Claudicación intermitente con dolor en el miembro inferior, a una distancia mayor de 200 metros.
-Grado IIb	Claudicación intermitente con dolor en el miembro inferior, a una distancia menor de 200 metros.
-Grado III	Dolor isquémico en reposo.
-Grado IV	Necrosis y gangrena del miembro.

EAP= Enfermedad arterial periférica, ITB= índice Tobillo Brazo

De acuerdo con las directrices actuales de la Asociación Americana del Corazón por sus siglas en inglés (AHA) y el Banco Interamericano de Sociedad Consenso para la Gestión de Enfermedad Arterial Periférica-TASC II, el Índice Tobillo Brazo (ITB) ha sido considerado un método de tamizaje gold standard para detección de

EAP, por su alta sensibilidad y especificidad, un ITB patológico tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 100% para la detección de lesiones con estenosis mayores a 50% en una o más arterias de una pierna (44). Para la medición se requiere de un Doppler, con una frecuencia de emisión entre 5 y 10 Mhz y un manguito de toma de presión manual (44) Figura 2.

ITB se define como confiable y no invasivo para la detección de la enfermedad, resulta de la siguiente división para cada extremidad:

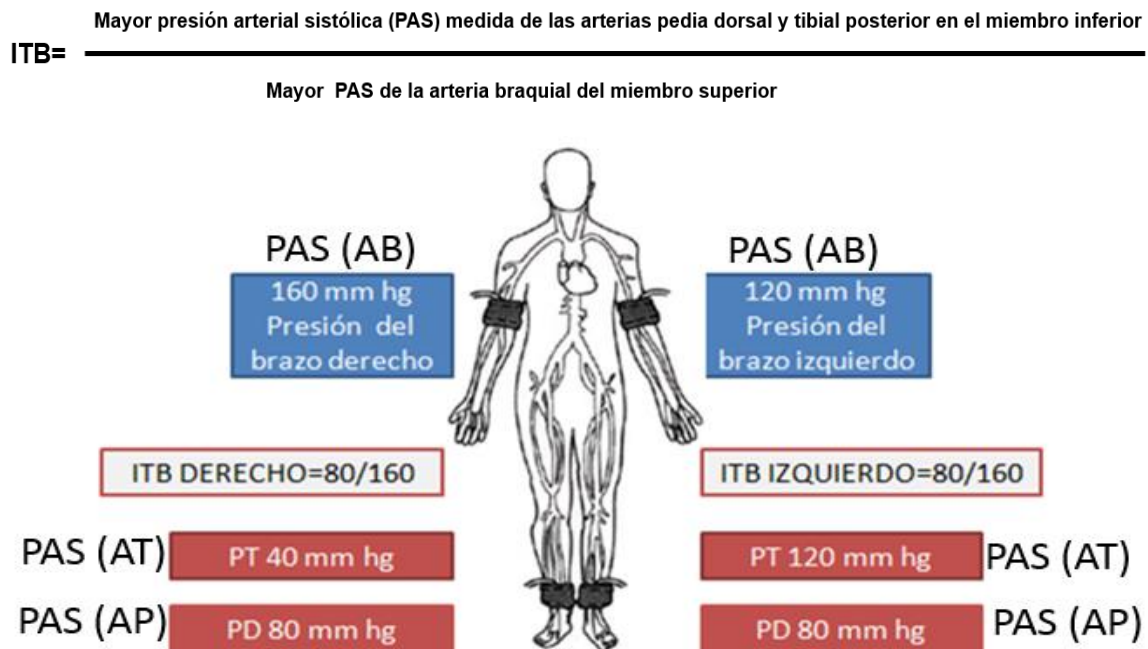


Figura 2. Cálculo del Índice Tobillo Brazo (ITB).

PAS (AB)= presión arterial sistólica de la arteria braquial, PAS (AT)= presión arterial sistólica de la arteria tibial, PAS (AP)= presión arterial sistólica de la arteria pedia dorsal, PT= arteria tibial posterior y DP= arteria pedia dorsal, Modificado de Hirsch, 2011.

Para el conocimiento de la EAP, el análisis de la composición genética ancestral presenta aspectos de interés, por su potencial uso en estudios epidemiológicos de enfermedades humanas, además de tener un gran interés histórico (49).

Existe una gran diversidad de marcadores genéticos, como polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), microsatélites (repeticiones cortas de ADN), polimorfismos de inserción y delección (InDels), etc. Estos marcadores cobran gran importancia, cuando se consideran los estudios de casos y controles donde se detectan asociaciones no aleatorias entre un alelo y un rasgo, identificando alelos más frecuentes entre individuos afectados respecto a individuos no afectados (50). Sin embargo, es posible encontrar asociaciones del rasgo con alelos no involucrados en las diversas patologías que aquejan la salud mundial, los cuales pueden diferir entre casos y controles debido a la ancestría (51).

La EAP y sus posteriores complicaciones, como la isquemia crónica y la amputación, involucran un gran número de genes que se encuentran relacionados en el riesgo de la enfermedad pero que interactúan con factores ambientales; existen polimorfismos genéticos implicados en el estrés oxidativo (*MTHFR*, *NOS3*), metabolismo lipídico (*SCARB1*, *apoA5*), respuesta inflamatoria (*IL6*, *COX-2*, *ICAM-1*), coagulación (*FGB*, *F5*), angiogénesis (*VEGF*), que se han identificado como posibles biomarcadores genéticos de la enfermedad (52).

En este trabajo de investigación se considerará la evidencia actual de los factores de riesgo, los marcadores moleculares de ancestría (AIMs) y los polimorfismos genéticos, en este contexto, se buscará identificar la asociación de la triada mencionada, propia de la población caucana con la EAP, abriendo de esta manera nuevas ventanas a los fenómenos de la enfermedad y permitiendo a futuro un pronóstico eficaz para la prevención de la EAP en el departamento del Cauca.

Bibliografía

1. Nguyen L, Liles DR, Lin PH, Bush RL. Hormone replacement therapy and peripheral vascular disease in women. *Vascular and endovascular surgery*. 2004;38:547-56.
2. Regensteiner JG, Hiatt WR. Treatment of peripheral arterial disease. *Clinical cornerstone*. 2002;4:26-37.
3. Diehm, Kareem, Lawall. Epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasa*. 2004;33:183-9.
4. Bashir R, Cooper CJ. Evaluation and medical treatment of peripheral arterial disease. *Current opinion in cardiology*. 2003;18:436-43.
5. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the united states results from the national health and nutrition examination survey, 1999–2000. *Circulation*. 2004;110:738-43.
6. Hernando FJS, Conejero AM. Enfermedad arterial periférica: aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. *Revista española de cardiología*. 2007;60:969-82.
7. Norman PE, Eikelboom JW, Hankey GJ. Peripheral arterial disease: prognostic significance and prevention of atherothrombotic complications. *Medical journal of Australia*. 2004;181:150-4.
8. Muller MD RA, Leuenberger UA, Sinoway LI J. Physiology in medicine: peripheral arterial disease. *Appl Physiol* 2013. 2013;115:1219-26.
9. Au TB GJ, Walker PJ, Haigh K, Nelson M. Peripheral arterial disease - diagnosis and management in general practice. *Aust Fam Physician* 2013 2013;42:397-400.
10. Toth P. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. *International journal of clinical practice*. 2008;62:1246-54.
11. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, et al. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *Jama*. 2003;290:898-904.
12. Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, et al. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *Jama*. 2003;290:891-7.
13. Higgins P, Higgins A. Epidemiology of peripheral arterial disease in women. *Journal of epidemiology*. 2003;13:1-14.

14. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): A Collaborative Report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery,* Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease). *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:e1-e192.
15. Novo S. Classification, epidemiology, risk factors, and natural history of peripheral arterial disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2002;4:S1-S6.
16. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*. 2004;141:421-31.
17. M Ruiz-Canela M-GM. Lifestyle and dietary risk factors for peripheral artery disease. *Circ J*. 2014;78:553-9.
18. Creager MA BM, Bluth EI,. ACCF/AHA/ACR/SCAI/SIR/STS/SVM/SVN/SVS key data elements and definitions for peripheral atherosclerotic vascular disease: A report of the American College of Cardiology. *Circulation*. 2012;125:395–467.
19. Das JR ER. Contemporary risk assessment and cardiovascular outcomes in peripheral arterial disease. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2013;13:185-96.
20. Weber C NH. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410–22.
21. Tousoulis D KA, Papageorgiou N, Androulakis E, Antoniadis C, Toutouzas K, Stefanadis C. Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. *Curr Pharm Des*. 2011;37:4089-110.
22. Brevetti G BL, Hiatt WR. Inflammation in peripheral artery disease. *Circulation*. 2010;18:1862-75.
23. Hiatt WR GJ, Smith SC Jr. Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Symposium II:. Nomenclature for vascular diseases. 2008;118:2826.
24. Rafieian-Kopaei M SM, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5:927-46.
25. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:7-12.

26. Matthew D. Muller ABR, Urs A. Leuenberger, and Lawrence I. Sinoway. Physiology in Medicine: Peripheral arterial disease. J Appl Physiol. 2013;115:1219-26.
27. Tabit C CW, Hamburg N, Vita J. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2010;11:61-74.
28. Vogiatzi G TD, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hellenic J Cardiol. 2009;50:402-9.
29. Kaneto H KN, Matsuhisa M, Matsuoka T. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. Mediators of inflammation. 2010:2010.
30. Yang H MA, Zhou S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. Lipids Health Dis. 2012;11:1-9.
31. Mizuno Y JR, Mason P. Inflammacion and the development of atherosclerosis- effects of lipid-lowering therapy. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2011;18:351-8.
32. Hansson G. Inflammation mechanisms in atherosclerosis. Hansson G Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009 2009;7:328-31.
33. Badimon L SR, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. Thrombosis and Haemostasis. 2011;105:34.
34. Johnson JL NA. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. Curr Opin Lipidol. 2009;20:370-8.
35. Libby P OY, Rocha V, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society. 2010;74:213-20.
36. Ait-Oufella H TS, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2011;31:969-79.
37. Gerthoffer. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. Circulation Research. 2007;100:607-21.
38. Breitenstein A TF, Lüscher T. Tissue factor and cardiovascular disease: quo vadis? Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society. 2010;74:3.
39. Martínez-González LByJ. Disfunción Endotelial. Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:21A-30A 2.

40. Tendera M AV. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *Eur Heart J*. 2011;32:2851-906.
41. Graham I AD, Borch-Johnsen K. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice:full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and 26 other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;4:113.
42. Hirsch AT HZ, Hertzner NR. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity,renal, mesenteric, and abdominal aortic): Executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery. *J Am Coll Cardiol*. 2005;47:1239.
43. Steffen LM DD, Boucher JL, Ershow AG, Hirsch A T. Management of peripheral arterial disease. *Diabetes Spectrum*. 2008:171-7.
44. Rac-Albu M IL, Guberna SM, Sinescu C. The role of ankle-brachial index for predicting peripheral arterial disease. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*. 2014;9:295-302.
45. Schorr EN. Methods of symptom evaluation and their impact on peripheral artery disease (PAD) symptom prevalence: A review. *Vasc Med*. 2013;18:95–111.
46. Fowkes DR, I. “Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*. 2013;382:1329–440.
47. Varu V, Hogg, ME, and Kibbe, MR. Critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2010:230–41.
48. Becker F R-EH, Ricco JB, Setacci C, Cao P, de Donato G, Eckstein HH, De Rango P, Diehm N, Schmidli J, Teraa M, Moll FL, Dick F, Davies AH, Lepäntalo M, Apelqvist J. Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42:4-12.
49. Risch N. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000;405:847-56.
50. Freedman ML RD, Penney KL. Assessing the impact of population stratification on genetic association studies. *Nature Genetics*. 2004;36:388-93.
51. Barnholtz-Sloan JS CR, Sellers TA, Schwartz AG. Examining population stratification via individual ancestry estimates versus self-reported race. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005;14:1545-51.
52. Brustolin S GR, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43:1-7.

Capitulo II – Prevalencia de la Enfermedad Arterial Periférica

Introducción

La EAP es una manifestación común de la aterosclerosis, cuya prevalencia se ha incrementado en todo el mundo y está asociada con la mortalidad por ECV (1). La EAP ha sido considerada una pandemia global, se estima que más de 200 millones de personas en el planeta se ven afectados con esta enfermedad (2). La prevalencia de EAP a nivel mundial se sitúa entre el 2,9 % y el 29. En países asiáticos se ha estimado una baja prevalencia (5%) en pacientes de edad avanzada, mientras que en Sudáfrica, un 29,3% de la población estudiada con una edad mayor a 60 años presenta EAP. En Suecia la prevalencia de EAP es del 18%, Italia por su parte presenta una prevalencia de 4,46% y Francia la nación con los valores más bajos (2,09%). En España, la prevalencia de EAP es del 8,5% entre la población de 55 a 84 años (3). La prevalencia de EAP varía dependiendo de la distribución de ciertos factores de riesgo modificables (hipertensión arterial, diabetes tipo 2, dislipidemia, entre otros) y no modificables (edad, sexo y origen étnico), la enfermedad afecta a un hasta el 20% de los sujetos que superan la séptima década de la vida (2, 4). La prevalencia se comporta ligeramente mas elevada en hombres que en mujeres, pero cuando el género femenino alcanza la menopausia la prevalencia es mayor (5). Estas diferencias son atribuidas a cambios hormonales, por la deficiencia estrogénica (6)

Según la AHA, la EAP afecta cerca de 8 millones de estadounidenses y se asocia de 5 a 6 veces más con riesgo de morbilidad y mortalidad por enfermedad coronaria y ACV (7). Se han realizado pocos estudios epidemiológicos para establecer los factores de riesgo y las estimaciones fiables de prevalencia en América Latina, donde las ECV se han convertido en la principal causa de muerte y discapacidad (8). Los estudios conducidos hasta ahora reportan una prevalencia de 7 al 10% para EAP (9-11) Figura 3.

En Colombia, la tasa de mortalidad por ECV es de 107.3/100.000 hombres y 50.6/100.000 mujeres, en consecuencia la EAP también representa un problema de salud pública. En nuestro país la enfermedad se encuentra sub-diagnosticada dado que el ITB no es llevado a cabo de forma rutinaria en la atención primaria en salud, por lo tanto es indispensable conocer la prevalencia de la enfermedad para lograr un impacto en la comunidad científica y clínica, que ayude a la posterior identificación de la EAP en los diferentes estadios logrando de esta manera la efectiva intervención de la misma.

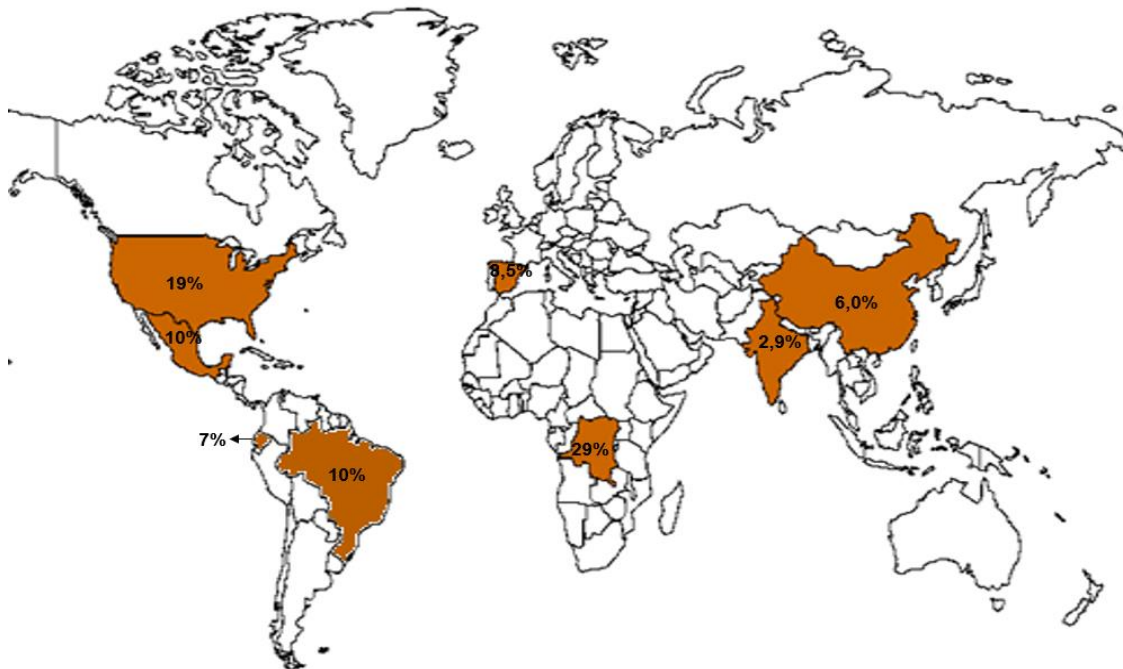


Figura 3. Mapa de la prevalencia mundial de la EAP.
Se observa la distribución en (%), de la enfermedad.

Metodología

Diseño y colección de la población de estudio

Este es un estudio transversal de base poblacional realizado entre junio de 2011 a mayo de 2013, a partir de un muestreo aleatorio en 36 de los 42 municipios del departamento de Cauca-Colombia. Se consideró un promedio de prevalencia esperado del 20%, un intervalo de confianza (IC) del 99% de dos colas, una precisión del 1% y como resultado se obtuvo un tamaño mínimo de la muestra con 9598 sujetos. Teniendo en cuenta una tasa del 4% de no cumplimiento de los criterios de inclusión o no disposición a participar en el estudio, se estimó un total de 9.982 individuos (2, 7).

Los sujetos que aceptaron participar fueron seleccionados y entrevistados hasta alcanzar el tamaño de muestra propuesto. Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta fueron: hombres y mujeres mayores de 40 años, procedentes del departamento del Cauca. Figura 4. Todos los cuestionarios, los procedimientos y los protocolos fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca; cuyas directrices utilizadas en la revisión se basaron en los principios bioéticos establecidos en la Declaración de Helsinki y los parámetros señalados en la Resolución 8430 del Ministerio de Salud de Colombia en 1993.

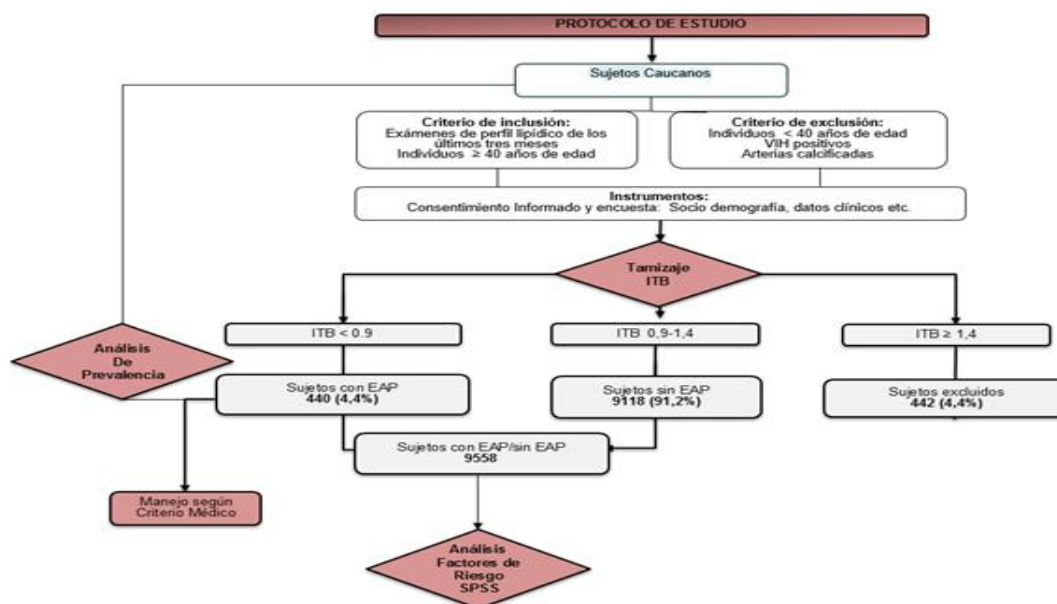


Figura 4. Criterios de Selección para el reclutamiento de individuos se observan los criterios de inclusión y exclusión.

Recopilación de datos

Después de firmar un consentimiento informado, cada voluntario fue entrevistado por un profesional capacitado para llenar un cuestionario estructurado que permitió establecer las características socio-demográficas (edad, sexo, procedencia, nivel educativo y estado ocupacional), la historia clínica personal (hipertensión, diabetes, dislipidemia, obesidad, infarto agudo de miocardio e isquemia cerebral) y el hábito de fumar (nunca, exfumador, actual). Posteriormente se tomaron medidas antropométricas, como talla, peso y presión arterial, con el fin de identificar la presencia de factores de riesgo cardiovascular. La hipertensión arterial se definió con una presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg y/o una presión arterial diastólica ≥ 90 mm Hg. El índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo el peso/la altura al cuadrado (kg/m^2), los individuos que tuvieron un IMC <25 fueron definidos con peso normal, los que tuvieron 25 a 29,99 se identificaron con sobrepeso, y los que arrojaron un IMC ≥ 30 se consideraron obesos.

Con el fin de corroborar la presencia de factores de riesgo personales, se tuvieron en cuenta pruebas bioquímicas correspondientes a perfil lipídico y glicemia de los últimos tres meses las cuales fueron proporcionadas por los pacientes. Se consideró como dislipidémicos a pacientes con alteraciones en los niveles de colesterol en ayunas ≥ 200 mg/dL, nivel de HDL <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL, triglicéridos ≥ 150 mg/dL (hipertrigliceridemia) o con un diagnóstico previo de hipercolesterolemia o estaban bajo uso de medicamentos. Para los análisis bioquímicos, el colesterol LDL > 100 mg / dL se consideró alto y un colesterol HDL bajo (<40 mg / dL, para ambos géneros) fue considerado hipoalfalipoproteinemia. La tríada lipídica se definió como triglicéridos ≥ 150 mg / dL, colesterol HDL <40 mg / dL (hombre) o <50 mg / dL (mujeres) y LDL-colesterol > 100 mg / dL. Se consideró elevada la proporción de triglicéridos a HDL-colesterol (TG / HDL-c) > 4 . La diabetes se definió como tener un nivel de glucosa en ayunas ≥ 126 mg / dL, historia clínica de diabetes o tratamiento de la diabetes.

Medición ITB

Antes de iniciar la medida del ITB, se pidió a los pacientes descansar en una posición decúbito supino con el tobillo al mismo nivel del corazón, durante 10 minutos (Gornik HL, 2008). Después, se midió la presión arterial sistólica (PAS) en la arteria braquial para cada brazo, tras la palpación de los pulsos, usando un esfigmomanómetro (WelchAllyn) y un dispositivo Doppler 8-mHz (Huntleigh 500 D, Huntleigh Technology) (12). A continuación el manguito se colocó en la pantorrilla distal y el doppler se utilizó para determinar la mayor PAS de las arterias tibial posterior y pedia dorsal de cada miembro inferior. El ITB de cada pierna se calculó dividiendo la mayor PAS entre las arterias tibial posterior y pedia dorsalis sobre la más alta PAS de la arteria braquial del brazo. EAP se definió como tener un ITB <0.9 , cuando los valores se encontraron entre 0,91 y 1,40 se consideraron normales, cuando un ITB fue $>1,4$ se clasificó como sugerente de arterias no compresibles calcificadas (13). Todos los esfigmomanómetros fueron calibrados para el estudio y la prueba ABI fue realizada por profesionales capacitados. Se reportó el valor del ITB obtenido, a partir de la división entre la mayor PAS de las arterias pedias, tibial y la mayor PAS braquial. (12, 14) Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación valores ITB

Valores de ITB	Interpretación
< de 0,90	EAP
0,9-1,4	Normal
> 1,40	Vaso no compresible por calcificación

EAP= Enfermedad Arterial Periférica, ITB= Índice Tobillo Brazo

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Niveles de significancia estadística (valores $p < 0,05$) corresponden a pruebas a dos colas. La prevalencia de la EAP se estimó con el número de sujetos que tuvieron un ITB $< 0,9$ sobre el total de los sujetos reclutados en el estudio. Las variables continuas se expresaron mediante la media y la desviación estándar y se utilizó la prueba t student para evaluar las diferencias de medias entre los grupos de estudio. Las variables discretas se expresaron como frecuencias y proporciones y se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para evaluar las diferencias de distribución. Para determinar la asociación entre el estado de cada variable y la enfermedad, los sujetos con ITB $> 1,4$ fueron excluidos.

El análisis de regresión logística condicional se llevó a cabo para calcular ambas relaciones odds (OR) crudos con intervalos de confianza del 95% (IC). Para evaluar el efecto de posibles factores de confusión, los OR se ajustaron inicialmente en el modelo añadiendo como covariables la edad (en años como una variable continua), el género (hombres Vs. mujeres) y la procedencia (urbana o rural). Para un análisis más detallado, los OR se ajustaron plenamente en un modelo multivariado añadiendo las variables categóricas ocupación, nivel de educación, tabaquismo, obesidad, hipertensión, diabetes y dislipidemia. Se evaluó mediante el test de interacción la relación entre dos o más factores que muestran el efecto de la presencia de 2 o más factores de riesgo en el desarrollo de EAP. El análisis de la interacción se llevó a cabo usando las macros del paquete estadístico SPSS versión 19.0 (15).

Resultados

Se observa la prevalencia de EAP en la población total (10.000 sujetos), estratificada por variables demográficas y la presencia de factores de riesgo. La prevalencia global de la EAP fue del 4,4%; 4,0% en varones y 4,7% en mujeres. EAP se presentó tanto en las comunidades urbanas como en las rurales. Además, los sujetos con EAP fueron a menudo diabéticos (23%), hipertensos (10,4%), dislipidémicos (10,4%), con ninguna escolaridad (8,7%), obesos (7,4%), y fumadores (6,3%). La prevalencia de EAP entre individuos con auto-reporte de Infarto agudo de miocardio ó una isquemia cerebral fue 31% y 8,1%, respectivamente. Tabla 3. Como era de esperar, la edad aumentó drásticamente la prevalencia de la EAP desde una tasa baja de 0,5% en sujetos de 40-49 años hasta 13,8% y 16,3% en sujetos con 70-79 y ≥ 80 años de edad respectivamente. Figura 5.

Con el fin de estimar el riesgo atribuible (OR) para cada uno de los factores de ECV mencionados, 442 sujetos con ITB $>1,4$ fueron excluidos. Un total de 3.853 (40,3%) varones con una edad media de 61,4 años (DE: 11,26 años) y 5.705 (59,7%) mujeres, con una edad media de 60,4 años (DE: 11,46 años) se incluyeron en este análisis.

El nivel de educación, tabaquismo, obesidad, hipertensión, diabetes y dislipidemia, se asociaron significativamente a un aumento en el riesgo crudo de EAP ó modelo sin ajustar. Cuando se ajustó por edad, género y procedencia los ORs disminuyeron aunque mantuvieron el riesgo de hipertensión (OR 7,1; IC95% 5.3 a 9.5), diabetes (OR 6,5; IC95% 4.9- 8.7), dislipidemia (OR 4,5; IC95% 3.7 a 5.6), obesidad (OR 2,5; IC95% 1.9 a 3.1) y consumo de cigarrillo (OR 1,7; IC95% 1,4-2,1). Después de ajustar por edad, género, procedencia y factores de riesgo cardiovasculares en el modelo de regresión logística, todos los factores de riesgo, excepto para el nivel de educación, se asociaron significativamente a la EAP, de la siguiente manera: hipertensión (OR 4,6; IC95% 3.4 a 6.2), diabetes (OR 4,3; IC95% 3.2- 5.7), dislipidemia (OR 3,1; IC95% 2.5 a 3.9), obesidad (OR 1,8; IC95% 1.4 a 2.3) y cigarrillo (OR 1,6; IC95% 1,3-1,9), este último no varió en los modelos de ORs ajustados. Tabla 4.

Tabla 3. Prevalencia de EAP

Características	Cálculos de Prevalencia	Prevalencia EAP % (IC95%)
Género		
Masculino	163/4075	4.0 (3.40-4.60)
Femenino	277/5925	4.7 (4.16-5.24)
Procedencia		
Urbana	304/6976	4.4 (3.92-4.88)
Rural	136/3024	4.5 (3.76-5.24)
Rango de Edad		
40-49	9/1790	0.5 (0.17-0.83)
50-59	29/2941	1.0 (0.64-1.36)
60-69	92/3145	2.9 (2.31-3.49)
70-79	199/1441	13.8 (12.02-15.58)
≥ 80	111/ 683	16.3 (13.53-19.07)
Nivel Educativo		
Ninguno	43/494	8.7 (6.21-11.19)
Primaria	257/4007	6.4 (5.64-7.16)
Secundaria	89/3403	2.6 (2.07-3.13)
Técnico/Universitario	51/2096	2.4 (1.74-3.06)
Consumo de Cigarrillo		
Nunca	212/6381	3.3 (2.86-3.74)
Actual	228/3619	6.3 (5.51-7.09)
Obesidad		
No	332/8548	3.9 (3.11-4.37)
Si	108/1452	7.4 (6.05-8.75)
Hipertensión		
No	59/6346	0.9 (0.67-1.13)
Yes	381/3654	10.4 (9.41-11.39)
Diabetes		
No	349/9604	3.6 (3.23-3.97)
Yes	91/396	23.0 (18.86-27.14)
Dislipidemia		
No	169/7400	2.3 (1.96-2.64)
Yes	271/2600	10.4 (9.23-11.57)
Auto-reporte de IAM		
No	370/9774	3.8 (3.42-4.18)
Yes	70/226	31.0 (24.97-37.03)
Auto-reporte de IC		
No	430/9876	4.4 (4.00-4.80)
Yes	10/124	8.1 (3.30-12.90)

CI: Intervalo de Confianza; EAP: Enfermedad Arterial Periférica, IAM: Infarto Agudo de Miocardio, IC: Isquemia Cerebral

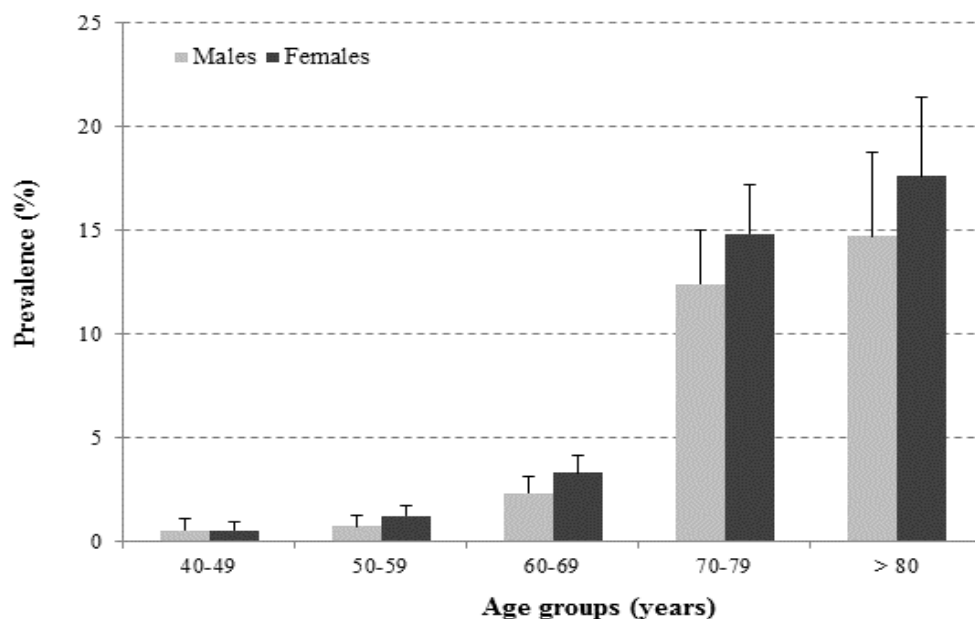


Figura 5. Prevalencia de la enfermedad arterial periférica por grupos de edad. Se observa el incremento de la enfermedad en la población que supera los 70 y 80 años de edad, tanto en hombres como en mujeres.

Tabla 4. Factores de Riesgo Cardiovascular para EAP

Factor	Sin EAP n (%)	EAP n (%)	OR Crudo (IC95%)	OR ^a Ajustado (IC95%)	OR ^b Ajustado (IC95%)
Nivel Educativo					
Universidad	1975 (21.7)	51 (11.6)	1.0	1.0	1.0
Secundaria	3172 (34.8)	89 (20.2)	1.1 (0.8-1.7)	0.8 (0.5-1.1)	0.7 (0.5-0.9)
Primaria	3551 (38.9)	257 (58.4)	2.8 (2.1-3.8)	1.4 (0.9-1.9)	0.9 (0.6-1.3)
Ninguno	420 (4.6)	43 (9.8)	3.9 (2.6-6.0)	1.2 (0.8-1.9)	0.7 (0.5-1.2)
Cigarrillo					
No	5905 (64.8)	212 (48.2)	1.0	1.0	1.0
Si	3213 (35.2)	228 (51.8)	2.0 (1.3-2.5)	1.7 (1.4-2.1)	1.6 (1.3-1.9)
Obesidad					
No	7864 (86.2)	332 (75.5)	1.0	1.0	1.0
Si	1254 (13.8)	108 (24.5)	2.0 (1.6-2.5)	2.5 (1.9-3.1)	1.8 (1.4-2.3)
Hipertensión					
No	6057 (66.4)	59 (13.4)	1.0	1.0	1.0
Si	3061 (33.6)	381 (86.6)	12.7 (9.7-16.9)	7.1 (5.3-9.5)	4.6 (3.4-6.2)
Diabetes					
No	8846 (97.0)	349 (79.3)	1.0	1.0	1.0
Si	272 (3.0)	91 (20.7)	8.5 (6.5-11.00)	6.5 (4.9-8.7)	4.3 (3.2-5.7)
Dislipidemia					
No	6974 (76.5)	169 (38.4)	1.0	1.0	1.0
Si	2144 (23.5)	271 (61.6)	5.2 (4.3-6.4)	4.5 (3.7-5.6)	3.1 (2.5-3.9)

OR: Odds ratio; EAP: enfermedad arterial periférica. ^a Ajustado por edad, género y procedencia. ^b Ajustado por edad, genero, procedencia, nivel educativo, cigarrillo, obesidad, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

Por otra parte, la asistencia a la escuela secundaria fue un factor protector para la EAP, (OR 0,7; IC del 95%: 0,46-0,98). Para el análisis del perfil lipídico. Tabla 5, la relación TG / HDL estuvo fuertemente asociada a la EAP (OR 4,7; IC del 95%: 3,9-7,9), seguida de la tríada lipídica (OR 4,1; IC del 95%: 3,0-15,5), hipoalipoproteínemia (OR 4,0; IC del 95%: 3,0-6,1), HDL-c (OR 3,9; IC del 95%: 3,0-10,5), hipertrigliceridemia (OR 3,4; IC 95%: 1,9-2,2) 1,6-2,8) y colesterol (OR 1,7; IC del 95%: 1,3-3,1), respectivamente.

Tabla 5. Perfil Lipídico y odds ratio (95% IC) para EAP.

	No EAP n (%)	EAP n (%)	OR Crudo 95% IC	ORa Ajustado 95% IC	ORb Ajustado 95% IC
Colesterol					
No	7065 (77.5)	242 (55.0)	1.0	1.0	1.0
Si	2053 (22.5)	198 (45.0)	2.8 (2.21-3.38)	1.7 (1.51-3.11)	1.7 (1.33-3.12)
c-HDL					
No	8106 (88.9)	177 (40.2)	1.0	1.0	1.0
Si	1012 (11.1)	263 (59.8)	11.9 (9.73-14.55)	6.2 (3.12-11.04)	3.9 (3.03-10.51)
Hypertrigliceridemia					
No	6749 (74.0)	249 (56.6)	1.0	1.0	1.0
Si	2369 (26.0)	191 (43.4)	2.8 (1.75-2.51)	2.9 (1.83-2.31)	3.4 (1.92-2.27)
c-LDL					
No	3645 (40.0)	80 (18.2)	1.0	1.0	1.0
Si	5473 (60.0)	360 (81.8)	3.0 (2.34-3.83)	2.8 (2.21-3.68)	2.1 (1.64-2.81)
Triglicérides/HDL					
No	6753 (74.1)	158 (35.9)	1.0	1.0	1.0
Si	2365 (25.9)	282 (64.1)	5.2 (3.75-7.63)	5.0 (3.97-7.89)	4.7 (3.98-7.94)
Hipoalipoproteínemia					
No	8910 (97.7)	371 (84.3)	1.0	1.0	1.0
Si	208 (2.3)	68 (15.5)	5.0 (3.85-6.43)	4.5 (3.07-6.19)	4.0 (3.04-6.13)
Triada Lipídica					
No	8210 (90)	194 (44,1)	1.0	1.0	1.0
Si	908 (10)	246 (55,9)	11.5 (7.73-14.03)	6.3 (3.34-15.08)	4.1 (3.03-15.52)

OR: Odds ratio; EAP: enfermedad arterial periférica.

^a Ajustado por edad, género y procedencia.

^b Ajustado por edad, género, procedencia, nivel educativo, cigarrillo, obesidad, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

Al considerar la frecuencia de los factores de riesgo en la población estudiada. Figura 6, el 94,1% de la prevalencia de EAP se explicó por la combinación de dos o más factores de riesgo. Con el fin de establecer qué combinación de factores de riesgo ejerció el mayor aumento en el riesgo de EAP, se llevó a cabo un análisis de

interacción. Tabla 6. Como se muestra para las interacciones de dos factores en el modelo de OR ajustado, los sujetos tanto diabéticos como dislipidémicos mostraron el mayor riesgo de EAP (OR 7,5; IC del 95%: 5,1-11,0), seguidos por los diabéticos y los fumadores (OR 7,3; IC del 95% 10,8), diabéticos y obesos (OR 7,1; IC del 95%: 4,2-11,9). La evaluación del riesgo para la interacción de tres o más factores mostró que la diabetes, la dislipidemia y la obesidad representaron 13,2 veces el riesgo de EAP (95% IC 6,9-25,4) y al agregar hipertensión al modelo, el efecto de riesgo fue el más alto (OR 17,2; IC del 95%: 8,4 - 35,1). Por último, cuando se agregó el hábito de fumar cigarrillo como el quinto factor para el modelo, el riesgo asociado fue disminuido pero siguió siendo significativo (OR 8,2; IC del 95%: 4,3-12,1).

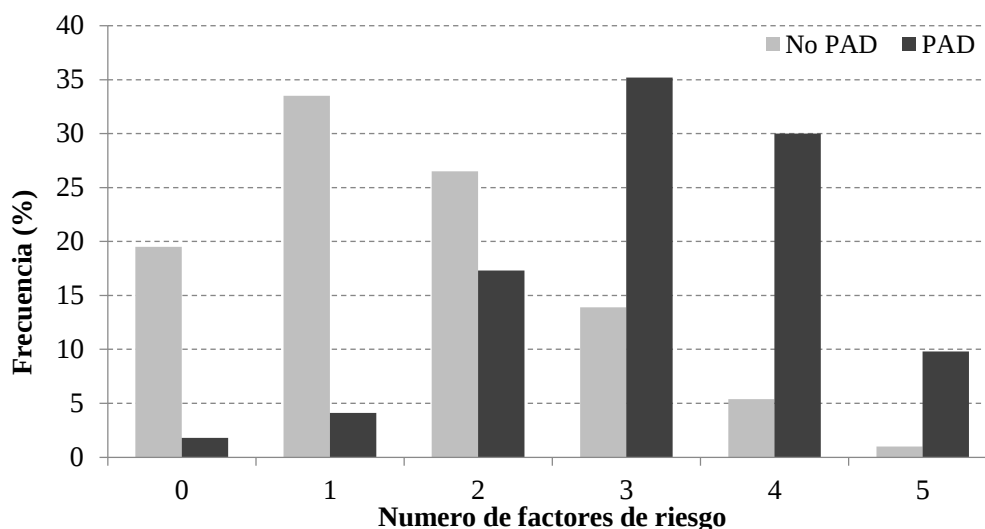


Figura 6. Frecuencia de factores de riesgo
(0-5 factores de riesgo) sujetos sin EAP y EAP

Tabla 6. Interacción entre factores de riesgo y EAP

Factor	OR Crudo (CI95%)	OR^a Ajustado (CI95%)
Cigarrillo*Obesidad	2.3 (1.6-3.2)	2.3 (1.6-3.3)
Cigarrillo*Hipertensión	5.7 (4.7-7.0)	3.5 (2.8-4.3)
Cigarrillo *Diabetes	9.2 (6.5-12.9)	7.3 (5.0-10.8)
Cigarrillo *Dislipidemia	4.2 (3.4-5.2)	3.4 (2.7-4.2)
Obesidad *Hipertensión	5.2 (4.0-6.7)	3.2 (2.5-4.2)
Obesidad *Diabetes	7.1 (4.5-11.1)	7.1 (4.2-11.9)
Obesidad *Dislipidemia	4.5 (3.4-5.9)	4.1 (3.0-5.6)
Hipertensión*Diabetes	10.4 (7.9-13.9)	6.3 (4.5-8.7)
Hipertensión*Dislipidemia	8.0 (6.5-9.7)	5.2 (4.2-6.4)
Diabetes*Dislipidemia	9.8 (7.1-13.7)	7.5 (5.1-11.0)
Hipertensión*Diabetes*Dislipidemia	13.0 (9.0-18.8)	9.1 (6.0-13.7)
Hipertensión *Diabetes*Obesidad	10.1 (6.2-16.4)	10.1 (5.9-17.1)
Hipertensión *Diabetes*Cigarrillo	11.0 (4.3-16.1)	7.1 (4.6-14.9)
Hipertensión *Dislipidemia* Obesidad	5.8 (4.3-7.8)	5.4 (3.9-7.5)
Hipertensión * Dislipidemia * Cigarrillo	7.0 (5.6-8.9)	4.6 (3.5-5.9)
Hipertensión * Obesidad * Cigarrillo	4.5 (3.2-6.3)	4.0 (2.7-5.7)
Diabetes* Dislipidemia * Obesidad	11.4 (6.4-20.3)	13.2 (6.9-25.4)
Diabetes* Dislipidemia * Cigarrillo	10.5 (6.5-17.0)	9.5 (5.6-16.1)
Dyslipidemia* Obesidad * Cigarrillo	3.6 (2.3-5.5)	3.7 (2.3-5.8)
Hipertensión *Diabetes* Dislipidemia * Obesidad	15.2 (8.1-28.5)	17.2 (8.4-35.1)
Hipertensión *Diabetes* Dislipidemia * Cigarrillo	11.4 (4.7-18.2)	9.7 (5.7-16.2)
Hipertensión *Diabetes* Obesidad * Cigarrillo	10.6 (5.1-22.0)	11.8 (5.4-25.6)
Diabetes* Dislipidemia * Obesidad * Cigarrillo	9.9 (4.2-23.1)	11.3 (4.5-28.35)
Hipertensión *Diabetes*Dislipidemia*Obesidad* Cigarrillo	10.2 (3.6-14.3)	8.2 (4.3-12.1)

CI: Intervalo de confianza; OR: odds ratio; EAP: enfermedad arterial periférica. ^a ajustado por edad, genero, procedencia y nivel de educación

Discusión

Las ECV son la principal causa de muerte en América Latina con la enfermedad isquémica del corazón como la causa principal de mortalidad en la mayoría de los países y la EAP como la tercera causa de morbi-mortalidad cardiovascular aterosclerótica (2). Respecto a esta última enfermedad se han realizado pocos estudios epidemiológicos, en especial en los países de bajos o medianos ingresos (16).

En Colombia las ECV ocupan el primer lugar por mortalidad en enfermedades crónicas no transmisibles, 205,9/100.000 hombres y 166,7/100.000 mujeres (16). Las ECV ocupan el segundo lugar por muertes totales después de la violencia, fenómeno que ha ocasionado las migraciones de las zonas rurales a las zonas urbanas, el conflicto armado ha logrado desplazar aproximadamente 3.7 millones de personas, lo que ha afectado el acceso a la educación, las necesidades básicas y la atención de salud (17). Lo anterior al mismo tiempo ha aumentado la exposición de la población a factores de riesgo ambientales y de estilo de vida como la mala alimentación, el consumo de tabaco, la inactividad física, entre otros (18).

La EAP en nuestro país se encuentra sub-diagnosticada y no se registran datos de la prevalencia. Este estudio es el primero en reportar una prevalencia estimada de 4,4%, esta cifra es consistente con las encontradas en el estudio de Eraso realizado en Estados Unidos en sujetos con edades ≥ 40 años encontrándose una prevalencia del 4,6% (19) y el estudio de Edinburg que mostró una prevalencia para sujetos sintomáticos del 4,5% (20). La prevalencia de esta investigación fue menor a las reportadas en otros estudios llevados a cabo en América Latina: Ecuador (7%), Brasil (10,5%) y México (10%)(9-11). Las diferencias observadas podrían deberse, en parte, a los criterios de selección, lugar del estudio (rural Vs urbano) y tamaño de la muestra de los estudios anteriores. Por otra parte, estas diferencias podrían de hecho reflejar la variación de los factores de riesgo como tabaquismo, hipertensión, dislipemia, diabetes y la historia familiar de las ECV (2). Lo anterior podría analizarse mediante estudios de revisión y meta-análisis.

En el presente estudio así como en muchos otros, los casos positivos para EAP aumentaron progresivamente con la edad. Esto es probablemente debido a un incremento en la prevalencia de otros factores de riesgo de aterosclerosis durante el envejecimiento, que también desencadena la progresión de la EAP (21, 22).

Aunque tanto mujeres como hombres se encuentran relacionados a los mismos factores de riesgo, en este estudio las mujeres mostraron una prevalencia de EAP levemente mayor en comparación con los varones independientemente de la edad (4,7 vs. 4,0%), lo que podría explicarse porque nuestra población de estudio se encuentra sobre los 40 años y cuando más las mujeres se acercan o se encuentran en la menopausia el riesgo a padecer la enfermedad aumenta y se asocia con comorbilidades en particular encontradas en el sexo femenino, como la osteoporosis y el hipotiroidismo (23, 24). Recientemente, un meta-análisis que incluyó 34 estudios poblacionales con un total de 112.027 individuos mostró que en los países de bajos o medianos ingresos la prevalencia de EAP fue consistentemente mayor en las mujeres que en los hombres hasta 85-89 años,

aunque la diferencia se redujo con la edad (2). Cuando las mujeres se encuentran en edad fértil, se ha observado que las hormonas sexuales, particularmente estrógeno, tienen propiedades vaso protectoras, finalmente se cree que la reducción en la prevalencia de eventos ateroscleróticos está relacionada con mujeres jóvenes mientras que existe un mayor riesgo entre las mujeres post menopáusicas (25). Por lo tanto, deben llevarse a cabo más estudios para una comprensión precisa de género con el riesgo de EAP.

Adicionalmente, nuestro estudio muestra que los sujetos con EAP presentaron nivel educativo bajo, fueron fumadores, obesos, hipertensos, diabéticos y dislipidémicos, resultados que son consistentes con los principales factores de riesgo de ECV (26, 27). Entre los factores de riesgo asociados con EAP, hipertensión y diabetes mellitus tienen la correlación más con la enfermedad (28). La hipertensión fue el predictor más fuerte de riesgo para EAP en nuestro estudio con una OR ajustado de 4,9. Estudios revelan que el riesgo de desarrollar EAP en los fumadores es de 2-3 veces mayor que en los no fumadores (2, 14). En este estudio el aumento en el riesgo para el consumo de cigarrillo no fue tan fuerte como con otros factores de riesgo, pero también se asoció a EAP (OR = 1,6). En particular, este estudio muestra que la relación TG/HDL fue el factor más importante en la dislipidemia, aumentando el riesgo de PAD en 4,7 veces después de ser ajustado, lo que también es consistente con estudios previos que indican que la relación TG/HDL es un poderoso indicador independiente de enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y aterosclerosis (29-31).

Además de establecer la prevalencia de factores de riesgo de ECV entre los sujetos EAP, también se investigaron la combinación de factores de riesgo y el efecto de esta interacción en el riesgo de EAP, en consecuencia, se observó que el 65% de los sujetos con EAP presentan una combinación de al menos tres o cuatro factores de riesgo tradicionales. Además, el análisis de la interacción mostró que de todos los factores de riesgo la diabetes ejerció el efecto más fuerte en combinación con cualquier otro factor de riesgo, aumentando el riesgo de 7,5 veces cuando se combina con dislipidemia, hasta 13,2 veces cuando se da la interacción con tres factores de riesgo diabetes, dislipidemia y obesidad, donde se observó mayor riesgo 17,2 fue cuando se combinaron la hipertensión, la diabetes, la dislipidemia y la obesidad investigados en el modelo ajustado. Por otra parte, sujetos con EAP reportaron una mayor probabilidad de padecer IAM (31%) y ACV (8,1%). Consistentemente en un estudio prospectivo, se estableció previamente que los pacientes de EAP presentan 3,1 veces riesgo de muerte por todas las causas, 5,9 por ECV y 6,6 por enfermedad coronaria (2).

Además de establecer la distribución de los tradicionales factores de riesgo de ECV y su efecto sobre el riesgo de EAP, se investigó la distribución de frecuencias de la combinación de factores de riesgo de ECV en sujetos con EAP. En consecuencia, la mayoría de los sujetos con EAP tiene la presencia de tres (35,2%) o cuatro (30%) factores de riesgo de ECV y un porcentaje menor presentó cinco (11,6%). Esta observación puede explicarse en parte por el hecho de que la muestra para sujetos que tienen tres o cuatro factores de riesgo de ECV tuvo un mayor número de individuos, lo que permitió una mayor identificación de casos de EAP dentro de

estas categorías. También podría estar relacionado con una reducción de la esperanza de vida entre los sujetos con cinco factores de riesgo de ECV en comparación con los otros en las tres o cuatro categorías de factores de riesgo de ECV (edad media $71,94 \pm 8,37$ vs $74,51 \pm 8,98$, respectivamente, $p = 0,058$), Lo que podría conducir a la subestimación de la prevalencia de EAP dado el menor número de sujetos en este grupo.

Los resultados de este estudio, suministrarán evidencia científica útil para las entidades de salud Colombianas y del departamento del Cauca para que a futuro centren esfuerzos en la reducción de EAP mediante programas de promoción-prevenición. Los resultados de este estudio en el ámbito clínico podrían motivar el uso de ITB como una herramienta de tamizaje de atención primaria en salud para la identificación temprana de poblaciones en situación de riesgo (32).

Bibliografía

1. Paquissi FC, Cuvinje ABP, Cuvinje AB. Prevalence of Peripheral Arterial Disease among Adult Patients Attending Outpatient Clinic at a General Hospital in South Angola. *Scientifica*. 2016;2016.
2. Fowkes DR, I. "Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*. 2013;382:1329–440.
3. Sánchez Maciá M, Castaño Picó MJ. Prevalencia de enfermedad arterial periférica en distintos países. Factores de riesgo y tratamiento. 2011.
4. Grundy SM CJ, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA,. Diagnosis and management of the metabolic syndrome an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*. 2005;112:2735-52.
5. Higgins P, Higgins A. Epidemiology of peripheral arterial disease in women. *Journal of epidemiology*. 2003;13:1-14.
6. Nguyen L, Liles DR, Lin PH, Bush RL. Hormone replacement therapy and peripheral vascular disease in women. *Vascular and endovascular surgery*. 2004;38:547-56.
7. Rooke TW HA, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK,. ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2020-45.
8. Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, et al. Risk Factors for Acute Myocardial Infarction in Latin America The INTERHEART Latin American Study. *Circulation*. 2007;115:1067-74.
9. Del Brutto OH SM, Mera RM, Castillo PR, Cusick EH, Gruen JA, Phelan KJ, Del Brutto VJ, Zambrano M, Brown DL. Prevalence, correlates, and prognosis of peripheral artery disease in rural ecuador-rationale, protocol, and phase I results of a population-based survey: an atahualpa project-ancillary study. *Int J Vasc Med*. 2014:2014:643589.
10. Makdisse M1 PAC, Brasil Dde P, Borges JL, Machado-Coelho GL, Krieger JE, Nascimento Neto RM, Chagas AC. Prevalence and risk factors associated with peripheral arterial disease in the Hearts of Brazil Project. *Arq Bras Cardiol*. 2008;9:370-82.

11. Buitron-Granados LV M-LC, Escobedo-de la Peña J. Prevalence of peripheral arterial disease and related risk factors in an urban Mexican population. *Angiology*. 2004;55:43-51.
12. Rac-Albu M IL, Guberna SM, Sinescu C. The role of ankle-brachial index for predicting peripheral arterial disease. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*. 2014;9:295-302.
13. Aboyans V CM, Abraham P, Allison MA, Creager MA, Diehm C,. Measurement and Interpretation of the Ankle-Brachial Index A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2012;126:2890-909.
14. Tendera M AV. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *Eur Heart J*. 2011;32:2851-906.
15. Valeri L VT. Mediation analysis allowing for exposure-mediator interactions and causal interpretation: Theoretical assumptions and implementation with SAS and SPSS macros. *Psychol Methods*. 2013;18:137.
16. López-Jaramillo P L-LJ. Lecciones aprendidas de dos grandes estudios epidemiológicos de enfermedades cardio-cerebrovasculares en las que ha participado colombia. *Rev Col Cardiol*. 2010;17:195-200.
17. Gómez G M AG, de Souza MC. Migrations forced by violence: the Colombian case. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2008;13.
18. Schargrotsky H H-HR, Champagne BM, Silva Ayçaguer LC, Vinueza, A LCS,. CARMELA: assessment of cardiovascular risk in seven Latin American cities. *Am J Med*. 2008;121:58-65.
19. Eraso LH FE, Mohler ER , Xie D, Sha D, Berger JS. Peripheral arterial disease, prevalence and cumulative risk factor profile analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2014;21:704-11.
20. Fowkes. Edinburgh Artery Study. Prevalence of asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol*. 1991;20:384-92.
21. Savji N RC, Skolnick AH, Guo Y, Adelman MA, Riles T,. Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects. *J Am Coll Cardio*. 2013;61:1736-43.
22. Moon JR GM, Subramanian SV, Avendaño M, Kawachi I. Transition to retirement and risk of cardiovascular disease: Prospective analysis of the US health and retirement study. *Soc Sci Med*. 2012;75:526-30.
23. Barochiner J AL, Waisman GD. Challenges associated with peripheral arterial disease in women. *Vasc Health Risk Manag*. 2014;10:115-28.

24. Teodorescu VJ VA, Kibbe MR. Peripheral arterial disease in women. *J Vasc Surg.* 2013;57:18-26.
25. Vavra AK KM. Women and peripheral arterial disease. . *Women's Health.* 2009;5:669-83.
26. Alzamora MT FR, Baena-Díez JM, Pera G, Toran P, Sorribes M,. The Peripheral Arterial disease study (PERART/ARTPER): prevalence and risk factors in the general population. *BMC Public Health.* 2010;10:38.
27. Dhaliwal G MD. Peripheral arterial disease: epidemiology, natural history, diagnosis and treatment. *Int J Angiol.* 2007;16:36.
28. Morillas P CA, Morillas P, Cordero A, Bertomeu V Bertomeu V. Prevalence of Peripheral Arterial Disease in Patients with Acute Coronary Syndrome (PAMISCA) Investigators. *Arch Intern Med.* 2006;166:529-35.
29. Yunke Z, Guoping L, Zhenyue C. Triglyceride-to-HDL cholesterol ratio. *Herz.* 2014;39:105-10.
30. Luz PLd, Favarato D, Faria-Neto Junior JR, Lemos P, Chagas ACP. High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics.* 2008;63:427-32.
31. Badiou S, Thiébaud R, Aurillac-Lavignolle V, Dabis F, Laporte F, Cristol J-P, et al. Association of non-HDL cholesterol with subclinical atherosclerosis in HIV-positive patients. *Journal of Infection.* 2008;57:47-54.
32. McDermott MM LK, Criqui MH, Ruth K, Goff D, Saad MF,. Ankle-Brachial Index and Subclinical Cardiac and Carotid Disease The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2005;162:33-41.

Capitulo III – Factores de riesgo Cardiovascular asociados a la Enfermedad Arterial Periférica

Introducción

Este esquema analítico se inicia a partir de un grupo, denominado "casos", constituido por el grupo de sujetos que presentan el desenlace, enfermedad o variable dependiente denominada EAP. Este análisis busca determinar la frecuencia de exposición a las variables independientes entre individuos afectados, la que se comparará con la frecuencia entre un grupo de individuos libres de la presencia de enfermedad, grupo "control" (1). Normalmente un control que se encuentre bajo las mismas condiciones de exposición que un caso será seleccionado, definiendo una relación 1:1 (2). Se estimara el riesgo (OR) de diferentes factores de exposición involucrados con la patología de interés (2).

A nivel mundial los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la EAP e incluso que se presentan como una comorbilidad, son correspondientes a la HTA, la diabetes mellitus tipo 2 DM2, el tabaquismo y la dislipidemia, estos actúan conjuntamente e incrementan el riesgo a EAP (3-5) unidos a estos factores también se encuentran el incremento en la edad y la raza (4). Por otra parte La AHA mostro que la edad, se encuentra correlacionada con la disminución de flujo sanguíneo y de los valores del índice tobillo brazo, siendo esta disminución de 4 a 5 veces mayor en personas de 70 años de edad (6). Debido a la facilidad, uso y estimación del auto-reporte de la raza, este se utiliza comúnmente en epidemiología, el auto-reporte de la raza afroamericana presenta una mayor prevalencia de la EAP en comparación con otros grupos étnicos (7). En el mundo más del 40 % de pacientes son asintomáticos (8).

Según la literatura, fumar es el factor de riesgo más importante en pacientes con EAP (9). El consumo de tabaco se encuentra directamente asociada con la progresión de EAP (10) y predispone a la formación, la progresión y la inestabilidad de las placas ateroscleróticas (11). El fumar aumenta hasta 7 veces el riesgo de la progresión de la EAP (12), existe una fuerte evidencia donde se ha encontrado que el riesgo de muerte, infarto de miocardio y amputación es mayor en aquellos sujetos que continúan fumando en comparación con aquellos que no lo hacen (13). El consumo de tabaco, también se han visto involucrado, además de la EAP, con otras patologías como la enfermedad arterial coronaria, angina de pecho, síndrome coronario agudo, muerte súbita, ictus, insuficiencia cardíaca congestiva y aneurismas de la aorta (14).

El desarrollo de la EAP, ha sido relacionada con la absorción de gran cantidad de radicales libres a partir del consumo del tabaco, lo que genera una relación estrecha con mecanismos protrombóticos y aterogénicos (15). El consumo del tabaco aumenta la coagulación de la sangre, la agregación plaquetaria y la formación de trombos, disminuye el aporte de oxígeno e induce a la disfunción endotelial, eleva los niveles de estrés oxidativo y la inflamación vascular (16). Se ha encontrado que los hidrocarburos aromáticos producidos durante la combustión del tabaco incrementan el riesgo a EAP (17) (Xu X, 2013). Un meta-análisis realizado en 55 estudios, reportó una asociación (OR= 1,54) de EAP para consumo de tabaco (18). Un estudio demuestra que las personas mestizas son más propensas a fumar

cigarrillo y tener EAP (37%), seguido de personas de piel negra no hispanos (26%) y blancos no hispanos (19%) (19).

En cuanto a los pacientes con DM2 presentan una predisposición genética al daño oxidativo, probablemente asociado a una marcada disfunción de las HDL, mediante la disminución de la capacidad para activar la enzima lecitin colesterol aciltransferasa, responsable de la conversión de HDL nacientes a HDL maduras, disminuyendo las propiedades anti-aterogénicas de las HDL (20). Se ha estimado que en los adultos con diabetes, la EAP se incrementa en mas del 20% (21). La Asociación Americana de Diabetes (ADA), recomienda el tamizaje de la EAP en pacientes diabéticos mayores a 50 años de edad, incluso el tamizaje puede ser realizado en personas menores de 50 años, con al menos otro factor de riesgo implicado en el desarrollo de EAP (22). El impacto de la diabetes como una comorbilidad asociada a EAP es significativo ya que la unión de estas dos enfermedades, conlleva a infecciones en el área del flujo sanguíneo obstruido, ocasionando la amputación de los miembros inferiores (23). La ADA pone de manifiesto que los hispanos en un (23%) y los afroamericanos en un (24%) son los grupos étnicos que presentan más casos combinados del binomio EAP y DM2 (19).

Por otra parte, la disminución en la biodisponibilidad de ON en la vasculatura reduce la capacidad para producir vasodilatación, lo cual contribuye a la aparición de presión alta (24). HTA es un factor de riesgo importante para la ECV, el daño renal y la EAP, se asocia a todos los trastornos vasculares y presenta un riesgo de 2 a 3 veces para EAP (25). Una revisión sistemática mostro que la hipertensión se encuentra asociada con la enfermedad (OR = 1,5) (26). Por otra parte un estudio reveló que las personas afrodescendientes son más propensas a desarrollar HTA y tener EAP (30%) en comparación con los blancos no hispanos (24%) (19).

También el metabolismo de los lípidos puede ser alterado dando lugar a cambios en la función y niveles de lipoproteínas en el plasma contribuyendo al desarrollo de EAP (27). El colesterol juega un papel importante en la aterogénesis, donde el éster de colesterol transportado por las partículas de lipoproteínas LDL se acumulan en la placa aterosclerótica (28), contrariamente se considera que las HDL juegan un papel fundamental en el tratamiento de enfermedades aterotromboticas mediante el transporte reverso de colesterol (29). Una revisión sistemática mostro que la dislipidemia se encuentra asociada con la enfermedad (OR = 1,1) (26). La prevalencia de dislipidemia en cuanto a niveles bajos de HDL es del 41% en Latinos respecto del 25% en negros no hispanos, por otra parte, la prevalencia de colesterol LDL varía del 12% en Latinos al 31% para negros no hispanos (19).

En cuanto a los factores de riesgo no modificables, encontramos que la prevalencia de EAP en la población general aumenta con la edad, en las personas mayores de 55 años se ha estimado del 3% al 29% y se ha encontrado que aproximadamente el 20% de personas mayores de 70 años la padecen (26). Por otra parte algunos datos sugieren que en mujeres jóvenes EAP es menor gracias al factor protector aterogénico de los estrógenos, pero después de la menopausia la frecuencia de

EAP es igual en hombres y en mujeres (30). Existen diferencias bien reconocidas en la fisiopatología subyacente de la enfermedad arterial con diferentes grupos étnicos, demostrando una mayor prevalencia de la enfermedad en afroamericanos y africanos no hispanos en comparación con individuos de ascendencia europea donde se presenta la enfermedad con menor frecuencia que en los afrodescendientes (27). En África Sub-sahariana se encuentran casos de EAP en personas desde los 55 años de edad en un 29% (31).

En este capítulo se pretenden caracterizar los factores de riesgo de pacientes Caucanos con EAP y determinar su asociación frente a personas sanas, para así determinar el riesgo de esta enfermedad en nuestra población.

Metodología

Diseño del estudio y selección de la población

Este es un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal, tipo caso-control 1:1, realizado entre 2011-2013, que incluyó 500 casos (sujetos EAP) y 500 controles (sujetos sin EAP), sin ninguna distinción de género o raza. Los grupos de estudio fueron seleccionados al azar a partir de un tamizaje de 10.000 personas mayores de 40 años pertenecientes a 36 de los 42 municipios del departamento del Cauca procedentes de la población general. Los controles fueron pareados a los casos teniendo en cuenta la edad, sexo y procedencia. Tanto los casos como los controles fueron tamizados mediante el ITB y para este estudio el total de la población aceptó participar.

Recolección de datos

La recolección de datos es descrita en la sección métodos del capítulo 1 de este trabajo.

ITB

El test de tamizaje del índice tobillo índice tobillo brazo (ITB) fue descrito en la sección métodos del capítulo 1 de esta tesis (Prevalencia de la EAP). Los valores de ITB obtenidos se utilizaron para la identificación de la EAP. Como pacientes fueron incluidos sujetos con un ITB < 0.90 , como controles se determinaron personas con valores normales de ITB entre 0.91-1.4, cuando el valor pronóstico de ITB se presentó > 1.4 , se excluyeron estos individuos, porque este valor está limitado a la calcificación arterial conocida como la arterioesclerosis (32-34).

Análisis estadísticos

El análisis de datos se realizó en el paquete estadístico SPSS versión 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Las variables numéricas fueron descritas mediante la media $\pm$ desviación estándar y las variables categóricas se expresaron en frecuencias y proporciones. Siguiendo criterios de normalidad, se utilizaron pruebas paramétricas para comparar grupos acorde con el tipo de variable, principalmente la prueba de t para medias independientes y la prueba de Chi-cuadrado para proporciones. Al ser este un estudio caso-control, se calculó la razón de momios (Odds Ratio, OR) como un estimado del riesgo relativo en la población. Los OR permitieron evaluar la hipótesis de asociación de riesgo entre un factor determinante (ej. hipertensión) y el desenlace (caso vs. control). Para ello, los OR se calcularon con sus respectivos intervalos de confianza al 95%, utilizando tablas de 2x2 y la estadística de Chi-cuadrado para estimar significancia, en un modelo de regresión logística. Adicionalmente, los OR fueron ajustados en el modelo agregando como covariables la edad (variable continua), sexo (femenino, masculino) y procedencia (urbano, rural). Finalmente, se utilizó como nivel de significancia un $p < 0.05$ y las pruebas estadísticas fueron de dos colas.

Resultados

En el presente estudio, fueron seleccionados al azar un total de 1000 sujetos (500 casos y 500 controles) a partir de una población tamizada mediante ITB de 10000 habitantes de 36 de los 42 municipios del departamento del Cauca. En la tabla 6 se muestran las características sociodemográficas de la población. Se observó un mayor porcentaje de mujeres con EAP (53,4%), respecto a los hombres (46,6%) y el 63,8% fueron de procedencia urbana. El número de individuos con EAP se incrementó notablemente con la edad, encontrándose el mayor porcentaje de pacientes con EAP en el rango de 70 a 79 años (43.25%). Debido a que se observó una diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles, dentro de la proporción de individuos de cada rango de edad en que fue estratificada la población, esta variable fue ajustada en los análisis de regresión logística.

Por otro lado, 75.4% de pacientes con EAP auto-reportaron pertenecer al grupo poblacional mestizo. En el grupo poblacional de raza afroamericana se presentó la mayor diferencia entre individuos con y sin EAP (8,2% vs 1.6%, $p < 0.001$). En cuanto al nivel educativo, no se observó diferencia significativa en las distintas categorías entre casos y controles ($p=0.36$). El 50% en ambos grupos, reportó haber alcanzado formación básica primaria y tan solo alrededor del 10% tuvieron formación a nivel técnico, universitario o de posgrado. Tabla 7

Tabla 7. Características Sociodemográficas de la Población de Estudio.

Variables	No EAP n (%)	EAP n (%)	P valor ^a
Género			1.000
Masculino	233 (46.6)	233 (46.6)	
Femenino	267 (53.4)	267 (53.4)	
Procedencia			0.508
Urbana	329 (65.8)	319 (63.8)	
Rural	171 (34.2)	181 (36.2)	
Categoría de Edad			< 0.001
40-49 años	5 (1.0)	11 (2.2)	
50-59 años	8 (1.6)	33 (6.6)	
60-69 años	205 (41)	109 (21.8)	
70-79 años	277 (55.4)	216 (43.2)	
≥ 80 años	5 (1.0)	131 (26.2)	
Raza Auto-asignada			< 0.001
Mestiza	383 (76.6)	377 (75.4)	
Blanca	55 (11.0)	49 (9.8)	
Negra	8 (1.6)	41 (8.2)	
Mulata	54 (10.8)	33 (6.6)	
Nivel Educativo			0.367
Ninguno	45 (9.0)	44 (8.8)	
Primaria	270 (54.0)	291 (58.2)	
Secundaria	137 (27.4)	111 (22.2)	
Técnico	15 (3.0)	20 (4.0)	
Universitario/posgrado	33 (6.6)	34 (6.8)	

P valor^a para prueba chi-cuadrado

La proporción de pacientes por género según los síntomas de EAP basados en la Clasificación de Fontaine se muestran en la Tabla 8. El 33% de hombres y mujeres

con EAP fueron asintomáticos y el síndrome más frecuente fue claudicación intermitente no limitante reportada por el 34,3% de los hombres y el 36% de las mujeres. Se presentó un mayor porcentaje de pacientes hombres 8,6% con la característica Fontaine III, dolor isquémico comparado con mujeres 4,8%, quienes a su vez presentaron mayor porcentaje 6,7% de Fontaine IV correspondiente a ulceración o gangrena comparado con hombres 4,4%. En cuanto a la historia familiar de ECV fue más frecuente IAM en hombres 44,2% respecto a mujeres 39,7%. En cuanto a los antecedentes de EAP, en hombres fueron del 14,6% mientras que en las mujeres 11,2%. La isquemia cerebral se presentó más en casos mujeres 14,2% y en los hombres fue de 13,3%.

Tabla 8. Características Clínicas de Pacientes con EAP

Variable	Pacientes Hombres n (%)	Pacientes Mujeres n (%)
Clasificación Fontaine		
I-Asintomático	77 (33,0)	88 (33,0)
Ila- Claudicación Intermitente no Limitante	80 (34,3)	96 (36,0)
Ilb- Claudicación Intermitente Limitante	46 (19,7)	52 (19,5)
III- Dolor Isquémico	20 (8,6)	13 (4,8)
IV- Ulceración o gangrena	10 (4,4)	18 (6,7)
Historia Familiar ECV		
Enfermedad Arterial Periférica		
No	199 (85,4)	237 (88,8)
Si	34 (14,6)	30 (11,2)
Infarto Agudo de Miocardio		
No	130 (55,8)	161 (60,3)
Si	103 (44,2)	106 (39,7)
Isquemia Cerebral		
No	202 (86,7)	229 (85,8)
Si	31 (13,3)	38 (14,2)

La Tabla 9 muestra la frecuencia de los factores de riesgo cardiovascular en la población de estudio. El 55,6% de personas con EAP fueron fumadores, con un consumo promedio de 270 ± 13.52 paquetes/año, 1.5 veces más que los controles ($p < 0.001$). La obesidad no estuvo relacionada con la presencia de EAP, mientras que individuos con hipertensión, diabetes y dislipidemia fueron significativamente más frecuentes en el grupo de casos ($p < 0.001$).

Tabla 9. Factores de Riesgo Cardiovascular de la Población de Estudio

Variables	No EAP	EAP	P valor^a
------------------	---------------	------------	----------------------------

	n (%)	n (%)	
Consumo de Cigarrillo			< 0.001
No	320 (64,0)	222 (44,4)	
Si	180 (36,0)	278 (55,6)	
Paquetes/año	180 ± 5.09	270 ± 13.52	< 0.001
Obesidad			0.936
No	403 (80,6)	402 (80,4)	
Si	97 (19,4)	98 (19,6)	
Hipertensión			< 0.001
No	164 (32,8)	61 (12,2)	
Si	336 (67,2)	439 (87,8)	
PAS	130,62 ± 22,73	138,44 ± 23,62	< 0.001
PAD	74,84 ± 10,85	76,86 ± 12,09	
Diabetes			< 0.001
No	453 (90,6)	360 (72,0)	
Si	47 (9,4)	140 (28,0)	
Glicemia	95,21 ± 21,67	112,28 ± 44,87	< 0.001
Dislipidemia			< 0.001
No	204 (40,8)	100 (20,0)	
Si	296 (59,2)	400 (80,0)	
Total-colesterol	194.43 ± 38,39	214,39 ± 55.0	< 0.001
HDL- colesterol	50.36 ± 13,59	45,32 ± 18,71	
LDL- colesterol	114.12 ± 36,83	135,26 ± 56,16	
Triglicéridos	147.59 ± 51,76	166,13 ± 60,46	

EAP= Enfermedad Arterial Periférica. Los datos son presentados como medias ± SD ó frecuencias. PAS= Presión Arterial Sistólica, PAD= Presión arterial Diastólica. P valor^a para prueba chi-cuadrado y prueba t.

Los ORs, crudos y ajustados por edad y raza, atribuibles a cada factor de riesgo para ECV se muestran en la Tabla 10. La obesidad no fue incluida en el modelo debido a que este factor no se presentó con mayor frecuencia en el grupo de individuos con EAP. Todos los factores de riesgo incrementaron significativamente el riesgo de EAP en la población estudiada. La raza afroamericana mostró el mayor incremento de riesgo (OR crudo=5.2; OR ajustado por edad=6.6). El riesgo atribuible a diabetes (OR = 3.8) y dislipidemia (OR = 2.8) no fueron modificados por las covariables raza y edad, mientras que hipertensión (OR crudo = 3.5; OR ajustado = 3) y cigarrillo disminuyeron levemente (OR crudo = 2.2; OR ajustado = 2.0).

Tabla 10. Odds Ratio (95% CI) Factores de Riesgo Asociados con EAP

Variables	No EAP n (%)	EAP n (%)	Crude OR (95% CI)	Adjuste OR ^{a/b} (95% CI)
-----------	-----------------	--------------	----------------------	---------------------------------------

Raza Auto-asignada^a				
Mestiza	383 (76.6)	377 (75.4)	1.0	1.0
Blanca	55 (11.0)	49 (9.8)	0,9 (1,60-1,36)	0,9 (0,61-1,41)
Negra	8 (1.6)	41 (8.2)	5,2 (2,41-11,25)	6,6 (3,00-14,78)
Mulata	54 (10.8)	33 (6.6)	0,6 (0,39-0,98)	0,7 (0,41-1,04)
Consumo de Cigarrillo^b				
No	320 (64,0)	222 (44,4)	1.0	1.0
Si	180 (36,0)	278 (55.6)	2,2 (1,73-2,87)	2,0 (1,53-2,60)
Hipertensión^b				
No	164 (32,8)	61 (12,2)	1.0	1.0
Si	336 (67,2)	439 (87,8)	3,5 (2,53-4,87)	3,0 (2,16-4,27)
Diabetes^b				
No	453 (90,6)	360 (72,0)	1.0	1.0
Si	47 (9,4)	140 (28,0)	3,8 (2,62-4,36)	3,8 (2,60-5,46)
Dislipidemia^b				
No	204 (40,8)	100 (20,0)	1.0	1.0
Si	296 (59,2)	400 (80,0)	2,8 (2,08-3,65)	2,8 (2,11-3,81)

EAP= Enfermedad Arterial Periférica, IAM= Infarto agudo de Miocardio, CI= Intervalo de confianza, OR=odds ratio. a Ajustado por edad b Ajustado por edad y raza

La Figura 7 muestra el porcentaje de la población con ausencia o presencia de 1 a 5 de los factores de riesgo de ECV evaluados. Alrededor del 30% de los individuos tanto sanos y con EAP presentaron al menos dos de los factores de riesgo CV evaluados, sin embargo el 40,6% de los individuos con EAP presentaron al menos tres factores comparado con el 23,6% de los controles. Así mismo el 19,2 de los casos presentaron 4 y 5 de los factores riesgo comparado con solo el 6,2 % de los controles.

La Tabla 11, muestra el análisis de interacción que se realizó con el propósito de determinar las combinaciones de los factores de riesgo más importantes para EAP. El análisis de dos factores mostró que la diabetes y el consumo de cigarrillo constituyen la combinación de mayor riesgo para el desarrollo de EAP (OR=5.6), seguida de hipertensión*diabetes (OR=4.3) y diabetes*dislipidemia (OR=3.7). En el modelo de tres factores se observó que los individuos fumadores*diabéticos*hipertensos tienen 6.6 veces mayor riesgo a EAP siendo la más alta de las interacciones analizadas. Los ORs ajustados por edad y raza mostraron consistentemente el efecto de las interacciones en el mismo orden de importancia.

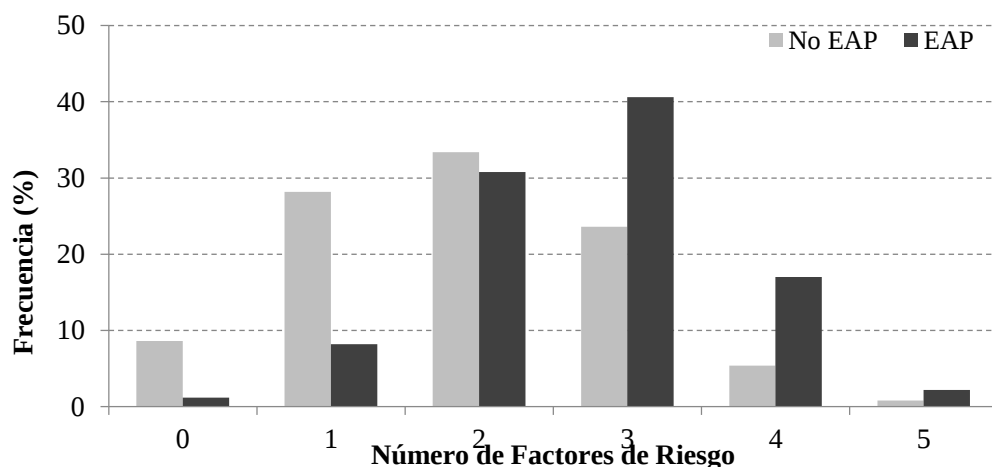


Figura 7. Frecuencia de factores de riesgo de ECV en casos y controles

(0-5 factores de riesgo) para los sujetos sin EAP (barras grises) y con EAP (barras negras)

Tabla 11. Interacción entre factores de Riesgo y odds ratio (95% CIs) en pacientes con EAP

Características	OR Crudo (95% CI)	OR Ajustado ^a (95% CI)
Cigarrillo *Hipertensión	3,1 (2,4-4,0)	2,7 (2,1-3,6)
Cigarrillo *Diabetes	5,6 (3,2-9,7)	5,2 (2,9-9,2)
Cigarrillo *Dislipidemia	2,5 (1,9-3,2)	2,3 (1,7-3,0)
Hipertensión *Diabetes	4,3 (2,9-6,4)	4,3 (2,9-6,5)
Hipertensión * Dislipidemia	3,5 (2,7-4,6)	3,2 (2,4-4,2)
Diabetes* Dislipidemia	3,7 (2,5-5,5)	3,8 (2,5-5,5)
Diabetes*Dislipidemia*Hipertensión	4,5 (2,9-7,0)	4,5 (2,9-7,0)
Cigarrillo* Hipertensión *Diabetes	6,6 (3,5-12,4)	6,4 (3,4-12,2)
Cigarrillo* Diabetes *Dislipidemia	5,0 (2,8-9,0)	4,6 (2,5-8,6)
Cigarrillo* Hipertension *Dislipidemia	3,3 (2,4-4,4)	2,9 (2,1-4,0)
Cigarrillo * Dilipidemia * Hipertensión *Diabetes	6,3 (3,2-12,5)	6,0 (3,0-12,1)

^aAjustado por edad y genero.

Discusión

La EAP unida a diferentes factores de riesgo, se presenta como predictora de mortalidad cardiovascular (26). Este estudio caso control reporta para el

departamento del Cauca, los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de EAP, correspondientes a hipertensión, diabetes, tabaquismo y dislipidemia, estos actúan conjuntamente para el desarrollo de esta patología, lo anterior es consecuente con lo reportado en otras publicaciones, donde estos factores de riesgo son los más conocidos (5), unidos a estos factores también se encuentran el incremento en la edad y la raza (4).

La Asociación Americana del Corazón mostro que la edad se encuentra correlacionada con la disminución de flujo sanguíneo y de los valores del índice tobillo brazo, siendo esta disminución de 4 a 5 veces mayor en personas de 70 años de edad (6) en nuestro estudio la frecuencia de aparición de la EAP aumenta en cada década de la vida a partir de los 40 años de edad y se incrementa entre los 70 a 79 años de edad (43.2%) con respecto a otras edades lo que es acorde con lo reportado en la Asociación Americana del Corazón.

Debido a la facilidad, uso y estimación del auto-reporte de la raza, este se utiliza comúnmente en epidemiología, el auto-reporte de la raza afroamericana presenta una mayor prevalencia de la EAP en comparación con otros grupos étnicos (35). Estudios demuestran que las influencias raciales, en particular los afrodescendientes tienden a tener lesiones periféricas vasculares de una manera frecuente (36) este factor de riesgo es tratado en los próximos capítulos de esta tesis. Acorde con la literatura, en nuestro estudio se ve un aumento significativo de la raza negra auto-reportada.

En el mundo cerca del 40 al 75% de pacientes son asintomáticos (8), en nuestra población aproximadamente la mitad de esa cifra no presentan síntomas 33%. La claudicación intermitente es el síntoma clásico de la EAP el 10% de los pacientes con EAP presentan claudicación intermitente (37), en nuestro estudio esta condición se presenta de una forma no limitante para el paciente 19,7% en hombres y 17,5% en mujeres. En cuanto a la claudicación intermitente limitante para la vida del paciente 34,3% en hombres y 36% en mujeres. Los resultados acerca de los síntomas de la enfermedad que obtuvimos para este estudio fueron basados en la clasificación propuesta por Fontaine en 1954 (8).

Según la literatura, fumar es el factor de riesgo más importante en pacientes con EAP; el consumo de tabaco se encuentra directamente asociado con la progresión de EAP (18) y predispone a la formación, la progresión y la inestabilidad de las placas ateroscleróticas (11). El fumar aumenta hasta 7 veces el riesgo de tener EAP (12), en nuestro estudio fumar mostro 2 veces más riesgo a padecer la enfermedad. Existe una fuerte evidencia donde se ha encontrado que el riesgo de muerte, IAM y amputación son mayores en aquellos sujetos que continúan fumando en comparación con aquellos que no lo hacen (13).

La obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas a nivel mundial y se asocia a numerosas comorbilidades, incluyendo hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo II, dislipidemia, la apnea obstructiva del sueño, ciertos tipos de cáncer, y las principales enfermedades cardiovasculares. La obesidad tiene un impacto importante en las enfermedades cardiovasculares, como la insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, muerte súbita cardíaca y fibrilación auricular, se asocia con

una reducción de la supervivencia global, la obesidad aumenta el volumen de sangre en total y el gasto cardíaco, con un nivel más bajo de la resistencia periférica total. A pesar de esta asociación, numerosos estudios han documentado una paradoja de la obesidad, en el que las personas con sobrepeso y obesos con enfermedad cardiovascular establecida, incluyendo hipertensión, cardiopatía coronaria y EAP, tienen un mejor pronóstico en comparación con pacientes no obesos (38). Galal et al, (39) han evaluado recientemente la mortalidad en 2392 pacientes con PAD que habían sido sometidos a cirugía vascular mayor y tenían alto riesgo de mortalidad y se encontró una poderosa paradoja de la obesidad, con reducción progresiva de la mortalidad en IMC normal, sobrepeso y grupos de obesos en comparación con los pacientes con bajo peso. En esta investigación se presenta dicha paradoja y se puede observar claramente que no existe asociación de la enfermedad con dicha condición.

La hipertensión se asocia positivamente con la EAP, como se observa en la encuesta Nacional de Nutrición en Salud (NHANES), muestra riesgo de 1,75 veces para la patología (40). En nuestro estudio la hipertensión presenta un riesgo ajustado de 3,0 veces más por tanto comparado con la escala mundial el riesgo de la hipertensión para EAP, es el casi el doble que en el resto del planeta.

La incidencia de las enfermedades cardiovasculares, mortalidad y morbilidad, debido a la aterosclerosis, es mayor entre los pacientes con diabetes que en aquellos sin diabetes (41). El control intensivo de la diabetes, incluyendo el control de la glicemia, el tratamiento de hipertensión y dislipidemia, así como las intervenciones no farmacológicas, disminuye tanto las complicaciones micro y macrovasculares (42). La diabetes es uno de los predictores más fuertes de EAP, incluyendo una mayor mortalidad y amputación de miembros inferiores; este último se predice por la presencia de neuropatía, retinopatía, ITB bajo, y el sexo masculino (43). En este estudio se observa un riesgo de (OR = 3.8) para la enfermedad, constituyéndose la diabetes en la comorbilidad más fuertemente asociada al desarrollo de EAP en nuestra población.

La relación entre el colesterol y la aterosclerosis se caracteriza principalmente por un aumento en la concentración plasmática de ésteres de colesterol en la capa íntima de las arterias, que produce una lesión conocida como una estría grasa, como este proceso continúa con el tiempo, conduce a lesiones más avanzadas como la placa aterosclerótica. El transporte de colesterol-LDL en plasma y su depósito en la capa íntima de las arterias puede iniciar el proceso aterosclerótico. En este estudio los valores de LDL fueron limítrofe a 135,26 mg/dL en pacientes, mientras que en los controles fue de 114, 12 mg/dL conocido en los laboratorios como cerca de un nivel óptimo. HDL puede eliminar el exceso de colesterol de las células, incluyendo macrófagos cargados de colesterol en las lesiones ateroscleróticas. En nuestro estudio los controles presentan un mejor índice de HDL 50,36 mg/dL , respecto a los casos 45,32 mg/dL , sin embargo se encuentran dentro del rango óptimo (40-60 mg/dL). El desequilibrio de ambas lipoproteínas determina el inicio, progresión y complicaciones de la placa aterosclerótica y por lo tanto la enfermedad. Joostem MM et al reportó para el año 2012 una asociación de la

dislipidemia en hombres con EAP con un riesgo atribuible de 17 veces (44). En nuestro estudio se observa un riesgo de 2.8 veces más en pacientes dislipidémicos para la enfermedad.

Adicionalmente en este estudio las interacciones entre cigarrillo*diabetes muestran un riesgo ajustado por edad y raza (OR = 5.2). Por otra parte al unir cigarrillo*diabetes* hipertensión se muestra el riesgo más fuerte para la enfermedad (OR = 6.4).

Esta investigación persigue en una próxima fase, no solo la inclusión de factores de riesgo, clínicos y sociodemográficos, sino también el análisis de polimorfismos genéticos y ancestría que soporten la fisiopatología de la enfermedad, donde se espera que la corriente de esta investigación arroje resultados para la modificación de factores de riesgo responsables de EAP que logren a futuro minimizar la prevalencia de la enfermedad.

Bibliografía

1. Manterola C. Estrategias de investigación. Diseños observacionales 2a parte. Estudio de casos y controles. Chil Cir. 2001;53:316-20,.
2. Manterola CO, T. Estudios observacionales: Los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. Int J Morphol. 2014.;32:634-45,.
3. Das JR ER. Contemporary risk assessment and cardiovascular outcomes in peripheral arterial disease. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2013;13:185-96.
4. Norgren L HW, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA,. TASC II Working Group. Intersociety consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). Eur J Vasc Endovasc Surg. 2007;33:75.
5. Gherman CD PD, Bolboacă SD. Association of atherosclerotic peripheral arterial disease with adiponectin genes SNP+45 and SNP+276: a case-control study. Biomed Res Int 2013:2013.
6. Olin JW AD, Belkin M, Bonow RO,. ACCF/AHA/ACR/SCAI/SIR/SVM/SVN/SVS 2010 performance measures for adults with peripheral artery disease. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association. Vasc Med. 2010;15:481-512.
7. Matthew D. Muller ABR, Urs A. Leuenberger, and Lawrence I. Sinoway. Physiology in Medicine: Peripheral arterial disease. J Appl Physiol. 2013;115:1219-26.
8. Abdulhannan P RD, Homer-Vanniasinkam S. Peripheral arterial disease: a literature review. Br Med Bull. 2012;104:21-39.
9. Diehm N, Schmidli J, Setacci C, Ricco J-B, de Donato G, Becker F, et al. Chapter III: Management of cardiovascular risk factors and medical therapy. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2011;42:S33-S42.
10. Lu L, Mackay D, Pell J. Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. Heart. 2014;100:414-23.
11. Rubenstein D, Jesty J, Bluestein D. Differences between mainstream and sidestream cigarette smoke extracts and nicotine in the activation of platelets under static and flow conditions. Circulation. 2004;109:78-83.
12. El-Menyar A, Al Suwaidi J, Al-Thani H. Peripheral arterial disease in the Middle East: Underestimated predictor of worse outcome. Global cardiology science & practice. 2013;2013:98.

13. Willigendael EM, Teijink JA, Bartelink M-L, Peters RJ, Büller HR, Prins MH. Smoking and the patency of lower extremity bypass grafts: a meta-analysis. *Journal of vascular surgery*. 2005;42:67-74.
14. Siasos G TV, Kokkou E, Oikonomou E, Vavuranakis M, Vlachopoulos C, Verveniotis A, Limperi M, Genimata V, Papavassiliou AG, Stefanadis C, Tousoulis D. Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Curr Med Chem*. 2014;21:3936-48.
15. Fernández M MB. Tabaco y corazón. Programas actuales del control del hábito. *Clin Invest Arterioscl*. 2010;22:167–73.
16. Benowitz N. Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:57-71.
17. Xu X HH, Kearney GD, Kan H, Sheps DS. Studying the effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on peripheral arterial disease in the United States. *Sci Total Environ* 2013:341-7.
18. Lu L MD, Pell JP. Meta-analysis of the association between cigarette smoking and peripheral arterial disease. *Heart*. 2014;100:414-23.
19. Aponte J. The prevalence of peripheral arterial disease (PAD) and PAD risk factors among different ethnic groups in the US population. *J Vasc Nurs*. 2012;30:37-43.
20. Nobecourt E DM, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, Januszewski AS, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye KA. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia*. 2007;50:643-53.
21. Loprinzi PD AK. Association of diabetic peripheral arterial disease and objectively-measured physical activity: NHANES 2003-2004. *J Diabetes Metab Disord*. 2014:63.
22. American Diabetes Association. Peripheral Arterial Disease in People With Diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26:3333–41.
23. Malone M LN, White J. The effect of diabetes mellitus on costs and length of stay in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;48:447-51.
24. Gonzalez J PF. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res*. 2011;34:431-40.
25. Lawes CM VHS, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease. *Lancet*. 2008:1513–8.

26. Fowkes DR, I. "Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *The Lancet*. 2013;382:1329–440.
27. Bennett PC SS, Gill PS, Lip GY. Ethnicity and peripheral artery disease. *QJM*. 2009;102:3-16.
28. Badimon L SR, Vilahur G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2011;105:34.
29. Choi BG VG, Yadegar D, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ. The role of high-density lipoprotein cholesterol in the prevention and possible treatment of cardiovascular diseases. *Curr Mol Med*. 2006;6:571-87.
30. Teodorescu VJ VA, Kibbe MR. Peripheral arterial disease in women. *J Vasc Surg*. 2013;57:18-26.
31. Moran A FM, Sampson U, Chugh S, Feigin V, Mensah G. The epidemiology of cardiovascular diseases in sub-Saharan Africa: the Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors 2010 Study. *Prog Cardiovasc Dis*. 2013;56:234-9.
32. Rooke TW HA, Misra S, Sidawy AN, Beckman JA, Findeiss LK,. ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:2020-45.
33. Xu D LJ, Zou L, Xu Y, Hu D, Pagoto SL,. Sensitivity and specificity of the ankle-brachial index to diagnose peripheral artery disease: a structured review. *Vascular Medicine*. 2010;15:361-9.
34. Diehm C LS, Darius H, Pittrow D, von Stritzky B, Tepohl G,. Association of low ankle brachial index with high mortality in primary care. *European heart journal*. 2006;27:1743-9.
35. Allison MA PC, Wassel CL, Aboyans V, Arnett DK, Cushman M, Eng J, Ix J, Rich SS, Criqui MH. Genetic ancestry and lower extremity peripheral artery disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Vasc Med*. 2010;13:351-9.
36. Criqui MH VV, Denenberg JO. Ethnicity and peripheral arterial. *Circulation* 2005;112:2703.
37. Guidon M MH. Exercise-based interventions and health-related quality of life in intermittent claudication: a 20-year (1989-2008) review. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2010;17:140-54.
38. Lavie CJ MR, Artham SM, Patel DA, Ventura HO. The obesity paradox, weight loss, and coronary disease. *Am J Med*. 2009;122:1106-14.

39. Galal W vGY, Hoeks SE, Sin DD, Winkel TA, Bax JJ, Verhagen H, Awara AM, Klein J, van Domburg RT, Poldermans D. The obesity paradox in patients with peripheral arterial disease. *Chest*. 2008;5:925-30.
40. Selvin E ET. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation*. 2004;110:738-43.
41. Balakumar P. Implications of fundamental signalling alterations in diabetes mellitus-associated cardiovascular disease . *Indian J Biochem Biophys*. 2014;51:441-8.
42. Boussageon R GF, Cornu C. Effects of pharmacological treatments on micro- and macrovascular complications of type 2 diabetes: what is the level of evidence? *Diabetes Metab*. 2014;40:169-75.
43. Shammass. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3:229-34.
44. Joosten MM PJ, Bertoia ML, Rimm EB, Spiegelman D, Mittleman MA, Mukamal KJ. Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men. *JAMA*. 2012;308:1660-7.

Capitulo IV – Ancestría y su asociación con la Enfermedad Arterial Periférica

Introducción

A nivel mundial el estudio de las poblaciones genéticamente mezcladas, ha logrado determinar la ancestría relacionada con enfermedades complejas, como las enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer, entre otras patologías multifactoriales (1, 2). El escenario de la mezcla genética continua de tres poblaciones continentales (nativos americanos, los colonos europeos y los africanos) ha sido Norte América (3). En este sitio los Hispanos tienen una estructura poblacional compleja que varía con los factores ambientales y culturales vinculados al país de origen, donde las enfermedades complejas tienen ascendencia principalmente caucásica y africana (4, 5).

Por otra parte los Latinos, tienen diferentes proporciones de ascendencia genética de nativos americanos, africanos y europeos, en parte por las interacciones locales con los inmigrantes traídos por la trata de esclavos y la colonización europea de las poblaciones indígenas (6, 7). En Sur América y el Caribe existen diferentes perfiles genéticos, acordes con la historia de cada población (8-10). En base a los perfiles genéticos se han diseñado paneles de marcadores informativos de ancestría (AIMs) para estudios caso-control, donde se ha probado la asociación estadística entre variantes genéticas y rasgos biomédicos (11).

Actualmente Colombia cuenta con poblaciones mestizas producto de la mezcla de grupos ancestrales nativos americanos, africanos y europeos (12-14). Al igual que la población Colombiana en general, la población Caucana es mestiza como resultado de la mezcla de las tres poblaciones parentales (15, 16). Estudios de ascendencia genética de las poblaciones humanas y enfermedades complejas de las regiones altamente mezcladas como Cauca se considera lugares ideales para determinar patrones de mezcla (17).

El mestizaje ocasiona que en estudios de casos y controles, se pueda presentar estratificación entre los grupos, lo que puede generar resultados erróneos de asociación; por lo tanto, para los estudios de asociación en genes candidatos en poblaciones mezcladas, es necesario el uso de marcadores genéticos informativos de ancestría (AIMs) que permitan calcular la composición ancestral individual, y hacer uso de esta en la corrección de los análisis de asociación (18).

La genética que conduce a la susceptibilidad de EAP aún no se han elucidado totalmente (19). La aparición de la EAP se diferencia por grupo étnico, en concreto, los afroamericanos tienen la más alta prevalencia de EAP, seguida por los nativos americanos, americanos caucásicos e hispanos estadounidenses, estas diferencias raciales / étnicas específicas en la EAP persisten después del ajuste para los factores de riesgo cardiovasculares(20).

Los análisis de ancestría con EAP en afroamericanos, estudian a menudo una combinación de africanos y europeos, mientras que en los hispanos se analiza una ascendencia africana, americana y europea (21). Los análisis con AIMs se asocian con una mayor prevalencia de la enfermedad en los afroamericanos en comparación con los caucásicos(22). Las diferencias étnicas relacionadas se han documentado

con una mayor asociación de factores de riesgo cardiovascular, conocidos por estar vinculados a enfermedades de origen aterosclerótica como EAP (23). Por otra parte los síntomas de claudicación intermitente existen en un 42% de afroamericanos en comparación con el 22% y el 28% de pacientes caucásicos y latinos, respectivamente (24). Se ha demostrado que las diferencias étnicas persisten en los problemas vasculares periféricos, experimentando una mayor probabilidad de amputación en pacientes afroamericanos (25).

Se ha demostrado que el aumento de los niveles de la ascendencia nativo americana entre los hispanoamericanos presenta una menor probabilidad de EAP (21). Para Latino América y Colombia esta es la primera investigación que logra caracterizar la ancestría de la EAP.

Metodología

Declaración de ética

Los cuestionarios, procedimientos y protocolos utilizados fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca, teniendo en cuenta las directrices y principios bioéticos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y los parámetros señalados en la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Colección de muestras y extracción de ADN

En un primer análisis de ancestría todas las muestras de ADN utilizadas se obtuvieron de 500 individuos no relacionados para caracterizar la población Caucana de la región central norte, sur y occidente del departamento; posteriormente en un segundo análisis de ancestría, los individuos antes mencionados fueron utilizados como controles frente a 500 casos con EAP, sin distinción de género, que accedieron a participar mediante un consentimiento informado escrito.

Las muestras obtenidas a partir de sangre periférica, se almacenaron en tubos que contienen ácido etil diamino tetra acético (EDTA) y se codificaron para proteger la identidad de cada participante. A continuación, el ADN se extrajo utilizando el procedimiento de Salting Out (26). A una concentración de ADN de 30 ng/dL, cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Genotipificación de marcadores genéticos de ancestría

La información de los marcadores genéticos empleados se obtuvo de la base de datos Marshfield (<http://www.marshfieldclinic.org/mgs/>) (27). Se utilizó un conjunto de 46 AIMS-InDels, previamente reportados y validados para las poblaciones humanas Africanas, Europeas y Nativo Americanas (28) Tabla 12. La amplificación y genotipado de los 46 AIMS-InDels se realizó usando el kit PCR multiplex de la compañía QIAGEN (Turnberry Ln, Valencia, CA 91355, EE. UU.) (29).

Tabla 12. Descripción de primers específicos para InDels

INDE L	RS NUMERO	CROMOSOM A	POSICION BP	ALELOS
MID- 1470	rs2307666	11	64729920	-GTTAC
MID- 777	rs1610863	16	6551830	-/GAA
MID- 196	rs16635	6	99789775	-/CAT
MID- 881	rs1610965	5	79746093	-/ACTT
MID- 3122	rs3545135 9	18	45110983	-/ATCT
MID- 548	rs140837	6	3708909	-/CT
MID- 659	rs1160893	2	22479457 7	-/CT
MID- 2011	rs2308203	2	10940129 1	-/CTAGA
MID- 2929	rs3397416 7	8	87813725	-/TA
MID- 593	rs1160852	6	13734585 7	-/TT
MID- 798	rs1610884	5	56122323	-/GGGAAA
MID- 1193	rs2067280	5	89818959	-/AT
MID- 1871	rs2308067	7	12729154 1	-/TT
MID- 17	rs4183	3	3192524	-/TAAC
MID- 2538	rs3054057	15	86010538	-/AACA
MID- 1644	rs2307840	1	36099090	-/GT
MID- 3854	rs6061242 4	6	84017514	-/TCTA
MID- 2275	rs3033053	14	42554496	-/TCAGCAG
MID- 94	rs16384	22	42045009	-/AAC
MID- 3072	rs3461187 5	18	67623917	-/GCCCCCA
MID- 772	rs1610859	5	12831727 5	-/TAG
MID- 2313	rs3045215	1	23474091 7	-/ATTATAACT
MID- 397	rs25621	6	13985815 8	-/TTCT

MID-1636	rs2307832	1	55590789	-/AA
MID-51	rs16343	4	17635560	-/TTTAT
MID-2431	rs3031979	8	73501951	-/ATTG
MID-2264	rs3412282	13	63778778	-/AAGT
MID-2256	rs133052	22	41042364	-/CAT
MID-128	rs6490	12	10812716	-/ATT
MID-15	rs4181	2	42577803	-/AAATACACAC
MID-2241	rs3030826	6	67176774	-/GTCCAATA
MID-419	rs140708	6	17072001	-/AATGGCA
MID-943	rs1611026	5	82545545	-/TGAT
MID-159	rs16438	20	25278470	-/CCCCA
MID-2005	rs2308161	10	69800909	-/AACAAT
MID-250	rs16687	7	83887882	-/CA
MID-1802	rs2307998	5	7814345	-/GGA
MID-1607	rs2307803	3	10898103	-/TG
MID-1734	rs2307930	6	84476378	-/CCAT
MID-406	rs25630	6	14734341	-/AG
MID-1386	rs2307582	1	24776877	-/AAACTATTCATTTTTTCACCCT
MID-1726	rs2307922	1	39896964	- /CAAGAACTATAAT/CACTATCT A
MID-3626	rs1126792	15	45526069	-/AATATAATTTCTCCA
MID-360	rs25584	12	11214521	-/AA
MID-1603	rs2307799	5	70828427	-/TTGT
MID-2719	rs3454139	20	30701405	-/AACT

Preparacion de primers para reaccion en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir de 46 pares de primer Forward (F) y Reverse (R), se realiza la preparación de los primers de un multiplex que se fracciona en un panel de Multiplex M1 con (16 InDels marcados con verde fluorescencia y 8 InDels marcados con rojo rodamina) y un panel de Multiplex M2 con (11 InDels marcados con verde fluorescencia y 11 InDels marcados con rojo rodamina), el motivo de esta división fué para que no se traslapen los marcadores durante la electroforesis, se tuvo en cuenta que las inserciones por cada marcador varían entre 2 a 10 pb.

Posteriormente, se realizó la preparación de soluciones stock de 50 µM:

Inicialmente se reconstituyeron los primers, que una vez centrifugados se disolvieron en agua estéril, a un volumen 10 veces la constitución en nanomoles reportada por el fabricante, de esta manera se obtuvo un primer a una concentración de 100 µM.

Se tomaron 100 µL de los primers F y R a una concentración de 100 µM, quedando un volumen de 200 µL de primers a una concentración de 50 µM .

Para realizar la multiplex de cada Indel se tomaron 2 microlitros de volumen.

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$V_1= 2\mu\text{m}\cdot 250\mu\text{L}/50\mu\text{M}$$

$$v_1= 10\mu\text{l}$$

De cada marcador se adicionó 10mL, a saber, se emplearon 5 marcadores de cada uno se tomó 10uL por tanto sumaron 50 uL, se les adicionó 200uL de agua y se completó hasta un volumen final de 250uL. Posteriormente se realizó la PCR.

Reaccion en Cadena de la Polimerasa

Se realizaron los cálculos para la mezcla de la reacción de PCR (Tabla 13 y 14), multiplicando el volumen (μL) por muestra, por el número total de individuos, preparando un exceso del 10 al 15% de la mezcla. Posteriormente se prepararon las mezclas de la reacción de la batería de 46 marcadores InDels, según protocolo del laboratorio Genes Ltda (datos no publicados), el volumen final por muestra fue de 6 μL ; para cada montaje se tuvo un control negativo bajo las mismas condiciones.

Tabla 13. Mezcla de reactivos para PCR

Reactivos	μL / muestra
Agua	1.9
Mix Quiagen Multiplex PCR	3.0
Primers	0.6
ADN	0.5
Volumen Final	6

Tabla 14. Perfil térmico para PCR multiplex

Pre-incubación/ Desnaturalizaci	Annealig 10 ciclos	Annealig 20 ciclos	Extensión Final	Almacenamiento
95°C 15 minutos	94°C 30 Segundos 60°C 1.5 Minutos 70°C 1 Minutos	94°C 30 Segundos 58°C 1.5 Minutos 72°C 1 Minutos	60°C 10 Minutos	15°C 10 Infinito

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Preparación del gel

Con previo lavado de los vidrios, posteriormente se preparó un gel de poliacrilamida al 5%, con las siguientes cantidades:

1. 40 mL de acrilamida
2. 50 mL de temed
3. 300 μ L de persulfato de amonio

Una vez preparada la poliacrilamida, se adicionó la solución al 5% a través del espacio entre los vidrios de forma uniforme evitando la formación de burbujas, finalmente se colocó la peineta por el lado plano para hacer el borde donde se elaboraron los pozos y se dejó polimerizar durante una hora.

Siembra de la muestra

Las muestras amplificadas se desnaturalizaron durante tres minutos en el termociclador a 95°C y se les adicionó 10 μ L Buffer de carga, después de esto se pusieron las muestras en hielo, simultáneamente se preparó el marcador de peso molecular depositando 1 μ L de este y 4 μ L de buffer de carga.

Se pre-calentaron los geles por 40 minutos a una temperatura de 45 °C, luego se sembraron las muestras, cuidando de que el buffer de corrido TBE 1.0X cubra los geles en ambos tanques. Una vez terminada la siembra, se reanudó el suministro de corriente al sistema (1hora/30 min).

Migración de las muestras mediante la cámara de electroforesis vertical

En la cámara de electroforesis se colocaron los vidrios centrados evitando que la tapa superior de la cámara chocara con estos. Se unieron los vidrios en la cámara con la barra sujetadora y con las pinzas laterales. Se Llenaron los tanques con buffer de corrido TBE 1.0X de modo que el buffer del tanque superior este siempre por encima del borde del vidrio con muescas. Se conectaron los cables de las tapas de la cámara de electroforesis a la fuente de poder a (2000V, 60W y 30mA).

Captura de imagen

Se realizó una limpieza exhaustiva de ambos vidrios con toallas de papel humedecidas mediante agua desionizada, posteriormente se visualizaron los geles en el analizador FMBIO IIe, con posterior lectura mediante un computador.

Análisis estadístico

A partir de los datos de alelos y genotipos en los marcadores autosómicos se realizó una prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) bajo la hipótesis nula de una distribución aleatoria de genotipos en un loci, que depende de las probabilidades dadas por sus frecuencias alélicas k ($P^2 + 2pq + q^2 = 1$; $p + q = 1$). Con la prueba se determina la probabilidad de encontrar combinaciones de kk genotipos heterocigotos u homocigotos menor o igual que los observados. La significancia de esta desviación se determinó obteniendo estimativos de probabilidades a través de una cadena de Markov con una longitud de 10000 iteraciones, en la cual la cadena explora todas las posibles generadas en una combinación aleatoria de los k alelos. Los genotipos que se presenten con una mayor probabilidad que la de una distribución aleatoria se encuentran en desequilibrio HW. Debido a que la fase gamética es desconocida, la prueba sólo puede realizarse en cada locus individualmente (30). Para obtener la significancia de la prueba controlando los diferentes tamaños entre las muestras, se realizó adicionalmente una prueba de Bonferroni (31).

Se realizaron las comparaciones en la estructura genética de la población mediante las distancias genéticas pareadas (F_{ST}) utilizando Arlequin v 3.5 (30). Para una visualización más fácil de las distancias genéticas observadas se realizó un escalamiento multidimensional (MDS), utilizando STATISTICA v 7.0. El análisis MDS, fue realizado entre las muestras caucanas, utilizándose como control muestras brasileiras proporcionadas por la doctora Leonor Gusmão de la Universidad de Rio de Janeiro en Brasil (32).

El software STRUCTURE v 2.3.4, se utilizó para determinar la mezcla ancestral de la población de estudio y para inferir la asociación de la ancestría con la enfermedad, este consistió en un método de agrupamiento usando datos genotípicos, el análisis asumió un modelo en el cual existen K poblaciones ancestrales. Los individuos que representaron las poblaciones mestizas fueron probabilísticamente asignados a una de las K poblaciones o a dos o más K poblaciones si su genotipo indicó que corresponde a un individuo mestizado. Se asumió una contribución triple híbrida de los nativos americanos, europeos y africanos ($K = 3$) a la composición genética de la población actual del Cauca. El software se corrió con 100.000 iteraciones de Markov Chain Monte Carlo, empleando la opción "Usar la población de información para la prueba de migrantes" con el modelo de mezcla; adicionalmente las frecuencias alélicas fueron correlacionadas y actualizadas utilizando sólo los individuos con POPFLAG = 1 (en este caso, las muestras usadas como referencia) (32).

Resultados

Se muestrearon aleatoriamente sujetos en el departamento del Cauca, encontrándose 67,2% individuos en la región central, 1,2% en el norte, 26,6% en el sur y 5,0% en el oeste Figura. 8.

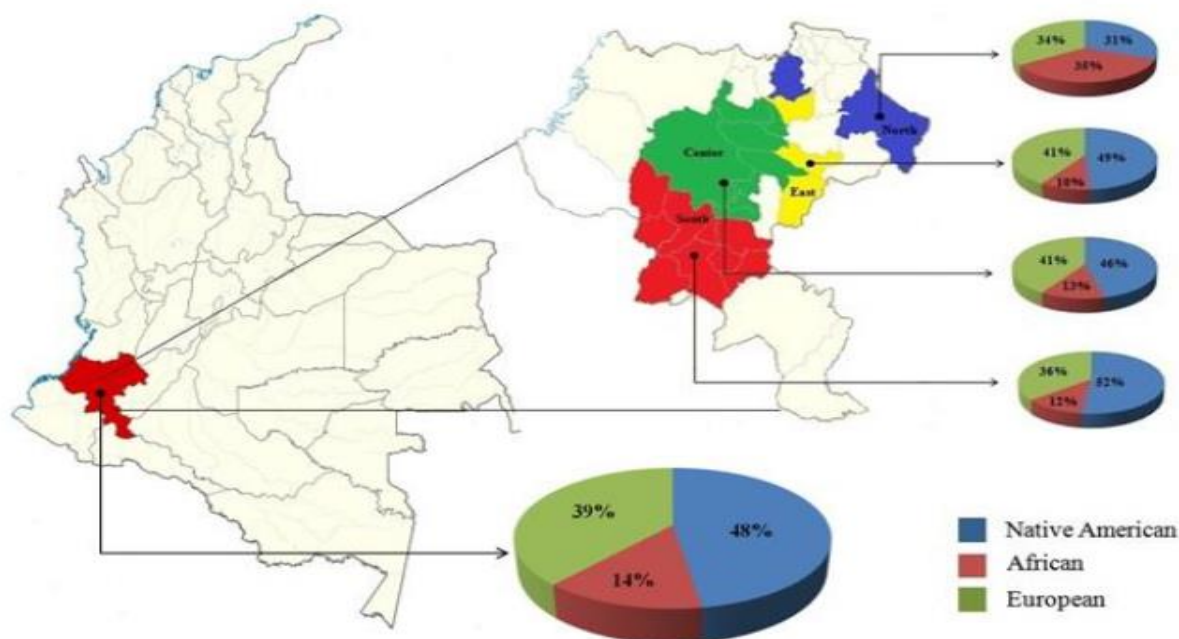


Figura 8. Mapa de la distribución ancestral del Departamento del Cauca:

(Nativos Americanos, africanos y Europeos).

Lectura de geles

Se realizó la lectura de geles, la banda superior corresponde al homocigoto denominado (2), la banda inferior corresponde al homocigoto denominado (1), las dos bandas corresponden al individuo heterocigoto denominado (1 2), los paneles de los marcadores AIMS fueron divididos inicialmente en m1 y m2. Figuras 9, 10, 11 y 12.

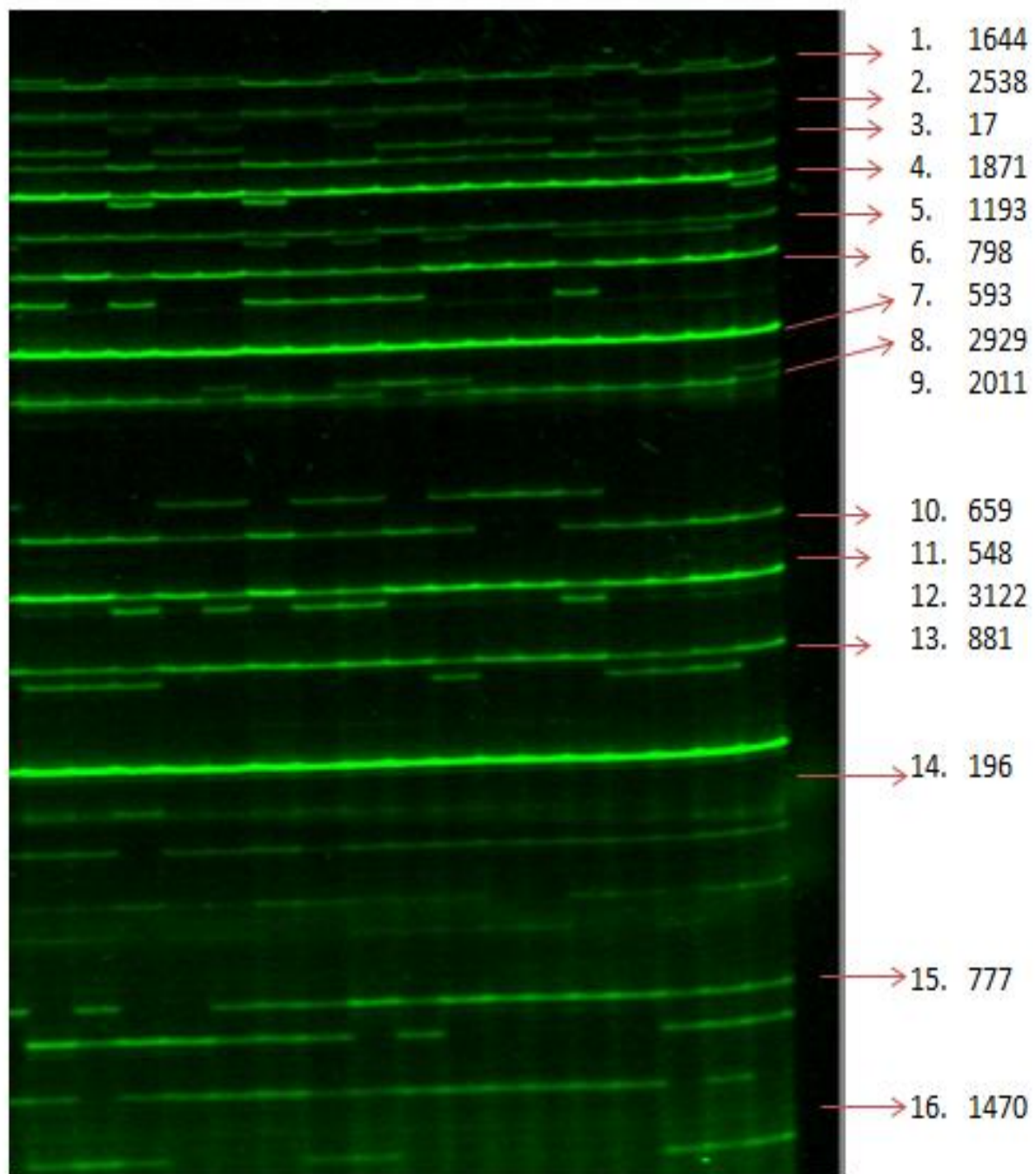


Figura 9. Marcadores InDels M1 marcados con verde fluorescencia GFP

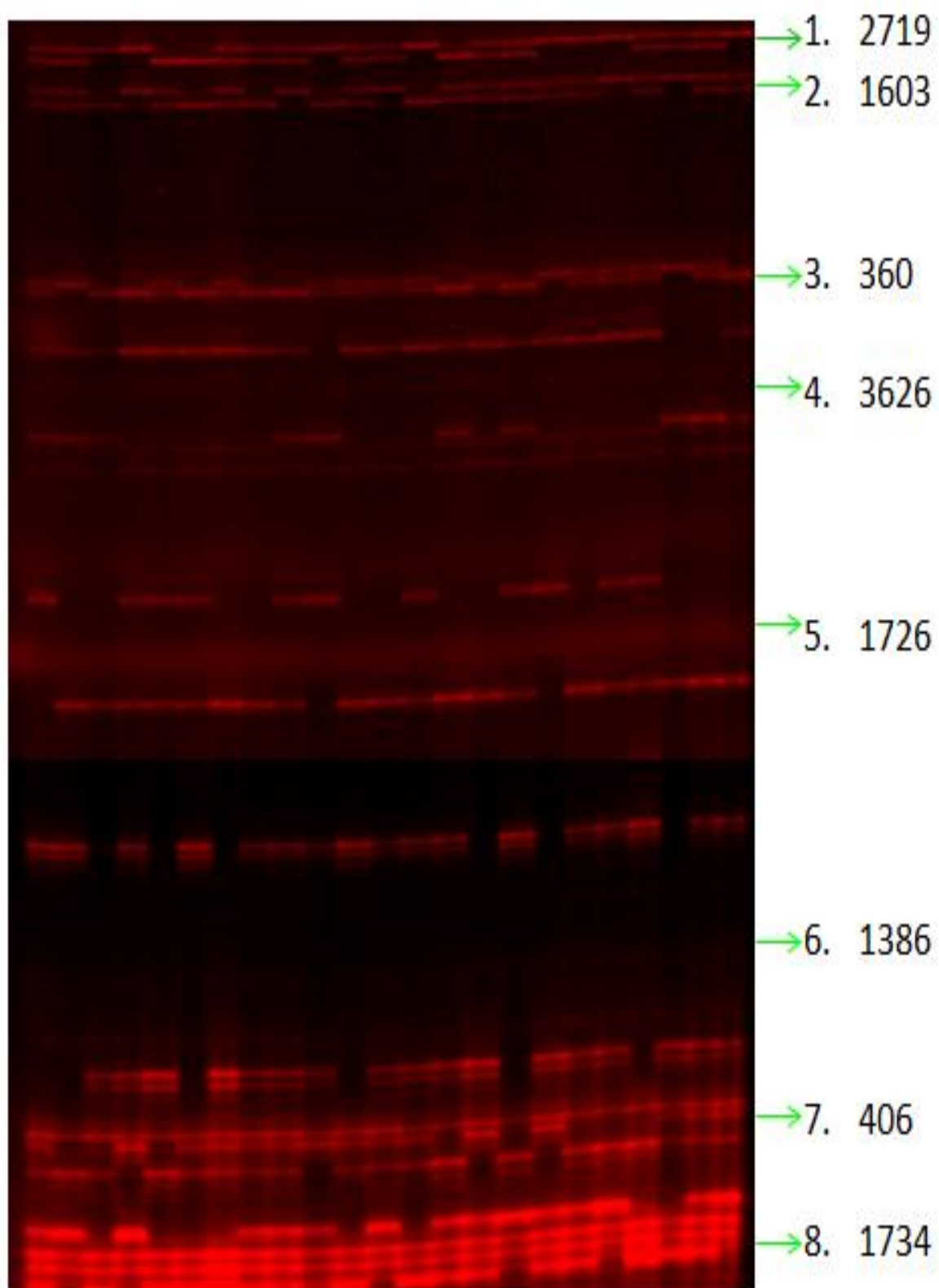


Figura 10. Marcadores InDels M1 marcados con fluorescencia Rojo Rodamina.

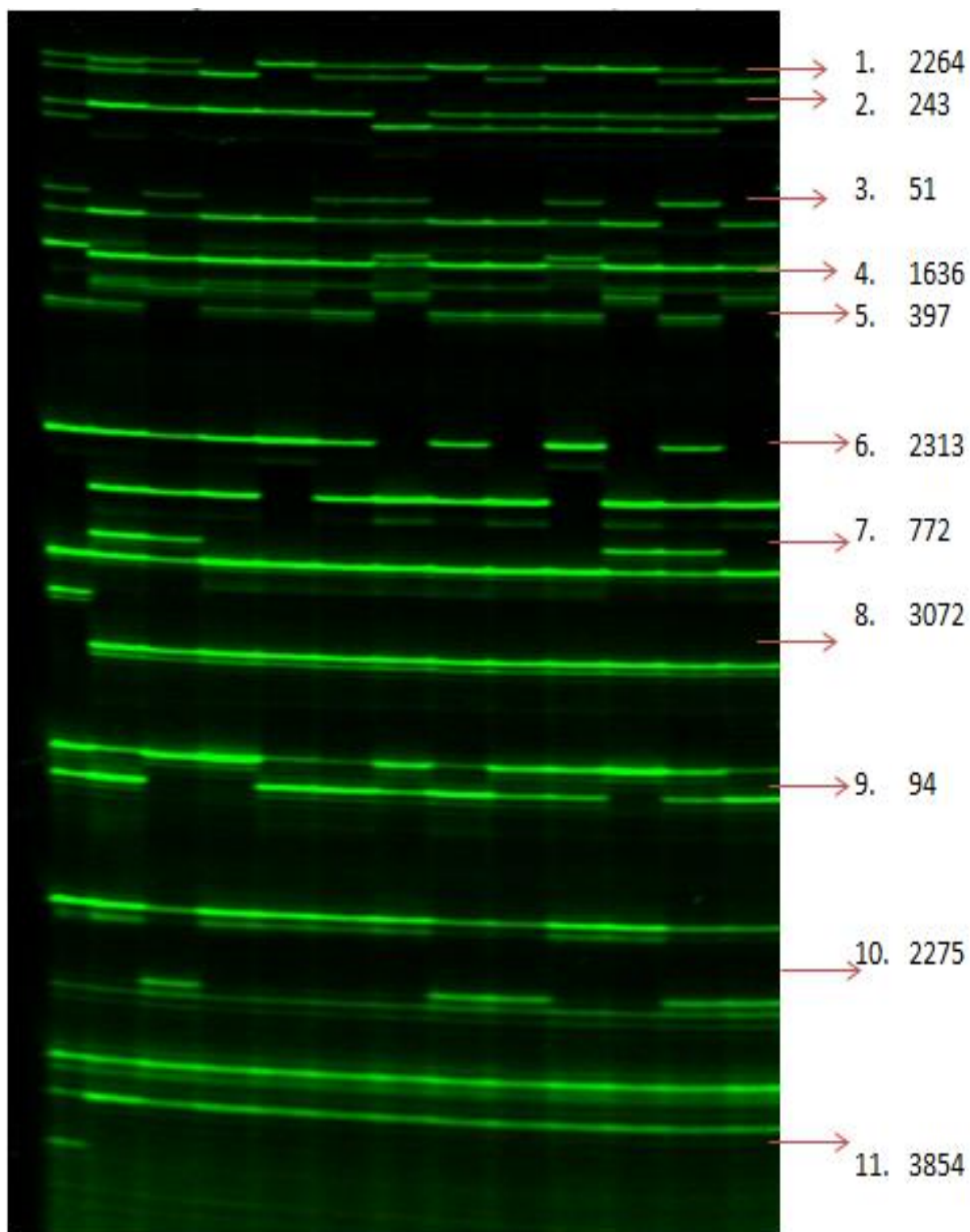


Figura 11. Marcadores InDels M2 marcados con verde fluorescencia.

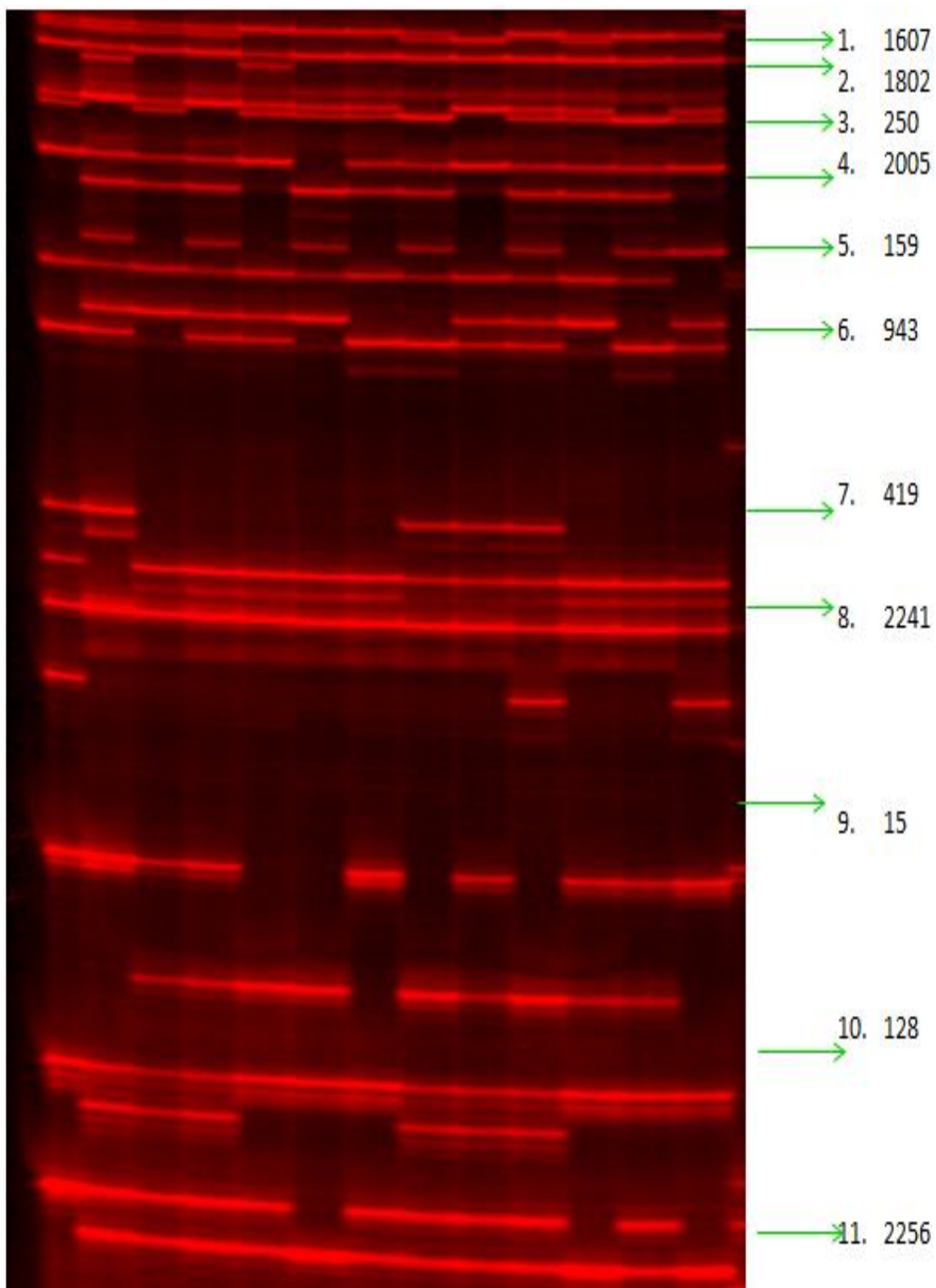


Figura 12. Marcadores InDels M2 marcados con fluorescencia Rojo Rodamina.

Frecuencias alélicas

Se realizó el equilibrio Hardy Weinberg para los 46 marcadores AIMS y se ajustaron los niveles de significancia mediante la corrección por Bonferroni. Posteriormente la distribución de frecuencias de los AIM-InDels no mostró desviaciones estadísticamente significativas dentro de la población del Cauca Tabla 15.

Tabla 15. Equilibrio HWE

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	^a P-valor	s.d.
1	1000	0.35800	0.37718	0.11508	0.00029
2	1000	0.51000	0.50020	0.57266	0.00047
3	1000	0.37300	0.41326	0.07198	0.00004
4	1000	0.15000	0.17365	0.07120	0.00001
5	1000	0.07900	0.08143	0.41717	0.00048
6	1000	0.34000	0.32136	0.07616	0.00023
7	1000	0.31500	0.31835	0.76502	0.00044
8	1000	0.28800	0.30546	0.07535	0.00026
9	1000	0.32700	0.31227	0.15642	0.00032
10	1000	0.12200	0.20826	0.07890	0.00765
11	1000	0.43500	0.44610	0.43754	0.00050
12	1000	0.21400	0.20978	0.65048	0.00046
13	1000	0.37300	0.37166	0.93230	0.00026
14	1000	0.42900	0.44544	0.25593	0.00038
15	1000	0.32700	0.33943	0.26024	0.00041
16	1000	0.50800	0.49879	0.57090	0.00052
17	1000	0.15500	0.16470	0.08178	0.00028
18	1000	0.47500	0.44478	0.03294	0.00018
19	1000	0.60400	0.46485	0.08399	0.00013
20	1000	0.11900	0.14306	0.09809	0.00012
21	1000	0.24000	0.23658	0.78749	0.00043
22	1000	0.49500	0.49646	0.94908	0.00022
23	1000	0.47400	0.48712	0.40208	0.00042
24	1000	0.18500	0.21207	0.0923	0.00002
25	1000	0.39600	0.42494	0.04041	0.00019
26	1000	0.29400	0.30546	0.25352	0.00042
27	1000	0.45500	0.44998	0.77997	0.00045
28	1000	0.47500	0.49452	0.21591	0.00033
29	1000	0.35200	0.35546	0.78931	0.00044
30	1000	0.47200	0.47379	0.94734	0.00022
31	1000	0.30800	0.33080	0.03611	0.00018
32	1000	0.43300	0.40732	0.05140	0.00019
33	1000	0.49600	0.49857	0.89847	0.00028
34	1000	0.41400	0.43102	0.20838	0.00032
35	1000	0.46500	0.49814	0.03723	0.00016
36	1000	0.48700	0.49452	0.65418	0.00043
37	1000	0.07900	0.08143	0.41573	0.00050
38	1000	0.44100	0.46187	0.17547	0.00033
39	1000	0.44600	0.46948	0.12249	0.00027
40	1000	0.44100	0.45962	0.21244	0.00033
41	1000	0.49300	0.49293	1.00000	0.00000
42	1000	0.43600	0.45583	0.19646	0.00033
43	1000	0.43000	0.43102	0.94221	0.00024
44	1000	0.43800	0.43324	0.76705	0.00046
45	1000	0.45700	0.49030	0.03187	0.00016
46	1000	0.51600	0.49375	0.15283	0.00042

^a corrección por bonferroni

La Tabla16 muestra, las frecuencias genéticas ancestrales de tres poblaciones continentales del departamento del Cauca, la frecuencia de Nativos Americanos se presentó en mayor proporción en el sur del departamento del Cauca (0,52), es decir más del 50% de la población asentada en el sur tiene una mayor ascendencia

Amerindia, en cuento a la ancestría Africana se encuentra proporcionalmente más acentuada en la zona norte del departamento (0,35), la mayor frecuencia de Europeos se observa en la zona centro y occidente del departamento (0,41), para ambas.

Tabla 16. Frecuencia InDels en individuos del departamento del Cauca

Muestras Poblacionales	n (%)	Frec_NA	Frec_AF	Frec_EU
Norte	39 (3,9)	0,31	0,35	0,34
Sur	206 (20,6)	0,52	0,12	0,36
Centro	710 (71,0)	0,46	0,13	0,41
Occidente	45 (4,5)	0,49	0,10	0,41

Las distancias genéticas por parejas fueron estimadas entre las poblaciones, mediante un análisis de dos dimensiones (MDS) para mejorar la visualización de las distancias genéticas (Figura. 13). Los resultados de la distancia genética entre las poblaciones muestran que el departamento del Cauca junto a la población control de Manaus-Brasil son vecinos y que estas dos poblaciones se encuentran entre los Nativos Americanos y los Europeos como otras poblaciones brasileñas, lo que indica que el cauca tiene mayores proporciones de población Mestiza.

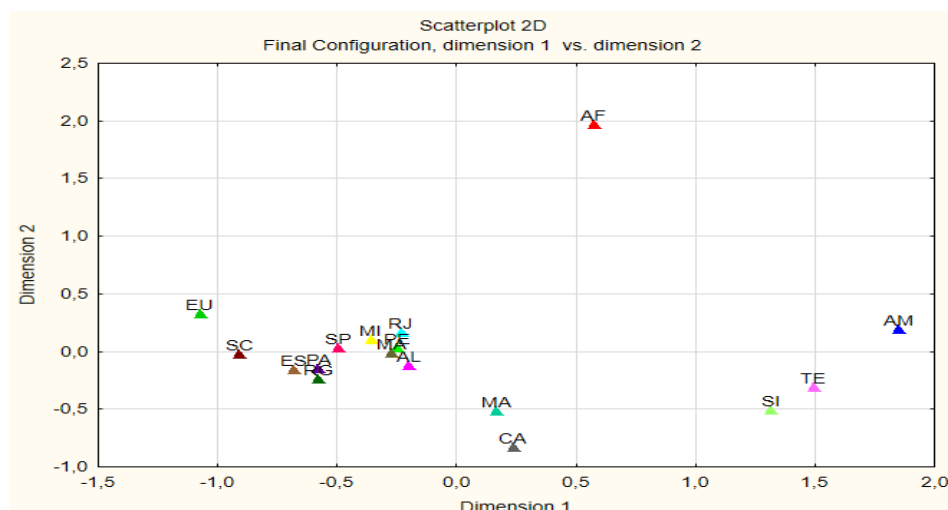


Figura 13. Escala Multidimensional de distancias genéticas

pareadas F_{st} calculados entre las muestras de los nativos americanos, Europa, África y la población del Cauca, incluyendo muestras del Brasil; SI: Santa Isabel do Rio Negro; MA: Manaus; PE: Pernambuco; AL: Alagoas; MT: Mato Grosso do Sul; TE: Terena; MI: Minas Gerais; ES: Espírito Santo; RJ: Río de Janeiro; SP: São Paulo; PR: Paraná; SC: Santa Catarina; RG: Rio Grande do Sul).

Análisis de ancestría

Se observan resultados en el panel donde cada color representa una población en particular, azul= nativo americano, verde= europeo, rojo= africano, amarillo= cauca. Para cada sujeto, los valores de los tres coeficientes de ascendencia se indican por

la distancia a los bordes del triángulo. Cada sujeto se representa por un punto de color y una distribución homogénea de la población de Cauca en ambos grupos de población americana europea e indígena se muestra una distribución similar, lo cual indica un mestizaje. Por otra parte, se observa una menor proporción de sujetos de Cauca en el clúster de la población africana. (Figura. 14 y 15).

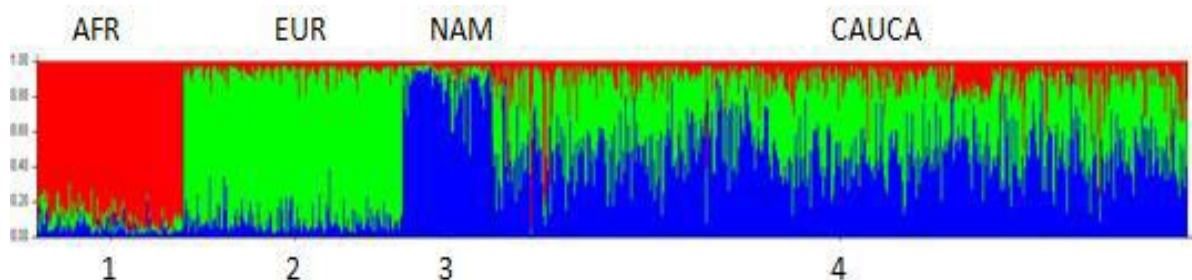


Figura 14. Estimaciones de ascendencia individuales

El gráfico de barras muestra las obtenidos de Cauca y poblaciones parentales, con destrucción (AFR: África; EUR: Europa; NAM: Nativo de América). Los paneles 1, 2 y 3 presentan la distribución de las poblaciones nativo americanas, europeas y africanas, respectivamente, por otro lado, el panel 4 muestra la distribución ancestral del departamento del Cauca que muestra una contribución homogénea tanto de los nativos americanos como de la población europea; por lo tanto, la mayor proporción de los sujetos fué mestizo. El aporte africano estuvo presente es una proporción baja

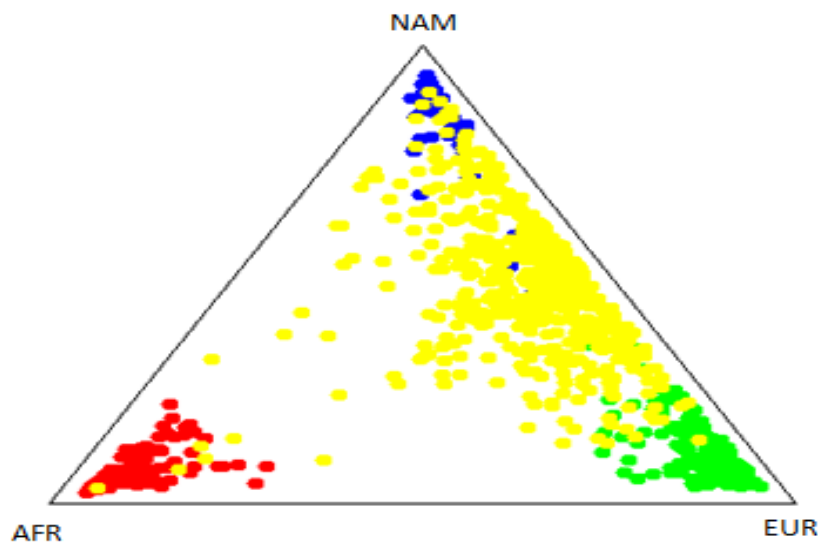


Figura 15. Triángulo de la ancestría individual

Representa a los sujetos pertenecientes al departamento del Cauca los cuales están en color amarillo. Con base en los resultados de STRUCTURE, en la parte superior de color verde observamos a los nativos americanos, a la derecha en azul a los europeos y a la izquierda en rojo africanos.

En la Tabla 17, se observa por filas la proporción de mezcla Africana, Europea y Nativo Americana que existe en los casos y controles caucanos. El 15% de los casos corresponde a africano, el 45% a europeo y el 40% a amerindio, mientras que el porcentaje de africanos es menor en los controles 13%, mayor en europeos 49% y menor en nativos americanos 38%. De lo anterior podemos decir que existió una mayor proporción de casos africanos (0,15) y amerindios (0,40) en los casos, respecto a los controles que tuvieron una mayor proporción de europeos (0,49).

Tabla 17. Frecuencias de poblaciones ancestrales en casos y controles Caucanos

Población	África	Europa	América	Individuos
África	0.84	0.08	0.08	105
Europa	0.08	0.13	0.79	158
América	0.05	0.84	0.11	64
Casos	0.15	0.45	0.40	500
Controles	0.13	0.49	0.38	500

En la Figura 16, se observa un triángulo que en su interior tiene distribuida la ascendencia media estimada de cada individuo de las poblaciones: 1.africana (rojo); 2. Europea (verde); 3. Amerindia (azul) 4. Caso (fucsia) y 5. Controles (amarillo). Para un individuo dado, los valores de los tres coeficientes en la ascendencia, están dadas por las distancias a cada uno de los tres lados del triángulo equilátero, es decir se observa una distribución homogénea de mezcla de casos y controles hacia la ancestría europea y amerindia pero en cuanto al cluster de coloración roja correspondiente a la etnia africana se observa que hay una mayor distribución de los casos que de los controles, por tanto los casos con EAP, presentaron una mayor ascendencia africana respecto de los controles. En la figura 17, se observa la distribución de tres orígenes continentales en casos y controles.

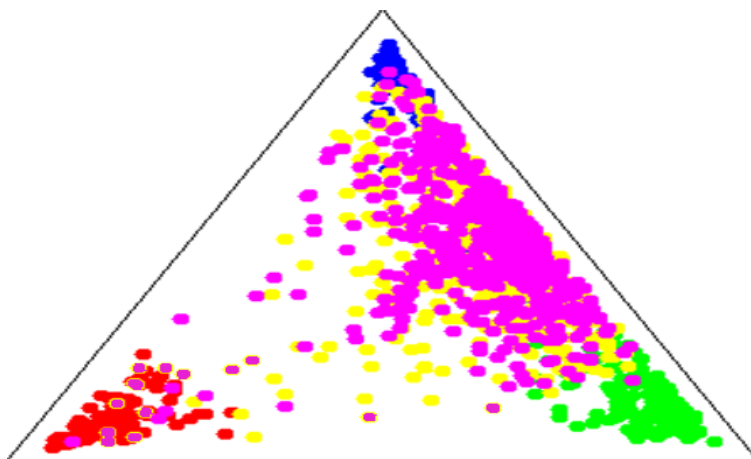


Figura 16. Distribución Ancestral

de casos fucsia, controles amarillos, en los extremos poblaciones, en rojo África, en verde europeos, en azul amerindios.

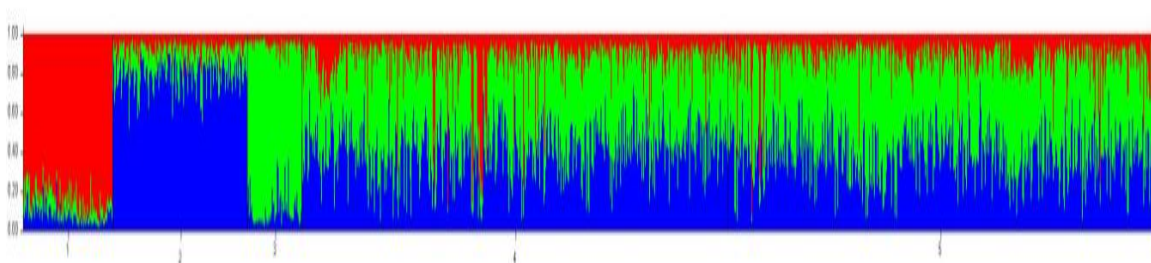


Figura 17. Distribución de casos y controles según la ancestría

En el panel 1 se observa en color rojo la distribución africana, en el panel 2 se observa la ancestría amerindia en azul y en el panel 3 en verde la ancestría europea, en el panel 4 se observa la distribución de los casos, si se visualiza detenidamente podemos ver que a pesar de que aparentemente hay una mezcla de los tres orígenes continentales, existen algunos individuos que a lo largo del panel son de ancestría africana en una mayor proporción respecto al panel 5 que contiene a los controles.

Discusión

La estimación de la composición genética de las poblaciones resultantes de mezclas ha sido importante en los análisis genéticos de muchas poblaciones humanas (33-38). Se utilizó un conjunto de 46 AIMs-InDels reportados por Pereira para caracterizar la composición de proporciones de ascendencia genética de una muestra de población de 500 sujetos de 23 de los 42 municipios que representan a las regiones del centro, norte, sur y este del departamento de Cauca (28). Las personas de los municipios del occidente no fueron incluidos en este estudio debido

a las barreras selváticas y marítimas que limitaban el acceso a esta parte o del departamento. Por lo tanto, se llevó a cabo una evaluación aleatoria de la composición genética de la mayoría de las regiones representativas del Cauca.

El análisis de las distancias genéticas por pares de la población estudiada mostró un mayor número de individuos más cerca de las poblaciones de América y Europa y una menor frecuencia más cerca de la población africana. La frecuencia más baja de la población africana, podría explicarse por la existencia de barreras culturales y geográficas que han dado como resultado el aislamiento de este grupo étnico. Estos resultados son consistentes con el análisis de la composición de mezcla realizada por STRUCTURE v 2.3.4, lo que indica que la composición genética de la población de ascendencia Caucana es predominantemente mestiza, lo cual indica un resultado de las contribuciones genéticas de ambas poblaciones nativas americanas y europeas y en menor medida, la población africana.

Nuestros resultados son consistentes con estudios de composición genética anteriores en personas de varios municipios del Cauca con diferentes objetivos al nuestro. El estudio de Acosta et al. (39) mostró un alto porcentaje de la contribución europea en el mestizaje de la población Caucana. Además, Córdoba et al. y Rojas et al. (16, 40) indicaron que las poblaciones nativas americanas y europeas han contribuido a una mayor proporción de la reserva genética actual de la población del Cauca.

El departamento del Cauca se caracteriza por albergar el mayor porcentaje de población indígena en Colombia. Alrededor del 20% de la población del Cauca pertenece a este grupo étnico, e incluye ocho grupos indígenas oficialmente reconocidos que se establecen en 26 de los 42 municipios de Cauca (41). El análisis de la mezcla en nuestro estudio mostró una mayor proporción de nativos americanos en ambas regiones Este y Sur del Cauca. Estas distribuciones se explican por el hecho de que numerosas tribus indígenas americanas han habitado predominantemente en los municipios de la región oriental del Cauca (Caldono, Puracé, Totoró) desde el período precolombino. Por otra parte, varias tribus Nativas Americanas se encuentran predominantemente en el sur del Departamento. Por otro lado, las proporciones de mezcla de Africanos fueron significativamente mayores en la región Norte consecuentemente este lugar del Cauca está habitado principalmente por afrocolombianos que se agrupan entre sí por su etnicidad y actividades laborales propias de estas comunidades como la minería y la agricultura (42).

En cuanto a la asociación de la enfermedad con la ancestría, se pudo observar en este estudio que los casos son predominantemente afro-descendientes respecto de los controles. Las diferencias étnicas en EAP históricamente han complementan los estudios de asociación, mostrando que los afroamericanos presentan esta enfermedad con mayor frecuencia respecto a los blancos no hispanos (43). Por otra parte la raza se sugiere como un factor de riesgo fuerte e independiente para la EAP en los Estados Unidos, donde se conoce que las personas de origen africano presentan de 2 a 3 veces mayor riesgo de EAP, valor incluso ajustado por otros factores de riesgo para ECV (44). Los datos sobre estudios en africanos nativos han

demostrado que la prevalencia de la enfermedad es $> 25\%$ para aquellos individuos > 60 años de edad (45). Análisis con AIMS han demostrado que la prevalencia de la enfermedad es mucho menor en las poblaciones caucásicas con respecto a las africanas (22). Por su parte los controles de este estudio no tienen una tendencia africana, si no que por el contrario presentan una distribución mestiza entre nativo americanos y europeos.

En síntesis se observó que el 15% de los casos correspondió a africano, el 45% a europeo y el 40% a nativos americanos, mientras que el porcentaje de africanos fue menor en los controles 13%, mayor en europeos 49% y menor en nativos americanos 38%. De lo anterior podemos decir que existió una mayor proporción de casos africanos (0,15) y amerindios (0,40) en los casos, respecto a los controles que tuvieron una mayor proporción de europeos (0,49). Los anteriores hallazgos representan para Sur América, Colombia y el departamento del Cauca la primera investigación que logra caracterizar la ancestría de la EAP, poniendo de manifiesto que los esfuerzos hacia la detección y prevención oportuna de la enfermedad, prioritariamente deben realizarse sobre los núcleos de las comunidades afrodescendientes que aún se conservan en el departamento del cauca, así como en los sujetos pertenecientes a la mayoría de la población reconocida como mestiza, que genéticamente demuestren un componente genético ancestral africano.

Bibliografía

1. Tota-Maharaj R BM, Zeb I, Katz R. Ethnic and sex differences in fatty liver on cardiac computed tomography: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Mayo Clin Proc.* 2014;89:493-503.
2. Javed S JS, Mays RM, Tying SK. Clinical characteristics and awareness of skin cancer in Hispanic patients. *Dermatol Online J* 2013 19623.
3. Bryc K DE, Macpherson JM, Reich D, Mountain JL. The genetic ancestry of African Americans, Latinos, and European Americans across the United States. *Am J Hum Genet.* 2015 96:37-53.
4. Manichaikul A PW, Rodriguez CJ, Peralta CA, Divers J, Guo X, Chen WM, Wong Q, Williams K, Kerr KF, Taylor KD, Tsai MY, Goodarzi MO, Sale MM, Diez-Roux AV, Rich SS, Rotter JI, Mychaleckyj JC. Population structure of Hispanics in the United States: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *PLoS Genet.* 2012;4:8.
5. Peralta CA LY, Wassel C, Choudhry S, Palmas W. Differences in Albuminuria between Hispanics and Whites: An Evaluation by Genetic Ancestry and Country of Origin: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:240-7.
6. Marrero AR, Bravi, C., Stuart, S., Long, J.C., Pereira das Neves, Leite, F., Kommers, T., Carvalho, C.M., Pena, S.D. Pre and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. . *Hum Hered.* 2007;64:160-71.
7. Gonzalez-Andrade F, Sanchez, D., Gonzalez-Solorzano, J Gascon. Sex-specific genetic admixture of Mestizos, Amerindian Kichwas, and Afro-Ecuadorans from Ecuador. *Hum Biol.* 2007;79:51–77.
8. Moreno-Estrada A, Gignoux, C.R., Ferná'ndez-Lo'pez, J.C., Zakharia,kharia, F., Sikora, M., Contreras, A.V., Acun'a-Alonzo, V., Sandoval, K., Eng, C., Romero-Hidalgo, S. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. . *Science* 2014:1280-5.
9. Klimentidis YC, Miller, G.F., and Shriver, M.D. Genetic admixture, self-reported ethnicity, self-estimated admixture, and skin pigmentation among Hispanics and Native Americans. *Am J Phys Anthropol.* 2009;138:375–83.
10. Wang S, Ray, N., Rojas, W., Parra, M.V., Bedoya, G., Gallo, C.,Poletti, G., Mazzotti, G., Hill, K., Hurtado, A.M. Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos. . *PLoS Genet.* 2008:4.
11. Silva MC ZL, Soares-Souza GB, Vieira ZM,. Development of two multiplex mini-sequencing panels of ancestry informative SNPs for studies in Latin Americans:

an application to populations of the State of Minas Gerais (Brazil). *Genet Mol Res.* 2010;9:2069-85.

12. Bedoya G MP, Garcia. Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006:7234-9.

13. Bolnick DA S. Asymmetric male and female genetic histories among Native Americans from Eastern North America. *Mol Biol Evol.* 2006; ;23:2161-74.

14. Rodas C GN, Keyeux G. Mitochondrial DNA studies show asymmetrical Amerindian admixture in Afro-Colombian and Mestizo populations. *Human Biology.* 2003; ;75:13-30.

15. Chacón-Duque JC AK, Avendaño E, Campo O, Ramirez R, Rojas W, Ruiz-Linares A, Restrepo BN, Bedoya G. African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in colombian populations. *Infection, Genetics and Evolution.* 2014;27:89-95.

16. Córdoba L GJ, Hoyos LS, Duque C, Rojas W, Carvajal S, Escobar LF, Reyes I, Cajas N, Sánchez A. Genetic Structure of a SouthWestern Colombian Population. *Revista Colombiana de Antropología.* 2012;48:21-48.

17. Rogers J GR. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nat Rev Genet.* 2014;5:347-59.

18. Shriver MD PE, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. *Hum Genet.* 2003;112:387-99.

19. Knowles JW AT, Li J, Quertermous T, Cooke JP. Genetic susceptibility to peripheral arterial disease: a dark corner in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;10:2068-78.

20. Ix JH AM, Denenberg JO, Cushman M, Criqui MH. Novel cardiovascular risk factors do not completely explain the higher prevalence of peripheral arterial disease among African Americans: the San Diego Population Study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:2347-57.

21. Allison MA PC, Wassel CL, Aboyans V, Arnett DK, Cushman M, Eng J, Ix J, Rich SS, Criqui MH. Genetic ancestry and lower extremity peripheral artery disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Vasc Med.* 2010;13:351-9.

22. Scherer ML NM, Pawlikowska L, Ziv E, Mitchell G, Huntsman S. Admixture mapping of ankle-arm index: identification of a candidate locus associated with peripheral arterial disease. *J Med Genet.* 2010;47:1-7.

23. Meadows TA BD, Hirsch AT, Creager MA, Califf RM, Ohman EM, Cannon CP,. Ethnic differences in the prevalence and treatment of cardiovascular risk factors

in US outpatients with peripheral arterial disease: insights from the reduction of atherothrombosis for continued health (REACH) registry. *Am Heart J*. 2009;158:1038-45.

24. Collins TC PN, Suarez-Almazor M. Peripheral arterial disease symptom subtype and walking impairment. *Vasc Med*. 2005;10:177-83.

25. Rowe VL WF, Lane JS, Etzioni DA. Racial and ethnic differences in patterns of treatment for acute peripheral arterial disease in the United States, 1998-2006. *J Vasc Surg*. 2010;51:21S-6S.

26. Miller SA DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.

27. Weber C NH. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410–22.

28. Pereira R PC, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*. 2012;1-7.

29. Pereira R PC, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009;30:3682-90.

30. Excoffier. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47-50.

31. Altman D. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*. 1995;310-70.

32. Saloum de Neves Manta PR, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, de Vargas Wolfgramm E, da Mota Pontes I, Ivan Aguiar J, Ozório Moraes M, Fagundes de Carvalho E, Gusmão L. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One*. 2013;9:e75145.

33. Avena S VM, Ziv E, Pérez-Stable EJ, Gignoux CR, Dejean C, Huntsman S, Torres-Mejía G, Dutil J, Matta JL. Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PloS one*. 2012;7:e34695.

34. Campos-Sánchez R RH, Barrantes R. Ancestry Informative Markers Clarify the Regional Admixture Variation in the Costa Rican Population. *Human Biology*. 2014;85:721-40.

35. Crouch DJ WM. Inferring separate parental admixture components in unknown DNA samples using autosomal SNPs. *European Journal of Human Genetics*. 2012 20:1283-9.

36. Heinz T A-IV, Pardo-Seco J, Taboada-Echalar P, Gómez-Carballa A, Torres-Balanza A, Rocabado O, Carracedo A, Vullo C, Salas A. Ancestry analysis reveals a predominant Native American component with moderate European admixture in Bolivians. *Forensic Science International: Genetics*. 2013;7:537-42.
37. Parolin ML C-TR, Sambuco LA, Jaureguiberry SM, Iudica CE. Analysis of 15 autosomal STR loci from Mar del Plata and Bahía Blanca (Central Region of Argentina). *International journal of legal medicine*. 2014 128:457-9.
38. Shahabi A WM, Lewinger JP, Goodwin TM, Stern MC,. Genetic admixture and risk of hypertensive disorders of pregnancy among Latinas in Los Angeles County. *Epidemiology*. 2013;24:285-94.
39. Acosta MA B-VA, Lareu MV, Brion M, Carracedo A. The genetic male component of two South-Western Colombian populations. *Forensic Science International Genetics*. 2009;3:59-61.
40. Rojas W PM, Campo O, Caro MA, Lopera JG, Arias W, Duque C, Naranjo A, García J, Vergara C. Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *American journal of physical anthropology*. 2010;143:13-20.
41. Zaumsegl D RM, Schneider PM. A 21 marker insertion deletion polymorphism panel to study biogeographic ancestry. *Forensic Science International: Genetics*. 2013;7:305-12.
42. Maldonado H SC. DANE 2005:Perfil Departamental Departamento del Cauca.[http://www.dane.gov.co/.\(b%C3%BAsqueda](http://www.dane.gov.co/.(b%C3%BAsqueda) Abril 2014).
43. Singh S BK, Kullo IJ. Ethnic differences in ankle brachial index are present in middle-aged individuals without peripheral arterial disease. *Int J Cardiol*. 2013;162:228-33.
44. Criqui MH VV, Denenberg JO. Ethnicity and peripheral arterial. *Circulation* 2005;112:2703.
45. Fowkes FG TM, Connor MD, Lewando-Hundt G, Tzoulaki I,Tollman SM. Distribution of a subclinical marker of cardiovascular risk, the ankle brachial index, in a rural African population: SASPI study. *Eur J CardiovascPrev Rehabil*. 2006;13:964e9.

**Capitulo V – Ancestría, polimorfismos genéticos y su asociación con la
Enfermedad Arterial Periférica.**

Introducción

La EAP es una enfermedad aterosclerótica, producto de la interacción de factores ambientales, genéticos y de ancestría, en base a esto es importante dilucidar los polimorfismos de genes implicados en las diversas etapas de la enfermedad que pueden estar asociados y modulados por la raza. La detección de la asociación de polimorfismos mediante técnicas de asociación genética, ha generado valiosa información durante décadas. De estos estudios se resaltan: La evaluación de los genes candidatos, estudios de asociación del genoma completo (GWAS), genómica comparativa (empleo de modelos animales para la extrapolación de resultados a humanos) y análisis de asociación de los estudios caso-control (1-4).

En estos últimos (estudios caso-control), se sugiere que más del 50% de la EAP es atribuible a factores de riesgo clásicos, como el tabaquismo, diabetes, hipertensión y dislipidemia, mientras que el porcentaje restante es explicado por la genética (5). Por otra parte en estos mismos estudios, existe una preocupación para evitar falsos positivos que pueden darse como resultado, cuando no se tiene en cuenta el grado de diferenciación de la raza para EAP, pues es conocido que los grupos raciales aportan diferentes frecuencias de alelos en la enfermedad (6).

En este capítulo se buscó establecer la asociación de factores de riesgo con 14 polimorfismos genéticos en 10 genes que se encuentran involucrados en el estrés oxidativo (MTHFR, NOS3), el metabolismo lipídico (SCARB1, apoA5), la respuesta inflamatoria (IL6, COX-2, ICAM-1), la vía de coagulación (FGB, F5), la angiogénesis (VEGF) y el efecto de la ancestría con el desarrollo de la enfermedad. Cabe anotar que este análisis es de gran importancia porque los esfuerzos para determinar algunos factores genéticos que subyacen a la susceptibilidad de la EAP se han estudiado con un éxito limitado.

Genes involucrados en el estrés oxidativo

Gen *MTHFR*

El gen *MTHFR* es un gen asociado con el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, codifica para la enzima metiltetrahidrofolato reductasa, se ubica en el brazo corto del cromosoma 1, en la región p36.22 (1p36.22). Figura 18 (7). *MTHFR* actúa como una enzima clave en la vía que cataliza la conversión del aminoácido homocisteína, un aminoácido azufrado que desempeña un papel importante en la transferencia de grupos metilos en el metabolismo celular. La homocisteína es sintetizada como producto intermedio del metabolismo de la metionina, por acción de la enzima metionina adenosin transferasa, su catabolismo puede tener lugar por dos vías; la transulfuración y la remetilación. En la vía de la transulfuración la homocisteína es transformada en cistationina gracias a la enzima cistationina B sintetasa dependiente de vitamina B6, en la vía de la remetilación la homocisteína se recicla a metionina por acción de la 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-S-metiltransferasa (8, 9).



Figura 18. Gen *MTHFR*.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/607093>. Consultado 2016.

Deficiencias de *MTHFR* desencadenan el aumento de la homocisteína, en donde la oxidación de este aminoácido, genera especies reactivas de oxígeno (EROs) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el anión hidroxilo (10), provocando alteraciones en la función normal del endotelio vascular, que traen como consecuencia el daño arterial, peroxidación de los lípidos y agregación plaquetaria (11).

Hiperhomocisteinemia y EAP

Las enfermedades vasculares son comúnmente asociadas con factores de riesgo tradicionales como por ejemplo la hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus y el tabaquismo, pero en la última década se han identificado otros marcadores de riesgo, siendo uno de ellos la homocisteína (8), su aumento total en el plasma representa un factor de riesgo para la EAP (12). Un meta-análisis realizado en 2008, encontró evidencia de una fuerte asociación entre la homocisteína elevada y el genotipo TT en EAP incluso desde la edad de 12 años en hijos de familias con aterosclerosis (13).

Gen *NOS3*

El gen óxido nítrico sintasa endotelial (*NOS3*), se localiza en el locus cromosómico 7q36.1, contiene 26 exones y codifica para la enzima eNOS. Figura 19 (14). La enzima en mención es más abundante en el endotelio vascular, pero también se ha encontrado en las neuronas, células epiteliales o cardiomiocitos (15); eNOS se encuentra encargada de la catálisis del sustrato L-arginina en L-citrulina para la formación de óxido nítrico (ON), potente vasodilatador y sustancia clave en el mantenimiento de la homeostasis arterial (16). El papel pleiotrópico de ON incluye la agregación plaquetaria, interacciones leucocito-endotelio, angiogénesis y arteriogénesis (17). ON elimina los radicales superóxido y limita la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, lo que resulta en un efecto vasoprotector general (18).



Figura 19. Gen *NOS3*.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/163729>. Consultado 2016

La enzima disfuncional debido a polimorfismos en el gen codificante, provoca baja disponibilidad de ON, lo cual se traduce en deficiencias para la función normal del endotelio, contribuyendo a la formación de la placa aterosclerótica (18). Los polimorfismos del gen *NOS3* más relevantes son; G/T (rs 1799983) G/A (rs891512) y T/G (rs1808593) (18-20).

Bajas concentraciones de NO y EAP

NO es una molécula anti-aterogénica endógena importante, las variaciones en el gen *NOS3* pueden influir en la biodisponibilidad de esta molécula, predisponiendo así al desarrollo de enfermedades vasculares ateroscleróticas incluyendo EAP (21), la variación polimórfica de *NOS3* se ha visto involucrada en la reducción del flujo sanguíneo y la dilatación de la arteria braquial (22).

Genes involucrados en metabolismo lipídico

Gen *SCARB1*

El gen *SCARB1* llamado también CLA-1 codifica para el tipo de receptor scavenger clase BI (SR-BI), se encuentra situado en el cromosoma 12q24.31 abarcando 86,3 kb. Figura 20 (23). El alelo C del SNP rs10846744 se ha visto asociado con aterosclerosis (24) y se ha encontrado que el SNP rs 4765615 impide la reducción de colesterol e incluso la acción de estatinas (25).



Figura 20. Gen *SCARB1*.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/601040>. Consultado 2016

SR-BI, es un receptor multiligando implicado en la regulación del HDL (26). SR-BI facilita el flujo bidireccional de colesterol libre, fosfolípidos entre HDL y las células, influyendo así en el contenido de colesterol de la membrana plasmática (27). Se ha demostrado que la expresión SR-BI en las células derivadas de médula ósea es protectora contra la aterosclerosis (27). Hay varios mecanismos por los cuales las HDL ejercen efectos anti-aterogénicos, el primer lugar lo ocupa el transporte reverso de colesterol, mecanismo por el cual las HDL captan el exceso de colesterol procedente de tejidos extrahepáticos, el segundo lugar deriva de su actividad antioxidante, ya que las HDL son capaces de captar esteres de colesterol oxidados desde las LDL, siendo posteriormente eliminados en el transporte reverso como hidróxidos de ésteres de colesterol (28).

***SCARB1* y EAP**

Las variaciones genéticas del receptor SR-BI se han encontrado asociadas con altos niveles plasmáticos de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad, en individuos con EAP sin distinción de género (26).

Gen *ApoA5*

El gen *ApoA5* se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23.3). Figura 21. Variantes polimórficas presentes en el gen, afectan el metabolismo lipídico de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos produciendo su aumento (29). La enzima *ApoA5* en la circulación está asociada con las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de alta densidad (HDL), así como con los quilomicrones (30). Aunque el mecanismo de acción *ApoA5* todavía se discute, en términos generales, hay dos teorías que describen cómo *ApoA5* modula los triglicéridos y han sido descritas dentro de “la paradoja de la modulación de triglicéridos por *ApoA5*”: (1) *ApoA5* mejora el catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por actividad de la lipoproteína lipasa ó (2) inhibe la tasa de producción de VLDL (31). Alteraciones de polimorfismos en el gen *ApoA5*, principalmente -1131T>C han sido reportadas con una asociación significativa para niveles elevados de triglicéridos (32).



Figura 21. Gen *ApoA5*.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/606368>. Consultado 2016

ApoA5 y EAP

Un meta-análisis realizado en el año 2013 acerca de las variantes genéticas en APOA5, encontró que bajo un modelo de herencia dominante -1131CT>C ha demostrado ser un factor de riesgo de cardiopatía coronaria ($p = 0,030$, OR, 1,422; IC del 95%, 1,036-1,952) (33). También dicha variante ha sido asociada con un inicio temprano de IAM y aterosclerosis carotídea en pacientes obesos (34, 35). Siendo APOA5 la apolipoproteína más recientemente descubierta en referencia a las demás apolipoproteínas (29), el inadecuado funcionamiento de APOA5, se ha asociado con un modelo pro-aterogénico en ECV pero nunca antes se ha reportado en la literatura mundial la asociación de APOA5 para EAP, esta tesis muestra por primera vez en la literatura científica un estudio de -1131CT> C (rs662799) con la enfermedad de interés.

Genes involucrados en la Inflamación

Gen *IL6*

La interleucina-6 (IL-6) es una glucoproteína asociada con varios marcadores de disfunción endotelial, desempeña un papel en la patogénesis de la enfermedad vascular aterosclerótica, mediante la activación endotelial a través de orquestar la estimulación de la proteína C reactiva y la síntesis de fibrinógeno (36).

IL-6 es una citosina con actividad anti-inflamatoria y pro-inflamatoria, se encuentra localizada en la región cromosómica 7p15.3. Figura 22. IL-6 cuenta con un polimorfismo en la región promotora -174G>C (rs1800795), el cual está asociado con la aterosclerosis subclínica y la ECV (37, 38). Análisis han demostrado que los sujetos portadores de la IL-6 -174CC tienen riesgo a desarrollar enfermedad arterial coronaria (39).



Figura 22. Gen *IL6*

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/147620>. Consultado 2016.

IL6 y EAP

IL6 se asocia de manera independiente con EAP en africanos americanos (40). Entre las citoquinas, IL-6 es una de las más estudiadas en EAP, es reconocida por su papel en la respuesta inflamatoria de fase aguda, se ha demostrado que el aumento de concentraciones en el suero tiene un doble riesgo para la enfermedad (41).

Gen COX-2

La ciclooxigenasa-2 (COX-2), conocida como prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS2), es una enzima capaz de catalizar la síntesis de prostaglandinas a través de la oxidación de ácido araquidónico, las prostaglandinas pueden agudizar la respuesta inflamatoria en la placa aterosclerótica (42). COX2, tiene un gen de menor tamaño localizado en la región cromosómica 1p 31.1, mide aproximadamente 8,3 Kb y contiene 10 exones. Figura 23.



Figura 23. Gen COX-2.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/600262>. Consultado 2015.

Se han identificado polimorfismos en COX-2, de los cuales ha sido estudiado el rs20417 con una transición de G/C en la posición -765 pb de la región promotora. Un meta-análisis realizado por Li et al, sugiere evidencia existente acerca de la asociación del polimorfismo y la aparición de ECV, mostrando un papel protector del polimorfismo frente al desarrollo de enfermedad arterial coronaria con un OR: 0,80 (95%IC: 0,65-0,98) (43). Pese a los anteriores resultados se debe tener en cuenta que se ha demostrado la presencia de COX-2 en arterias ateromatosas, pero no en vasos sanos, lo que indica un papel de esta enzima en la formación o mantenimiento de las placas de ateroma (44).

COX-2 y EAP

Un primer estudio investigó el efecto de los inhibidores selectivos de la COX-2 en pacientes con EAP, los resultados obtuvieron una mejora en la dilatación del endotelio en pacientes que tomaron inhibidores de la COX-2 y concluyeron que existió una disminución de la inflamación con la disfunción endotelial en la patogenia de la aterosclerosis, mediante el uso de un fármaco antiinflamatorio en pacientes con EAP (45).

Gen ICAM-1

La molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, está presente de forma constitutiva en células endoteliales. ICAM-1 contribuye directamente a la respuesta inflamatoria dentro de la pared del vaso sanguíneo, se encuentra implicada en la disfunción de la activación de células endoteliales, adhesión de leucocitos y migración transendotelial, lo cual contribuye a la formación de placa aterosclerótica (46, 47). Se ha observado un incremento en niveles plasmáticos de la forma soluble (sICAM-1) de ICAM-1 en personas con ECV (47).

El gen de *ICAM-1* se encuentra ubicado en la región cromosómica 19p13.2. Figura 24. *ICAM-1* tiene un SNP (rs5498) asociado con un incremento de sICAM-1 (48, 49).



Figura 24. Gen *ICAM-1*.

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/147840>. Consultado 2015.

***ICAM-1* y EAP**

ICAM-1 ha mostrado ser predictor independiente de la aterosclerosis periférica (50). Niveles elevados de sICAM-1 han sido asociados con EAP (51). La actividad física que actúa como factor protector en ECV, se ha asociado independientemente con menores niveles sICAM-1 en pacientes con EAP (52).

Genes involucrados en coagulación

Gen *FGB*

La triada de Virchow, corresponde a tres factores que contribuyen a la formación de un trombo: la lesión endotelial, la estasis conocida como turbulencia o lentitud del flujo sanguíneo y la hipercoagulabilidad de la sangre (53). El fibrinógeno es el precursor de plasma de fibrina, que actúa generalmente en los estados de hipercoagulabilidad, el fibrinógeno es la matriz de base de cualquier coágulo, es una glicoproteína del plasma sanguíneo que participa en la cascada de coagulación y está compuesta por dos conjuntos de tres cadenas polipeptídicas conocidas como α , β y γ , codificados por el fibrinógeno alfa (FGA), beta (*FGB*) y gamma (FGG) genes que respectivamente se agrupan en el cromosoma 4q31.3. Figura 25 (53, 54). De los anteriores, el gen *FGB* tiene polimorfismos asociados como el rs1800787 y rs2066861 al riesgo atero-trombótico (55). *FGB* es un factor importante del sistema de coagulación que participa en el proceso de la hemostasia y proporciona estabilidad al trombo recién formado (56).



Figura 25. Gen *FGB*

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/134830>. Consultado 2016.

FGB y EAP

Aparte de su papel en las reacciones de coagulación; FGB participa en el desarrollo de la aterosclerosis mediante la promoción de la adhesión de plaquetas y leucocitos a la superficie endotelial (57). Niveles altos de fibrinógeno han sido asociados con EAP, incluso después de ajustar por factores de riesgo de ECV tradicionales (58).

Gen F5

El gen que codifica al factor V se encuentra en la región cromosómica 1q24.2 Figura 26. Las mutaciones de este gen predisponen a trombosis (59).



Figura 26. Gen F5

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/612309>. Consultado 2016

Gen F5 y EAP

F5 codifica para el factor de coagulación V, cuenta con un SNP 1691 G/A (rs6025). Un estudio muestra a F5 como candidato de incremento a EAP (60), dicha asociación ha sido controversial mediante un estudio que demostró que F5 no está asociado a EAP (61)

Gen implicado en la Angiogénesis

Gen VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor angiogénico potente, induce la liberación de ON a partir de células endoteliales, cuya producción se amplifica durante la angiogénesis (62, 63). El gen VEGF está localizado en el cromosoma 6 (6p21.1). Figura 27 (64). Se ha encontrado una relación significativa de VEGF entre los polimorfismos rs699947 y rs2010963 con trastornos en la vasculatura (65-67).

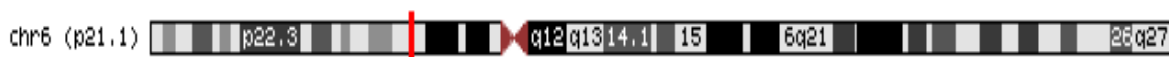


Figura 27. Gen VEGF

Se observa la región cromosómica del gen. Tomado de <http://omim.org/entry/192240>. Consultado 2015.

Gen *VEGF* y EAP

VEGF tiene un papel en la aterogénesis y la inestabilidad de la placa a través de mecanismos proinflamatorios y angiogénicos (68), se ha observado que en pacientes con EAP esta citoquina pro-angiogénica se encuentra elevada (69).

Metodología

Identificación de Genes

Para la identificación de los genes asociados con la enfermedad, se realizó una búsqueda electrónica mediante revisión sistemática en la base de datos del NCBI-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), teniendo en cuenta artículos publicados entre el 1 de diciembre de 2010 hasta el 1 de diciembre del 2013, en los idiomas inglés y español. Se emplearon artículos de (meta-análisis, revisión y estudios de asociación), la búsqueda estuvo limitada por idiomas diferentes al inglés y español. La combinación de palabras claves usadas en la terminología MeSH fueron las siguientes: oxidative stress and peripheral arterial disease, inflammation and peripheral arterial disease, blood coagulation and peripheral arterial disease, angiogenesis and peripheral arterial disease, genetics and peripheral arterial disease, polymorphisms and arterial disease. Por su parte el gen APOA5, se consideró por su fuerte asociación con la aterosclerosis y demás enfermedades cardiovasculares a pesar de que no existen a la fecha meta-análisis, revisiones ni estudios de asociación con EAP. Figura 28.

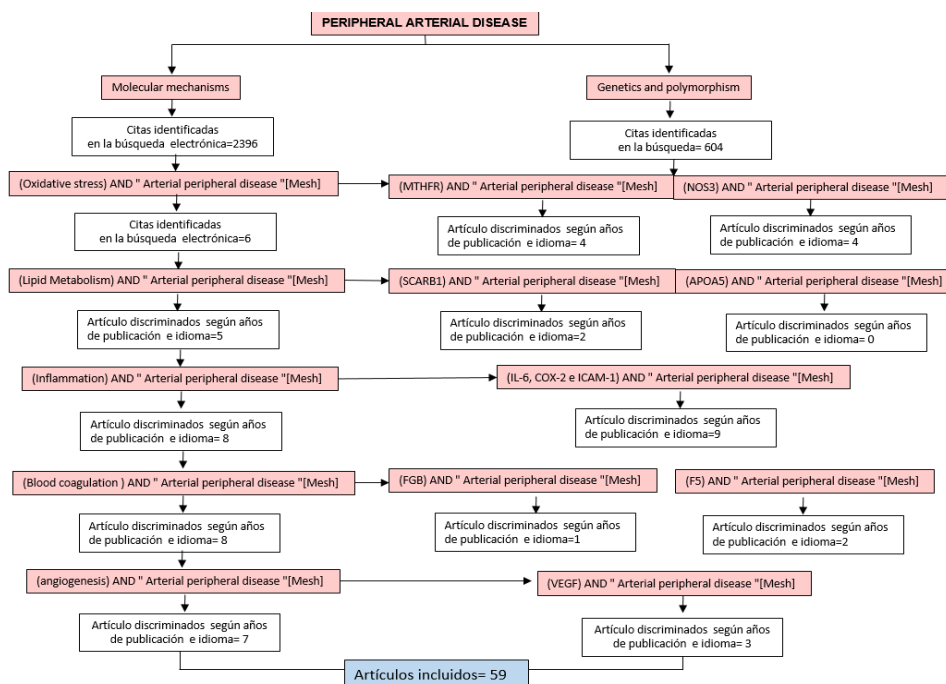


Figura 28. Esquematización de la búsqueda electrónica.

Un total de 3000 artículos se encontraron en PUBMED mediante la búsqueda controlada y sistematizada. Luego del proceso de tamizaje de acuerdo a criterios de selección un total de 59 artículos se incluyeron.

Posterior a la búsqueda sistemática, se seleccionaron SNP a partir del alelo de menor frecuencia $MAF > 0,1$ en la base de datos del NCBI-PubMed db-SNP

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Lo anterior teniendo en cuenta que este valor de MAF, se encontrara en al menos 2 de cualquiera de los 3 grupos étnicos europeos, africanos y nativos americanos. Tabla 18.

Tabla 18. Clasificación de Genes y SNPs asociados con a ECV y EAP

GEN	SNP	rs	CROMOSOMA	MAF CEU	MAF AFR	MAF CAU
MTHFR	C677T	1801133	1	0,31	0,14	0,28
NOS3	A/C	891512	7	0,17	0,10	0,13
	G/T	1808593	7	0,18	0,25	NR
	G894T	1799983	7	0,34	0,13	0,33
SCARB1	C/T	4765615	12	0,48	0,48	0,43
	G/C	10846744	12	0,15	0,23	0,26
APOA5	-T1131C	662799	11	0,17	0,13	NR
IL-6	-174G>C	1800795	7	0,46	0,12	0,16
COX-2	-G765C	20417	1	0,18	0,40	0,16
ICAM-1	G1548A	5498	19	0,39	0,16	0,38
FGB	C148T	1800787	4	0,23	0,05	0,17
F5	G1691A	6025	1	0,22	0,03	0,20
VEGF	A2578C	699947	6	0,47	0,11	0,43
	C405G	2010963	6	0,40	0,27	0,42

SNP= polimorfismo de nucleótido simple, MAF= Frecuencia del menor alelo, CEU=Europeos, AFR=Africanos, CAU=Caucásicos.

Extraccion de ADN

El ADN se extrajo utilizando el procedimiento de Salting Out descrito por Miller et al (70), a una concentración de ADN por 30 ng / dL, cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Genotipificacion de SNP's

La genotipificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual fue llevada a cabo en el Laboratorio Genetics Core de la Universidad de Arizona utilizando el ensayo TaqMan SNP genotypingv (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Ensayo TaqMan SNP genotyping

Se realizó un proceso de discriminación alélica, mediante el cual se detectó en una muestra dos variantes de la secuencia de un único nucleótido, con el uso de las sondas TaqMan marcadas con dos fluorocromos, las cuales permitieron medir la producción de amplicones de PCR.

Las reacciones de PCR de los experimentos de genotipado incluyeron los siguientes componentes:

1. Muestra: la muestra en la que el genotipo es desconocido.
2. Controles negativos: muestras que contienen agua o solución tampón en lugar de ADN molde.
3. Controles positivos: muestras que contienen genotipos conocidos (homocigotos para el alelo 1, homocigotos para el alelo 2, heterocigotos para los alelos 1 y 2).
4. Agua para molecular.
5. Master Mix: AmpliTaqGold® DNA polimerase, cloruro de magnesio (MgCl₂), Buffer, dNTPs (A,T,C,G).
6. Assay Mix: Cada TaqMan ® SNP genotyping assay consta de un solo tubo que contiene (a) dos cebadores específicos de la secuencia para amplificar el polimorfismo de interés y (b) dos sondas MGB TaqMan ® específicas de alelo, para detectar cada uno de los alelos del polimorfismo de interés. Tabla 19.

Cada sonda MGB TaqMan ® MGB específica de alelo tiene:

1. Un fluorocromo notificador en el extremo de 5´.
2. Un fluorocromo VIC ® unido al extremo de 5´ de la sonda del alelo 1.
3. Un fluorocromo FAM™ unido al extremo de 5´ de la sonda del alelo 2.

Tabla 19. Mix para TaqManSNP genotyping assay

Componente	Volumen (μL) para 1 reacción
Master Mix	10
Assay Mix	1
Muestra	2
Agua	7
Volumen Total	20

Reaccion en Cadena de la Polimerasa

La PCR se dio en cuatro pasos:

1. Se construyó una sonda oligonucleótida con un fluorocromo notificador unido al extremo 5' y un apantallador ó «quencher» en el extremo 3'. Mientras la sonda estuvo intacta, la proximidad del apantallador redujo enormemente la fluorescencia que emitió el fluorocromo notificador por medio de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.
2. Cuando la diana estuvo presente, la sonda anilló entre las localizaciones de los cebadores y se rompió por la actividad de la 5' nucleasa de la Taq Polimerasa, durante la extensión.
3. Esta ruptura de la sonda, separó el fluorocromo notificador del apantallador, lo que aumentó la señal del fluorocromo notificador.
4. En cada ciclo (Tabla 20), se separaron más moléculas de fluorocromo notificador de sus respectivas sondas, lo que produjo un aumento de la intensidad de la fluorescencia que fué proporcional a la cantidad de amplicón producido. Figura 29.

Tabla 20. Fase de Amplificación de la PCR

Paso	Amplificación			
	Ciclos (50)			Lectura pos PCR
	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
Temperatura	92°C	60°C	60-72°C	60-72°C
Tiempo	00:00:15	00:01:00	00:01:00	00:00:30

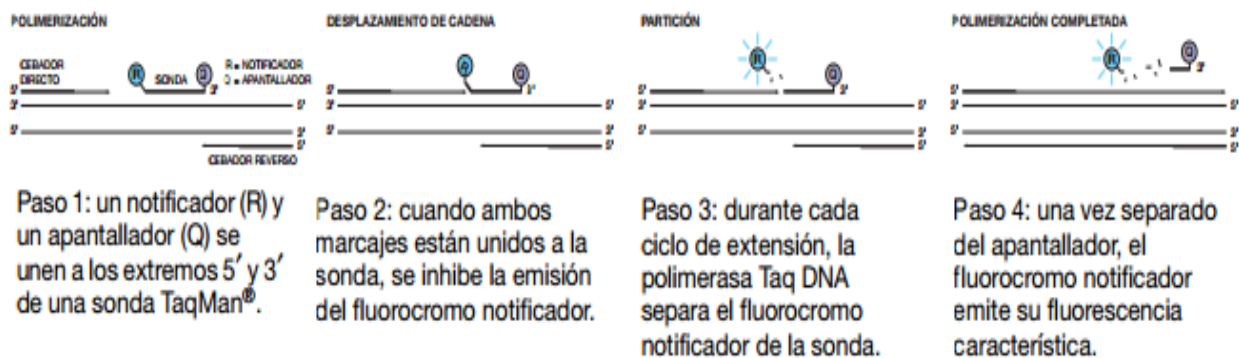


Figura 29. Pasos PCR.

Se observa la acción del notificador (R) y el apantallador (Q) cuando se realiza la unión a la sonda TaqMan y se inhibe o emite la fluorescencia. Tomado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053175.pdf

Para una mejor comprensión de lo anteriormente descrito, se ejemplificará el mecanismo de la PCR. **Por ejemplo:** Durante la PCR la sonda MGB TaqMan® hibridó de manera específica con su secuencia complementaria. Posteriormente la enzima AmpliTaqGold® DNA polimerasa rompió las sondas que fueron hibridadas con su secuencia diana, esta acción separó físicamente los fluorocromos del apantallador y del notificador, lo que aumentó la fluorescencia de éste, indicando qué alelos hay en la muestra. La sonda marcada con el fluorocromo FAM™ para el alelo 2 corresponde con el segundo nucleótido entre corchetes de la siguiente secuencia: ATCGATT[G/T]ATCC, es decir la sonda marcada con el fluorocromo VIC® se unirá al alelo G y la sonda marcada con el fluorocromo FAM™ se unirá al alelo T. Figura 30.

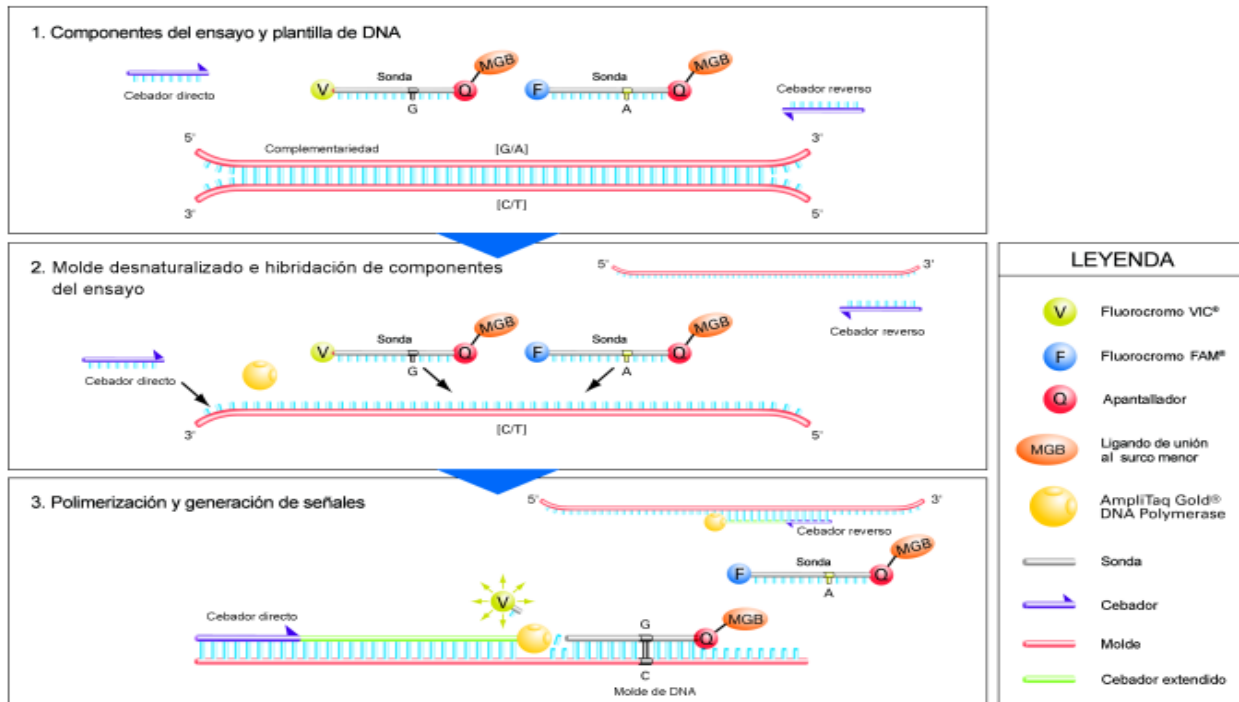


Figura 30. Sonda TaqMan

Corresponde a una ilustración esquemática del ejemplo planteado. Tomado de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053175.pdf

La utilidad de las sondas radicó gracias a que poseen un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula en el extremo 3' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés «quencher»); esta sonda marcada hibridó específicamente en la parte central del producto de PCR de interés de cada uno de los 14 SNPs pertenecientes a los 10 genes. De este modo, cuando se efectuó la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibridó en el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al quencher, no se emitió fluorescencia, posteriormente cuando la polimerasa se encontró con la sonda la hidrolizó mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provocó la separación del quencher del fluorocromo y por tanto, la emisión de fluorescencia exitosa que fue detectada utilizando el PCR en tiempo real ABI PRISM® 7900 (Applied Biosystems). Tabla 21. Esta técnica resultó óptima para nuestro estudio pues este requirió análisis para el genotipo de 1000 muestras con unos pocos SNPs.

Tabla 21. Indicador de lectura para las señales de fluorescencia

Presencia	Indicador
Sólo fluorescencia de la sonda marcada con VIC®	Homocigosidad del alelo 1.
Sólo fluorescencia de la sonda marcada con FAM™	Homocigosidad del alelo 2.
Fluorescencia de ambas sondas marcadas respectivamente con VIC® y FAM™	Heterocigosidad de alelo 1 y alelo 2.

Análisis de asociación genética

Se evaluó la asociación de EAP con los polimorfismos estudiados a través de pruebas de chi cuadrado de independencia, éstas se realizaron para evaluar la asociación alélica y genotípica. Se calcularon ORs con sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Estos análisis se realizaron utilizando el programa PLINK v1.07 (71). Debido a que otras variables pueden ser de confusión se construyeron modelos multivariados de regresión logística binaria, para realizar los ajustes debidos, incluyendo en el modelo las covariables, edad, género e índice de ancestría. Adicionalmente se realizaron análisis de asociación genotípica en la aplicación SNPAssoc del programa R versión 2.6.1, con el fin de tener una mejor claridad en la interpretación de las asociaciones al poder evaluarlas bajo diferentes modelos genéticos. De esta manera, se evaluó la asociación entre los polimorfismos y EAP bajo los modelos codominante, dominante, recesivo y sobredominante ajustando y sin ajustar por edad y género. Teniendo en cuenta que en algunos casos no es posible diferenciar entre varios modelos, se eligió aquel que tuviera el menor valor del criterio de información de Akaike (AIC) empleado desde 1973; como el modelo que mejor ajusta, según la ecuación:

$$AIC = -2(\log \text{ máxima verosimilitud}) + 2 (\text{número de parámetros})$$

Este criterio pondera el ajuste del modelo ($-2\log L$), donde L es la verosimilitud del modelo con la complejidad (número de parámetros). Cuando se comparan dos modelos, aquel con el AIC más bajo fué considerado el mejor (72).

Resultados

En este estudio se estableció la asociación de la EAP con factores de riesgo epidemiológico, 14 polimorfismos genéticos en los genes *MTHFR*, *SCARB1*, *IL-6*, *COX-2*, *ICAM-1*, *FGB*, *F5*, *NOS3*, *APOA5* y *VEGF* con la mezcla ancestral.

Frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de Hardy– Weinberg

Se estimaron las frecuencias alélicas, genotípicas y el equilibrio Hardy-Weinberg para casos y controles, utilizando el programa PLINK (Versión 1.07; <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink>), encontrándose después de la corrección por Bonferroni, todas en equilibrio tanto para individuos afectados con EAP como no afectados. Tabla 22.

Análisis de asociación alélica simple con EAP sin ajuste

Se determinó la asociación entre los casos y controles con la presencia de EAP con polimorfismos, mediante una prueba de chi cuadrado tanto para las frecuencias alélicas como genotípicas. Se determinó la asociación entre la EAP con 14 polimorfismos estudiados, se calculó el Odds Ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%. El nivel de significación estadística se fijó en el 5% y el ajuste para múltiples pruebas fue realizado con permutaciones ($n = 1000$). Para los anteriores análisis se utilizó el programa PLINK v 1.07. En el análisis de asociación alélica de cada SNP con EAP, se encontró asociación entre tres genes (*MTHFR*, *VEGF* e *ICAM1*). En el gen *MTHFR* rs1801133 para el alelo C, se logró determinar un OR de 1,7 ($p=0.0042$). Entre el alelo C del polimorfismo rs699947 en el gen *VEGF* se muestra un OR de 1,5 ($p=0,0040$) y para el alelo C del polimorfismo rs2010963 del mismo gen con un OR de 1,5 ($p=0.0001$). En la asociación alélica simple también se observó para el alelo G del polimorfismo rs2010963 del GEN *ICAM-1* un OR de 1,6 ($p= 0,0003$). Tabla 23.

Tabla 22. Distribución de frecuencias de genotipo según Hardy-Weinberg.

CHR	SNP	TEST	A1	A2	GENOTIPES	O(HET)	E(HET)	P ^a
1	rs1801133	Total	T	C	85/404/511	0,4040	0,4093	0,6993
1	rs1801133	Afectado	T	C	45/188/267	0,3760	0,4014	0,1806
1	rs1801133	No afectado	T	C	40/216/244	0,4320	0,4168	0,4536
1	rs6025	Total	A	G	39/308/653	0,3080	0,3115	0,6859
1	rs6025	Afectado	A	G	22/166/312	0,3320	0,3318	1,0000
1	rs6025	No afectado	A	G	17/142/341	0,2840	0,2900	0,6436
1	rs20417	Total	C	G	66/349/583	0,3497	0,3658	0,1664
1	rs20417	Afectado	C	G	37/170/291	0,3414	0,3699	0,0898
1	rs20417	No afectado	C	G	29/179/292	0,3580	0,3617	0,8052
4	rs1800787	Total	T	C	29/247/724	0,2470	0,2585	0,1771
4	rs1800787	Afectado	T	C	17/127/356	0,2540	0,2702	0,1850
4	rs1800787	No afectado	T	C	12/120/368	0,2400	0,2465	0,5848
6	rs699947	Total	C	A	85/407/507	0,4074	0,4108	0,8172
6	rs699947	Afectado	C	A	54/227/219	0,4540	0,4456	0,7632
6	rs699947	No afectado	C	A	31/180/288	0,3607	0,3674	0,7145
6	rs2010963	Total	C	G	85/340/573	0,3407	0,3805	0,1111
6	rs2010963	Afectado	C	G	52/188/259	0,3768	0,4140	0,0611
6	rs2010963	No afectado	C	G	33/152/314	0,3046	0,3414	0,0780
7	rs1799983	Total	T	G	75/380/545	0,3800	0,3896	0,4648
7	rs1799983	Afectado	T	G	49/184/267	0,3680	0,4050	0,0464
7	rs1799983	No afectado	T	G	26/196/278	0,3920	0,3730	0,2822
7	rs891512	Total	C	A	44/357/596	0,3581	0,3467	0,3606
7	rs891512	Afectado	C	A	28/202/267	0,4064	0,3844	0,2429
7	rs891512	No afectado	C	A	16/155/329	0,3100	0,3041	0,7690
7	rs1808593	Total	C	G	35/311/652	0,3116	0,3089	0,8380
7	rs1808593	Afectado	C	G	19/156/325	0,3120	0,3127	1,0000
7	rs1808593	No afectado	C	G	16/155/327	0,3112	0,3050	0,7689
7	rs1800795	Total	G	C	32/304/657	0,3061	0,3019	0,7524
7	rs1800795	Afectado	G	C	18/160/320	0,3213	0,3161	0,7784
7	rs1800795	No afectado	G	C	14/144/337	0,2909	0,2871	0,8760
11	rs662799	Total	C	T	69/395/533	0,3962	0,3917	0,7470
11	rs662799	Afectado	C	T	41/195/264	0,3900	0,4005	0,5766
11	rs662799	No afectado	C	T	28/200/269	0,4024	0,3824	0,2910
12	rs4765615	Total	T	C	31/342/625	0,3427	0,3229	0,0619
12	rs4765615	Afectado	T	C	18/179/303	0,3580	0,3376	0,2320
12	rs4765615	No afectado	T	C	13/163/322	0,3273	0,3075	0,1890
12	rs10846744	Total	G	C	113/477/408	0,4780	0,4563	0,1454
12	rs10846744	Afectado	G	C	66/230/204	0,4600	0,4619	0,9230
12	rs10846744	No afectado	G	C	47/247/204	0,4960	0,4503	0,0784
19	rs5498	Total	G	A	87/445/467	0,4454	0,4277	0,2086
19	rs5498	Afectado	G	A	49/264/186	0,5291	0,4623	0,0713
19	rs5498	No afectado	G	A	38/181/281	0,3620	0,3819	0,2425

^aCorrección por Bonferroni; Chr= chromosome; O(HET)= observed heterozygosity; E (HET)=

Tabla 23. Asociación alélica Simple

GEN	CRO	SNP	A1	A2	P	OR (95%CI)
MTHFR	1	rs1801133	T	C	0.0042	1.7 (1.35-2.51)
F5	1	rs6025	A	G	0.0540	1.2 (0.99-1.55)
COX2	1	rs20417	C	G	0.6768	1.0 (0.85-1.28)
FBG	4	rs1800787	T	C	0.2903	1.1 (0.89-1.45)
VEGF	6	rs699947	C	A	0.0040	1.5 (1.29-1.91)
VEGF	6	rs2010963	C	G	0.0001	1.5 (1.21-1.81)
NOS3	7	rs1799983	T	G	0.0849	1.2 (0.98-1.45)
NOS3	7	rs891512	C	A	0.0041	1.5 (1.23-1.89)
NOS3	7	rs1808593	C	G	0.7224	1.0 (0.83-1.30)
IL-6	7	Rs1800795	G	C	0.1862	1.2 (0.93-1.50)
APOA5	11	rs662799	C	T	0.3263	1.1 (0.91-1.35)
SCARB1	12	rs4765615	T	C	0.1605	1.2 (0.93-1.45)
SCARB1	12	rs10846744	G	C	0.3586	1.1 (0.91-1.31)
ICAM1	19	rs5498	G	A	0.0003	1.7 (1.35-1.99)

Análisis de asociación alélica simple con EAP ajustada

Se determinó la asociación entre los casos y controles con la presencia de EAP para los polimorfismos justamente en el alelo de riesgo, mediante una prueba de chi cuadrado. Se determinó la asociación entre la EAP con el alelo de riesgo de 14 polimorfismos estudiados, se calculó el odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95%. El OR fue ajustado entre cada SNP con potenciales factores de confusión (edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia) que fueron incluidos en el modelo.

En el alelo de riesgo (T) del *MTHFR*, el rs 1801133 se encontró asociado ($p=0,0037$) con un OR de 1.4 (1.17-1.52).

En cuanto a los alelos de riesgo (C) y (C) de los polimorfismos rs699947 y rs2010963 respectivamente del gen *VEGF*, mostraron una asociación altamente significativa ($p=6,21E-03$) con un OR de 2.7 (1.34-2.11) y una ($p=0,0001$) con un OR de 1,5 (1.25-1.79) respectivamente.

Para el alelo de riesgo (C) en *NOS3* (rs891512), presentó una ($p=0,0030$) con un OR de 1,7 (1.29-2.13).

En cuanto al alelo (G) de *ICAM1* (rs5498), se encontró una asociación altamente significativa ($p=3,22E-07$) con un OR de 2,1 (1.68-2.69). Tabla 24.

Tabla 24. Asociación del alelo de riesgo

GEN	CRO	SNP	Alelo de riesgo	P	OR (95%CI) ^a
MTHFR	1	rs1801133	T	0.0037	1.4 (1.17-1.52)
F5	1	rs6025	A	0.0538	1.2 (0.98-1.56)
COX2	1	rs20417	C	0.1868	1.1 (0.92-1.46)
FBG	4	rs1800787	T	0.0903	1.1 (0.87-1.45)
VEGF	6	rs699947	C	6,21E-03	2.7 (1.34-2.11)
VEGF	6	rs2010963	C	0.0001	1.5 (1.25-1.79)
NOS3	7	rs1799983	T	0.0649	1.2 (0.95-1.50)
NOS3	7	rs891512	C	0.0030	1.7 (1.29-2.13)
NOS3	7	rs1808593	C	0.4522	1.1 (0.85-1.42)
IL-6	7	rs1800795	G	0.1661	1.3 (0.98-1.68)
APOA5	11	rs662799	C	0.3007	1.1 (0.89-1.41)
SCARB1	12	rs4765615	T	0.1481	1.2 (0.92-1.79)
SCARB1	12	rs10846744	G	0.2151	1.3 (0.94-1.64)
ICAM1	19	rs5498	G	3,22E-07	2.1 (1.68-2.69)

Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia.

Análisis de asociación alélica simple y ancestría con EAP

Se observó que la ancestría amerindia se comporta como un factor protector, la europea se encuentra asociada para el alelo de riesgo de los genes *MTHFR* (rs1801133), e *ICAM1* (rs 5498) y la africana se encuentra consistentemente asociada en esta investigación con *VEGF* (rs699947 y rs2010963), *NOS3* (rs891512) e *ICAM1* (rs 5498). Tabla 25.

Tabla 25. Asociación del alelo de riesgo con la ancestría

GEN	CR	SNP	AR	p	OR (95%CI) ^a	p	OR (95%CI) ^b	p	OR (95%CI) ^c
		rs180113							
MTHFR	1	3	T	0.0001	0.1 (0.07-0.43)	0.0040	1.5 (1.17-2.44)	0.3548	0.8 (0.60-1.20)
F5	1	rs6025	A	0.0001	0.2 (0.06-0.41)	0.0050	1.2 (0.98-1.71)	0.4236	1.2 (0.61-1.41)
COX2	1	rs20417	C	0.0002	0.2 (0.07-0.46)	0.1829	1.2 (0.90-1.64)	0.1312	1.2 (0.87-1.46)
		rs180078		0.0002	0.2 (0.07-0.43)	0.6247	0.9 (0.62-1.32)	0.1016	1.1 (0.67-1.63)
FBG	4	7	T						
VEGF	6	rs699947	C	0.0001	0.1 (0.07-0.43)	0.1124	1.4 (0.91-2.25)	0.0007	1.7 (1.10-2.87)
		rs201096		0.0002	0.2 (0.07-0.42)	0.6657	1.1 (0.67-1.91)	0.0003	2.4 (1.12-2.85)
VEGF	6	3	C						
		rs179998		0.0002	0.2 (0.07-0.45)	0.1515	1.3 (0.91-1.85)	0.0812	1.2 (0.77-1.45)
NOS3	7	3	T						
NOS3	7	rs891512	C	0.0002	0.2 (0.06-0.47)	0.0823	1.3 (0.97-1.70)	0.0030	1.5 (1.04-2.17)
		rs180859		0.0002	0.2 (0.07-0.45)	0.4249	0.9 (0.59-1.24)	0.0002	1.2 (0.47-1.45)
NOS3	7	3	C						
				0.0002	0.1 (0.06-0.40)	0.4655	1.2 (0.78-1.62)	0.0002	1.1 (0.76-1.40)
		rs180079							
IL-6	7	5	G						
APOA5	11	rs662799	C	0.0004	0.3 (0.07-0.45)	0.4764	1.1 (0.86-1.84)	0.0002	1.2 (0.97-1.45)
		rs476561		0.0004	0.3 (0.07-0.45)	0.4873	1.2 (0.79-1.86)	0.0002	1.1 (0.57-1.45)
SCARB1	12	5	T						
		rs108467		0.0002	0.2 (0.05-0.42)	0.4982	1.3 (0.96-1.72)	0.0002	1.2 (0.07-1.42)
SCARB1	12	44	G						
ICAM1	19	rs5498	G	0.0002	0.2 (0.07-0.45)	0.0021	1.3 (0.14-1.55)	0.0021	1.3 (1.11-1.45)

^a Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría amerindia.

^b Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría europea.

^c Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría africana.

Evaluación de modelos genéticos

Se realizó la asociación genotípica mediante el paquete SNPAssoc del programa R v 3.1.2 para evaluar los diferentes modelos genéticos (codominante, dominante, recesivo y sobredominante), sin ajustar y ajustados por edad, fumar, diabetes, dislipidemia, hipertensión y ancestría. El mejor modelo de riesgo se eligió con base en el coeficiente AIC.

Se observó asociación genotípica bajo diferentes modelos de herencia, en los marcadores rs1801133, rs2010963, rs69994, rs5498, rs89151 y rs6025. El modelo para *MTHFR* fue dominante para el modelo ajustado (OR=1,63, IC95% 1.12-1,58, p=0.0004). Tabla 26. El modelo aditivo se identificó como el que presentan el mejor ajuste (menor valor AIC) para explicar la asociación entre el marcador rs2010963 y EAP, la interacción aditiva de los genotipos del gen *VEGF* se constituye en riesgo para la enfermedad con un valor ajustado (OR=1.44, IC95% 1.15-1.69, p=0.0011). El modelo dominante se identificó como el que presentan el mejor ajuste (menor valor AIC) para explicar la asociación entre el marcador rs699947 y EAP, el genotipo CC del gen *VEGF* se constituye en riesgo para la enfermedad (OR=2.07, IC95% 1.56-2.76, p=0.0012). Tabla 27. El modelo dominante presenta el mejor ajuste con el menor valor AIC, para explicar la asociación entre el marcador rs5498 y EAP. El genotipo AA del gen *ICAM1* se constituye en riesgo para la enfermedad (OR=2.84, IC95% 2.11-3,82, p=0.0001) Tabla 28. El modelo dominante se identificó como el que presenta el mejor ajuste (menor valor AIC) para explicar la asociación

entre el marcador rs891512 y EAP. El genotipo CC del gen *NOS3* se constituye en riesgo para la enfermedad (OR=1.81, IC95% 1.35-2.42, p=0.0020). Tabla 29.

Tabla 26. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen MTHFR con EAP

Modelos Genéticos	OR Crudo (CI95%)	P	AIC	OR Ajustado (CI95%)	p ^a	AIC
Codominante (rs1801133)		0,1500	119		0,1440	118
C/C	1,00			1,00		
C/T	1,10 (0,81-1,45)			1,11 (0,83-1,50)		
T/T	1,70 (1,00-2,93)			1,71 (1,10-2,93)		
Dominante (rs1801133)		0,0008	116		0,0004	115
C/C	1,00			1,00		
C/T-T/T	1,62 (1,10-1,63)			1,63 (1,12-1,58)		
Recesivo (rs1801133)		0,8400	118		0,8370	118
C/C-C/T	1,00			1,00		
T/T	1,02(0,76-1,39)			1,03 (0,77-1,37)		
Sobredominante (rs1801133)		0,0670	118		0,0630	117
C/C-T/T	1,00			1,00		
C/T	1,50 (0,93-2,13)			1,57 (0,96-2,12)		
log-Aditivo (rs1801133)		0,0880	118		0,0820	118
0,1,2	1,19 (0,96-1,50)			1,22 (0,97-1,52)		

^a Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría.

Tabla 27. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen VEGF con EAP

Modelos Genéticos	OR Crudo (CI95%)	P	AIC	OR Ajustado (CI95%)	P ^a	AIC
Codominante (rs2010963)		0,001	117		0,001	117
G/G	1,00			1,00		
C/G	1,66 (1,22-2,29)			1,68 (1,24-2,29)		
C/C	1,65 (1,11-2,83)			1,68 (1,12-2,81)		
Codominante (rs69994)		0,008	117		0,007	116
A/A	1,00			1,00		
A/C	2,02 (1,45-2,82)			2,08 (1,53-2,81)		
C/C	2,04(1,20-3,53)			2,06 (1,21-3,51)		
Dominante (rs2010963)		0,001	118		0,001	117
G/G	1,00			1,00		
C/G-C/C	1,68 (1,26-2,26)			1,68 (1,26-2,24)		
Dominante (rs69994)		0,001	115		0,001	115
A/A	1,00			1,00		
A/C-C/C	2,07 (1,53-2,78)			2,07 (1,56-2,76)		
Recessive (rs2010963)		0,001	119		0,001	118
G/G-G/C	1,00			1,00		
C/C	1,47 (0,87-2,51)			1,49 (0,90-2,49)		
Recessive (rs69994)		0,003	117		0,002	116
A/A-A/C	1,00			1,00		
C/C	1,32 (0,88-2,37)			1,39 (0,90-2,33)		
Sobredominante (rs2010963)		0,003	117		0,003	117
G/G-C/C	1,00			1,00		
C/G	1,56 (1,14-2,16)			1,57 (1,16-2,12)		
Sobredominante (rs69994)		0,059	117		0,055	116
A/A-C/C	1,00			1,00		
A/C	1,83 (1,37-2,52)			1,87 (1,40-2,51)		
log-Additive (rs2010963)		0,001	116		0,001	116
0,1,2	1,32 (1,12-1,82)			1,44 (1,15-1,79)		
log-Additive (rs69994)		0,078	117		0,077	116
0,1,2	1,52 (1,30-2,14)			1,68 (1,34-2,11)		

^a Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría.

Tabla 28. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen ICAM-1 con EAP

Modelos Genéticos	OR Crudo CI95%)	P	AI C	OR Ajustado (CI95%)	p ^a	AI C
Codominante (rs5498)		0,000				11
		1	115		0,0001	4
A/A	1,00			1,00		
A/G	2,73 (2,05-3,83)			2,82 (2,07-3,83)		
G/G	2,85 (1,64-5,14)			2,94 (1,69-5,11)		
Dominante (rs5498)		0,000				11
		1	114		0,0001	3
A/A	1,00			1,00		
A/G-G/G	2,77 (2,09-3,83)			2,84 (2,11-3,82)		
Recesivo (rs5498)		0,000				11
		1	117		0,0001	7
A/A-A/G	1,00			1,00		
G/G	1,65(1,02-2,93)			1,73 (1,03-2,90)		
Sobredominante (rs5498)		0,000				11
		1	115		0,0001	5
A/A-G/G	1,00			1,00		
A/G	2,29(1,73-3,22)			2,38 (1,77-3,18)		
log-Aditivo (rs5498)		0,000				11
		1	114		0,0001	4
0,1,2	2,11 (1,64-2,73)			2,13 (1,68-2,70)		

^a Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría.

Tabla 29. Modelos genéticos de polimorfismos en el gen NOS3 con EAP

Modelos Genéticos	OR Crudo (CI95%)	p	AIC	OR Ajustado (CI95%)	p ^a	AIC
Codominante (rs891512)		0,0022	117		0,0020	116
A/A	1,00			1,00		
C/A	1,66 (1,21-2,39)			1,76 (1,31-2,38)		
C/C	2,22 (1,03-4,71)			2,25 (1,08-4,69)		
Codominante (rs1808593)		0,6900	118		0,6800	118
G/G	1,00			1,00		
G/T	1,12 (0,75-1,57)			1,15 (0,85-1,55)		
T/T	1,03 (0,44-2,32)			1,06 (0,49-2,31)		
Codominante (rs1799983)		0,2054	118		0,2050	118
G/G	1,00			1,00		
G/T	1,10 (0,81-0,52)			1,11 (0,82-0,49)		
T/T	1,55 (0,92-2,90)			1,65 (0,94-2,90)		
Dominante (rs891512)		0,0023	116		0,0020	115
A/A	1,00			1,00		
A/C-C/C	1,71 (1,33-2,44)			1,81 (1,35-2,42)		
Dominante (rs1808593)		0,3918	118		0,3916	118
G/G	1,00			1,00		
G/T-T/T	1,13 (0,84-1,53)			1,14 (0,85-1,52)		
Dominante (rs1799983)		0,2571	118		0,2569	118
G/G	1,00			1,00		
G/T-T/T	1,15 (0,86-1,59)			1,18 (0,89-1,57)		
Recesivo (rs891512)		0,0679	118		0,0678	117
A/A-A/C	1,00			1,00		
C/C	1,78 (0,87-3,72)			1,80 (0,88-3,71)		
Recesivo (rs1808593)		0,0973	118		0,0970	118
G/G-G/T	1,00			1,00		
T/T	1,01 (0,46-2,24)			1,02 (0,47-2,20)		
Recesivo (rs1799983)		0,0983	118		0,0980	118
G/G-G/T	1,00			1,00		
T/T	1,52 (0,89-2,76)			1,58 (0,91-2,74)		
Sobredominante (rs891512)		0,0009	117		0,0006	117
A/A-C/C	1,00			1,00		
A/C	1,62 (1,21-2,26)			1,67 (1,24-2,25)		
Sobredominante (rs1808593)		0,3863	118		0,3860	118
G/T-T/T	1,00			1,00		
G/T	1,12 (0,83-1,58)			1,14 (0,84-1,55)		
Sobredominante (rs1799983)		0,7962	118		0,7960	118
G/T-T/T	1,00			1,00		
G/T	1,02 (0,73-1,44)			1,04 (0,77-1,40)		
log-Additive (rs891512)		0,0007	117		0,0006	116
0,1,2	1,56 (1,26-2,15)			1,66 (1,29-2,13)		
log-Additive (rs1808593)		0,4511	118		0,4510	118
0,1,2	1,10 (0,84-1,43)			1,10 (0,86-1,42)		
0,12	1,19 (0,92-1,52)	0,1140	118	1,20 (0,96-1,51)	0,1130	118

^a Ajustado edad, consumo de cigarrillo, hipertensión, diabetes y dislipidemia y ancestría.

Discusion

Este estudio muestra por primera vez la asociación de polimorfismos en cuatro genes (*MTHFR*, *NOS3*, *ICAM1* y *VEGF*) en el departamento del Cauca, constituyendo a las vías del estrés oxidativo, la adhesión endotelial y la angiogénesis como las bases moleculares de esta enfermedad en nuestra región.

En el mundo se ha establecido una asociación del polimorfismo C677T con ECV. Un meta-análisis que sintetizó 40 estudios tipo caso-control, logró determinar la relación del genotipo TT con enfermedad arterial coronaria presentando una tasa de riesgo 16% mayor (OR: 1,16. 95% IC: 1,05-1,28) en comparación con la población que tenía el genotipo CC (73). Lewis y colaboradores establecieron un riesgo 34% (OR: 1,34. 95% IC: 1,12-1,62) para el desarrollo de la enfermedad coronaria en individuos con un incremento de 5 μ mol/L de homocisteína plasmática (74). En cuanto al desarrollo de EAP, se ha demostrado una asociación significativa del polimorfismo con riesgo para la enfermedad, donde el genotipo TT confiere un riesgo 1,18 veces más en comparación con la población control (OR: 1,18. 995%IC: 0,89-1,58) (13). En este estudio el alelo de riesgo T del rs 1801133 estuvo asociado ($p=0,0037$) con un OR de 1.4 (1.17-1.52). En la última década se encontraron asociaciones significativas entre ciertos polimorfismos genéticos y niveles plasmáticos de homocisteína en mujeres de diferentes grupos étnicos raciales, encontrándose que el alelo de menor frecuencia de las mutaciones *MTHFR* 677C>T polimorfismo fue más bajo en las mujeres negras de 12.1%, los blancos 33.1% y asiáticos 24,0% (75). Las variaciones en *MTHFR* están asociados con el riesgo de ECV en los hombres blancos no hispanos (76). En un estudio la frecuencia del genotipo TT se presentó en un 11,6% en los blancos no hispanos y tras ajustar por grupo étnico y otros factores de riesgo de ECV, el genotipo *MTHFR* C677T con el genotipo TT fue asociado con la mortalidad por ECV (77). En Latinoamérica se ha realizado un estudio en Brasil que asocia la hiperhomocisteinemia con aumento del riesgo de la enfermedad arterial coronaria, la mutación C677T *MTHFR* se estudió en 772 sujetos (480 caucásicos Brasileños y 292 Brasileños africanos) encontrándose que la frecuencia del alelo 677T se incrementó en caucásicos brasileños (28,1%) en comparación con la frecuencia observada en los brasileños de África (18,3%), en brasileños africanos la mutación no se asoció con enfermedad arterial coronaria (78). Este trabajo apoya el papel del *MTHFR* y su riesgo en personas con ascendencia europea ($p=0,0040$) con un OR de 1.5 (1.17-2.44). *MTHFR* C677T es un polimorfismo común que se ha asociado EAP mediante un modelo dominante, el cual ha producido resultados significativos en 3 estudios, mostrando una asociación positiva (61, 79, 80). En esta tesis predominó el modelo dominante con una ($p=0,0004$) y un OR ajustado de 1.1 (1.12-1.58) lo cual es consecuente con lo reportado en la literatura.

Los polimorfismos del gen *NOS3* clínicamente más relevantes son la variante sin G/T (rs 1799983) G/A (rs891512) y T/G (rs1808593), se ha visto que causan baja disponibilidad de ON, lo cual se traduce en deficiencias para la función normal del endotelio, contribuyendo a la aceleración de la formación de la placa aterosclerótica (18-20). En este estudio se encontró asociación alélica simple con una de sus

variantes polimórficas la G/A rs891512 ($p= 0,0041$) OR= 1,7 (1,29-2,13) y en el ajuste por covariables para el alelo de riesgo ($p= 0,0030$) OR= 1,5 (1,04-1,17). En cuanto se realizó el ajuste por la ancestría el riesgo fue notable para la ancestría africana ($p= 0,0030$) OR= 1,5 (1,04-1,17) y el modelo aditivo se presentó asociado para la enfermedad, este es un importante hallazgo debido a que este polimorfismo ha sido analizado en menos medida para grupos latinoamericanos demostrando su asociación con hipertensión (81), pero aún no se ha mostrado esta relación con EAP.

ICAM-1 ha demostrado ser predictor independiente de la aterosclerosis periférica (50). Niveles plasmáticos elevados de formas solubles de esta molécula han sido asociados con EAP (51). La actividad física que actúa como factor protector en ECV, se ha asociado independientemente con menores niveles ICAM-1 en pacientes con EAP (52). En nuestro estudio se encontró asociación del polimorfismo rs5498 (G1548A) con EAP siendo el primer estudio en el planeta que reporta asociación con esta variante polimórfica para EAP. El polimorfismo rs5498 (G1548A) se había encontrado con una mayor frecuencia en pacientes con estenosis aterosclerótica lo cual lo convertía en un blanco fundamental para el estudio de nuestra patología de interés (82). Se encontró en la tesis que ICAM1 mostro una consistente asociación entre alélica simple ($p= 0,0003$) OR= 1,7 (1,35-1,99) y ajustada ($p= 3,22E-07$) OR= 2,1 (1,68-2,69), en cuanto al factor ancestría se encontró asociada para los grupos poblacionales europeos y africanos ($p= 0,0021$) OR= 1,3 (1,14-1,55) y ($p= 0,0021$) OR= 1,3 (1,11-1,45) respectivamente, por otra parte el modelo codominante estuvo asociado a EAP.

Se ha encontrado una relación significativa de VEGF entre los polimorfismos rs699947 y rs2010963 con trastornos en la vasculatura (65-67). VEGF podría tener un papel en la aterogénesis y la inestabilidad de la placa a través de mecanismos proinflamatorios y angiogénicos (68), se ha observado que en pacientes con EAP esta citoquina pro-angiogénica se encuentra elevada (69). A pesar de las anteriores asociaciones con trastornos vasculares no hay suficientes estudios que demuestren la asociación de polimorfismos con la enfermedad únicamente se ha evidenciado para el año 2012 la asociación con 2578 C/A (rs rs699947) y 405 G/C (rs2010963) encontrándose una asociación con EAP en pacientes que padecían diabetes en 70 únicamente pacientes (83). Nuestro estudio abre la posibilidad de hacerlo en 500 pacientes con EAP encontrando fuerte evidencia de asociación C/A (rs rs699947) con una $p= 0,0040$ OR= 1,5 (1,29-1,91) y 405 G/C (rs2010963) con una $p= 0,0001$ OR= 1,5 (1,21-1,81), cuando se da el ajuste por covariables para el alelo de riesgo la asociación se manifiesta aún más fuerte especialmente para el rs699947 $p= (6,21 E-03)$ OR 2,7 (1,34-2,11). Cuando el análisis se corrige por ancestría se puede observar que existe un riesgo únicamente para individuos con ascendencia africana rs699947 ($p= 0,0003$) OR= 2,4 (1,12-2,85) y para rs2010963 ($p= 0,0007$) OR= 1,7 (1,10-2,87), lo cual es concordante con estudios que evidencian asociación con este grupo poblacional (84). El modelo dominante para rs69994 sugiere ser un factor de riesgo para la aterosclerosis de los vasos

periféricos simultáneamente el modelo dominante en rs2010963 resulto explicar mejor la asociación con EAP.

Por otra parte a pesar de que los demás genes incluidos en este estudio mostraron asociación en la literatura mundial, en la población de nuestro departamento no se reportó dicha asociación. Por su parte, un estudio muestra a F5 como candidato de incremento a EAP (60). Controversialmente otros estudios no han logrado evidenciar la asociación de F5 con EAP (61, 85). Incluso es conocido que desde la infancia, se describen las altas frecuencias del alelo de riesgo A del factor V G1691A, en niños con antecedentes familiares de enfermedad coronaria (86). Se debe indagar más sobre la cascada trombótica superpuesta sobre una placa aterosclerótica inestable con el fin de descubrir evidencia que vincula eventos aterotrombóticos (87). En nuestro estudio al ajustar por covariables y ancestría no encontramos asociación de F5 con la enfermedad. A parte de su papel en las reacciones de coagulación; FGB participa en el desarrollo de la aterosclerosis mediante la promoción de la adhesión de plaquetas y células blancas sanguíneas a la superficie endotelial (57). Niveles altos de fibrinógeno han sido asociados con EAP, incluso después de ajustar por factores de riesgo de ECV tradicionales (58, 88). En nuestro estudio no se evidencio dicha asociación en el análisis genético lo cual se puede explicar porque a pesar de que se encuentran niveles serológicos de FGB, el polimorfismo rs18000787 no ha evidenciado asociación con EAP y precisamente se quería dilucidar esta incógnita en este estudio pero cabe anotar que en la literatura este polimorfismo es controversial y muestra tanto asociación como protección, en un estudio realizado en Grecia parece conferir protección a la aparición de EAC reduciendo el riesgo en un 50% (89), pero este mismo polimorfismo ha mostrado asociación en africanos (55) aunque distintamente teniendo en cuenta este mismo grupo étnico para 2015 el polimorfismo no mantuvo asociación (90).

IL6 se asocia de manera independiente con EAP en afroamericanos (40). Entre las citoquinas, IL-6 es una de las más estudiadas en EAP, es reconocida por su papel en la respuesta inflamatoria de fase aguda, se ha demostrado que el aumento de concentraciones en el suero tiene un doble riesgo para EAP (41), en nuestro estudio no se reportó dicha asociación lo cual se explica porque los resultados de estudios epidemiológicos que se han centrado en las asociaciones de IL-6 -174G> C y enfermedades ateroscleróticas, siguen siendo controvertidos, un meta-análisis de 50 estudios encontró heterogeneidad en sus resultados, es decir el análisis de subgrupos no demostraron asociación significativa con el desarrollo de la aterosclerosis, sin embargo algunos si lo demostraron por tanto se sugiere que estos resultados sean interpretados con cautela (91).

En cuanto a COX-2, aunque se ha discutido evidencia existente acerca de la asociación del polimorfismo rs20417 con el papel protector frente al desarrollo de EAC con un OR: 0,80 (95%IC: 0,65-0,98) (43) y así mismo que su presencia puede contribuir en el desarrollo inflamatorio de la patogenia de la aterosclerosis (45). En nuestro estudio no se encontró acción protectora o de riesgo frente a la enfermedad, en los análisis de alelo de riesgo.

El inadecuado funcionamiento de APOA5, se ha asociado con un modelo pro-aterogénico en ECV pero nunca antes se ha reportado en la literatura mundial la asociación de APOA5 para EAP, esta tesis muestra por primera vez en la literatura científica un estudio de -1131CT> C (rs662799) con la enfermedad de interés, encontrando ningún grado de asociación genética existente entre el polimorfismo y la enfermedad.

El alelo C del SNP rs10846744 de SCARB1 se ha visto asociado con aterosclerosis (24) y se ha encontrado que el SNP rs4765615 impide la reducción de colesterol e incluso la acción de estatinas (25). Incluso las variaciones genéticas del receptor SR-BI se han encontrado asociadas con EAP en individuos sin distinción de género (26), cabe anotar que desde el 2007 no se han replicado asociaciones de estos polimorfismos con la enfermedad lo que nos deja una brecha de 8 años sin reconocer la replicabilidad de estos resultados en más estudios asociados, en nuestro caso no se presentó dicha asociación con la enfermedad para nuestra población.

Un hallazgo crucial dentro de la investigación es el factor protector que confiere el grupo poblacional nativo americano para la totalidad de los polimorfismos de los 10 genes, en este caso particular no se encuentra literatura a nivel mundial que demuestre el factor protector de la ancestría americana para la enfermedad constituyéndose este estudio en el primer estudio a nivel mundial que demuestra este tipo de asociación. En cuanto a MTHFR nunca antes se ha asociado a ancestría amerindia y EAP como factor protector. Existe un estudio que evaluó los altos niveles de homocisteína en mexicanos en sujetos amerindios de diferentes regiones de México y se demostró una contribución amerindia en la frecuencia TT de (33%), pero no se asoció a ninguna enfermedad en particular (92). Por otra parte un estudio realizado en población amerindia Mexicana, se encontraron diferencias notables fue que observó que el alelo que no es de riesgo C, tenía baja frecuencia para la tribu trikis (7,8%), mientras que el rango de presencia del alelo era de 29,3% y 53,7% para los Purépechas y yaquis, respectivamente (93). Teniendo en cuenta lo anterior esto podría explicar el factor protector encontrado en nuestro estudio (OR= 0.1 (0.07-0.43)).

Disparidades interétnicas en la distribución de polimorfismos del eNOS pueden afectar el ON. Si bien hay diferencias entre los sujetos blancos y negros poco se conoce sobre la distribución de los alelos del gen eNOS en los amerindios. Un estudio en tribus de la amazonia brasileña, muestra que los polimorfismos relacionados con enfermedades cardiovasculares son menos comunes en los amerindios (94). Lo anterior podría explicar en parte el factor protector que confiere la ancestría amerindia con la enfermedad para los polimorfismos aquí estudiados rs1799983 (OR= 0.2 (0.07-0.45)), rs891512 (OR= 0.2 (0.06-0.47)) y rs1808593 (OR= 0.2 (0.07-0.45)).

En cuanto a F5 a pesar de que se han realizado recientemente estudios asociados a trombosis venosa profunda, en pacientes chilenos con origen étnico amerindio no se ha asociado la variante rs6025 a la enfermedad estudiada en esta publicación (95). Tampoco se ha demostrado el factor protector de amerindios con EAP, como

en nuestro estudio (OR= 0.2 (0.06-0.41)). Por otra parte los alelos del gen de la beta-fibrinógeno (FGB) son más comunes en los amerindios de las tierras altas (quechua) en Sur América que los amerindios Na-Dene de Norte América en la población general, según un estudio realizado en 2003 estos datos no apoyan la hipótesis de que la selección ha actuado para eliminar los alelos asociados con la hipercoagulabilidad en las tierras andinas (96). Por tanto a pesar de que no hay un estudio consistente de protección de amerindios con la EAP, sería interesante realizar más estudios que relacionen las variantes aquí analizadas y que dieron como resultado protección (OR= 0.2 (0.07-0.43)).

El proceso inflamatorio se ha considerado un mediador importante para el desarrollo de la aterosclerosis. Estudios de polimorfismos en Brasil se han llevado a cabo con el objetivo de investigar la asociación IL-6 con la enfermedad arterial coronaria en afro-brasileños y caucásicos, encontrándose asociación en afro-brasileños y ninguna asociación con caucásicos-brasileños (78). Pero a la fecha no se ha investigado la relación de enfermedades cardiovasculares en poblaciones netamente amerindias o tan siquiera se ha realizado corrección por ancestría para las ECV ó la EAP excepto en el actual estudio rs1800795 (OR= 0.1 (0.06-0.40).

En cuanto a COX-2, APOA5 e ICAM1 no se encuentran estudios que confieran protección de la ancestría amerindia con la enfermedad, en este estudio se observó un (OR= 0.2 (0.07-0.46)); (OR= 0.3 (0.07-0.45)); (OR= 0.2 (0.07-0.45)); respectivamente para cada gen.

Estudios en hispanos han demostrado que rs10846744 de *SCARB1*, ejerce un efecto importante en la aterosclerosis subclínica y ECV (97). Por otra parte no se han reportado estudios de asociación protectora en poblaciones amerindias con EAP. Este estudio constituye el primer hallazgo para la enfermedad que confiere protección a la población nativo americana rs4765615 (OR= 0.3 (0.07-0.45) y rs10846744 (OR=0.2 (0.05-0.42).

A pesar de que se han estudiado polimorfismos de VEGF en poblaciones mestizas como el Brasil encontrándose estudios de asociación con enfermedad arterial coronaria, no se ha realizado corrección por ancestría para dilucidar el efecto de los polimorfismos con poblaciones amerindias (98). Por tanto este es el primer estudio que confiere resultados de protección de nativos americanos con la EAP rs699947 (OR= 0.1 (0.07-0.43) y rs2010963 (OR= 0.2 (0.07-0.42).

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a una mayor comprensión de la arquitectura del desarrollo de EAP (factor de riesgo-gen-ancestría), también los polimorfismos aquí estudiados podrían ser establecidos a futuro como biomarcadores en nuestra población para establecer riesgo con la enfermedad. Dada la asociación de VEGF, el estudio de los polimorfismos en este gen serían determinantes para conocer en la angiogénesis, si hay o no posibilidad a futuro mediante terapias génicas de un aumento en el desarrollo de vasos colaterales sobre los tejidos isquémicos en pacientes con EAP para así evitar amputaciones en pacientes con enfermedad avanzada.

Bibliografía

1. Chang CQ YA, Rowell JL, Pimentel CB, Clyne M, Gwinn M, Khoury MJ, Wulf A, Schully SD. A systematic review of cancer GWAS and candidate gene meta-analyses reveals limited overlap but similar effect sizes. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:402-8.
2. Hardy J SA. Genomewide association studies and human disease. *N Engl J Med.* 2009;360:1759–68.
3. Marian A. Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res.* 2012;159:64-79.
4. Rogers J GR. Comparative primate genomics: emerging patterns of genome content and dynamics. *Nat Rev Genet.* 2014;5:347-59.
5. Leeper NJ KI, Cooke JP. Genetics of Peripheral Artery Disease. *Circulation.* 2012;125:3220-8.
6. Hirschhorn JN LK, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med.* 2002;4:45-61.
7. Evinova Andrea BE, Stanislav Straka, Ondrejka Igor and Jan Lehotsky. Analysis of genetic polymorphisms of brain-derived neurotrophic factor and methylenetetrahydrofolate reductase in depressed patients in a Slovak (Caucasian) population. *Gen Physiol Biophys.* 2012;31:415–22.
8. Brustolin S GR, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43:1-7.
9. Pollex RL MM, Zinman B, Harris SB, Hanley AJ, Hegele RA. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;17:4.
10. Farbstein D LA. The genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiology clinics.* 2010;28:477-96.
11. Roy H B, S., Herttuala, S. Molecular genetics of atherosclerosis. *Human Genetics.* 2009;125:467-91.
12. Fauci Anthony BE, Kasper Dennis, Hauser Stephen , Longo Dan , J. Jameson, Loscalzo Joseph. *Harrison's: principles of internal medicine*, 17th Edition. New York: Mc GraHill; 2008.
13. Khandanpour N WG, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, Finglas PM, Jennings BA. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase

(MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2009;49:711-8.

14. Marsden PA HH, Scherer SW. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;174:78-88.

15. Dudzinski DM TM. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007 247–60.

16. Ma ZJ CR, Ren HZ, Guo X, Guo J, Chen LM. Association between eNOS 4b/a polymorphism and the risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Diabetes Res.* 2014;8.

17. Forstermann U WCS. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33:829-37.

18. Rai H PF, Kumar S, Kapoor A, Sinha N. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. *PLoS One.* 2014;9:e113363.

19. Kullo IJ GM, Boerwinkle E, Chu J, Turner ST, Kardina SL. Association of polymorphisms in NOS3 with the ankle-brachial index in hypertensive adults. *Atherosclerosis.* 2008;196:905-12.

20. Wu X WZ, Xu Y, Ren R, Heng BL, Su ZX. Association between three eNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:5317-24.

21. Casas JP CG, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2006;164:921–35.

22. Savvidou MD VP, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension.* 2001;38:1289–93.

23. Niemsiri V WX, Pirim D, Radwan ZH, Hokanson JE, Hamman RF, Barmada MM, Demirci FY, Kamboh MI. Impact of genetic variants in human scavenger receptor class B type I (SCARB1) on plasma lipid traits. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7:838-47.

24. Naj AC WM, Rich SS, Post W, Kao WH, Wasserman BA, Herrington DM, Rodriguez A. Association of scavenger receptor class B type I polymorphisms with subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:47-52.

25. Peters BJ PH, Klungel OH, Stricker BH, Psaty BM, Glazer NL, Wiggins KL, Bis JC, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Genetic variability within the cholesterol lowering pathway and the effectiveness of statins in reducing the risk of MI. *Atherosclerosis*. 2011;217:458-64.
26. Ritsch A SG, Sandhofer A, Stanzl U, Tancevski I, Eller P, Schgoer W, Wehinger A, Mueller T, Haltmayer M, Patsch JR. Scavenger receptor class B type I polymorphisms and peripheral arterial disease. *Metabolism*. 2007;56:1135-41.
27. Saddar S CV, Lee W. . Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a plasma membrane cholesterol sensor. *Circ Res*. 2013;1:140–51.
28. Rodríguez Esparragón F HTY, Macías Reyes A, Hernández Ortega E, Medina A, Rodríguez Pérez JC. Concerning the significance of paraoxonase-1 and SR-B1 genes in atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59:154-64.
29. Pennacchio LA OM, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC. An apolipoprotein influencing triglycerides and mice revealed by comparative sequencing. *Science*. 2001;94:169-73.
30. Van Der Vliet HN SM, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH,. A novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biochem*. 2001;276:44512-20.
31. Garelnabi M1 LK, Jin J, Chai F, Santanam N. The paradox of ApoA5 modulation of triglycerides: evidence from clinical and basic research. *Clin Biochem*. 2013;1:12-9.
32. Lai CQ DS, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res*. 2004;45:2096-105.
33. Zhou J XL, Huang RS, Huang Y, Le Y, Jiang D, Yang X, Xu W, Huang X, Dong C, Ye M, Lian J, Duan S. Apolipoprotein A5 gene variants and the risk of coronary heart disease: a case- control study and meta- analysis. *Mol Med Rep*. 2013;8:1175-82.
34. De Caterina R TP, Merlin! PA, Foco L, Pastorino R, Altshuler D. Strong association of the APOA5-1131T>C gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2011;214:397–403.
35. Elosua R OJ, Cupples LA, Lai CQ, Demissie S, Fox CS. Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J Lipid Res*. 2006;47:990–6.
36. Rauramaa R VS, Luong LA, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, Toyry J, Humphries SE. Stromelysin-1 and interleukin-6 gene promoter

polymorphisms are determinants of asymptomatic carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2657–62.

37. Chumaeva N HM, Pulkki-Råback L, Jokela M, Juonala M, Lehtimäki T, Raitakari OT, Keltikangas-Järvinen L. Interleukin-6 gene polymorphism, chronic stress and atherosclerosis: interleukin-6-174G>C polymorphism, chronic stress and risk of early atherosclerosis in the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Psychosom Res.* 2014;6:333-8.

38. Bennet A PJ. Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2003;171:359–67.

39. Wang K DP, Zhang HF, Li ZJ, Yang XM, Liu H. Role of interleukin-6 gene polymorphisms in the risk of coronary artery disease. *Genet Mol Res.* 2015;14:3177-83.

40. Ye Z AZ, Klee GG, Mosley TH Jr, Kullo IJ. Associations of candidate biomarkers of vascular disease with the ankle-brachial index and peripheral arterial disease. *Am J Hypertens.* 2013;26:495-502.

41. Signorelli SS MM, Spandidos DA, Malaponte G. *Int J Mol Med.* Proinflammatory circulating molecules in peripheral arterial disease. 2007;20:279-86.

42. Belton OA, Duffy A. Cyclooxygenase Isoforms and Platelet Vessel Wall Interactions in the Apolipoprotein E Knockout Mouse Model of Atherosclerosis. *circulation.* 2013;108:3017–23.

43. Wenlong Li JX, Xiaojian Wang, Jingzhou Chen, Channa Zhang, Kai Sun, Rutai Hui. Cyclooxygenase-2 (COX-2) G-765C is a protective factor for coronary artery disease but not for ischemic stroke: a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 2009;207:492–5.

44. Schönbeck U SG, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999;155:1281-91.

45. Flórez A dHJ, Martínez E, Varela C, Bleda S, Acín F. Selective cyclooxygenase-2 inhibition reduces endothelial dysfunction and improves inflammatory status in patients with intermittent claudication. *Rev Esp Cardiol.* 2009;8:851-7.

46. Brevetti G SV, Chiariello M. Cellular adhesion molecules and peripheral arterial disease. *Vasc Med.* 2006;11:39–47.

47. Lawson C WS. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep.* 2009;61:22-32.

48. Bielinski SJ RA, Nickerson D, Carlson C, Bailey KR, Thyagarajan B, Lange LA, Boerwinkle EA, Jacobs DR Jr, Gross MD. Polymorphisms in the ICAM1 gene predict circulating soluble intercellular adhesion molecule-1(sICAM-1). *Atherosclerosis*. 2011;216:390-4.
49. Yang Y JC, Liu JH, Zhang R, Joachimiak A, Springer TA, Wang JH. Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface. *Mol Cell*. 2004;14:269–76.
50. Pradhan AD SS, Cook NR, Rifai N, Creager MA, Ridker PM. Symptomatic peripheral arterial disease in women: nontraditional biomarkers of elevated risk. *Circulation*. 2008;117:823–31.
51. Aruna D. Pradhan NR. Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1, Soluble Vascular Adhesion Molecule-1, and the Development of Symptomatic Peripheral Arterial Disease in Men. *circulation*. 2002;106:820–5.
52. Craft LL GJ, Ferrucci L, Liu K, Tian L, Criqui MH, Tan J, McDermott MM. Physical activity during daily life and circulating biomarker levels in patients with peripheral arterial disease. *Am J Cardiol*. 2008;102:1263-8.
53. Makin A SS, Lip GY. Peripheral vascular disease and Virchow's triad for thrombogenesis. *QJM*. 2002;95:199-210.
54. Fish RJ NM. Fibrinogen gene regulation. *Thromb Haemost*. 2012;108:419-26.
55. Wassel CL LL, Keating BJ, Taylor KC, Johnson AD, Palmer C, Ho LA, Smith NL, Lange EM, Li Y, Yang Q, Delaney JA, Tang W, Tofler G, Redline S, Taylor HA Jr, Wilson JG, Tracy RP, Jacobs DR Jr, Folsom AR, Green D, O'Donnell CJ, Reiner AP. Association of genomic loci from a cardiovascular gene SNP array with fibrinogen levels in European Americans and African-Americans from six cohort studies: the Candidate Gene Association Resource (CARE). *Blood*. 2011;117:268-75.
56. Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemost*. 2003;89:601–9.
57. Harley SL SJ, Powell JT. Regulation by fibrinogen and its products of intercellular adhesion molecule-1 expression in human saphenous vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:652–8.
58. Allison MA CM, McClelland RL, Scott JM, McDermott MM, Liu K, Folsom AR, Bertoni AG, Sharrett AR, Homma S, Kori S. The effect of novel cardiovascular risk factors on the ethnic-specific odds for peripheral arterial disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1190-7.
59. Segers K DB, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thrombosis Haemost*. 2007;3:530–42.

60. Zintzaras E ZN. A field synopsis and meta-analysis of genetic association studies in peripheral arterial disease: The CUMAGAS-PAD database. *Am J Epidemiol.* 2009;170:1-11.
61. Sofi F LB, Rogolino A. Thrombophilic risk factors for symptomatic peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2005;41:255-60.
62. Ferrara N GH-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9:669-76.
63. Tudor RM FB, Voelkle NF. Increased gene expression for VEGF and VEGF receptors KDR/Flk and flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest.* 1995;95:1798–807.
64. Tischer E MR, Hartman T. The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. . *Journal of Biological Chemistry* 1991;266:11947–54.
65. Lu Y GY, Shi Y, Yin J, Huang Z1. Two polymorphisms (rs699947, rs2010963) in the VEGFA gene and diabetic retinopathy: an updated meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 2013 13-56.
66. Petrovic D. The role of vascular endothelial growth factor gene as the genetic marker of atherothrombotic disorders and in the gene therapy of coronary artery disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2010;8:47-54.
67. Sun L YQ, Cao N, Guo W, Yao L, Feng JM, Ma JF, Wang LN. VEGF genetic polymorphisms may contribute to the risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *ScientificWorldJournal* 2014:2014:624573. .
68. Rutanen J LP. Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res.* 2003;59:971–9.
69. Boucher JM BV. Antiangiogenic VEGF-A in peripheral artery disease. *Nat Med.* 2014;12:1383-5.
70. Miller SA DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
71. Purcell S. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics.* 2007;81:559-75.
72. Posada D BT. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst Biol.* 2004;53:793-808.

73. Klerk M VP, Clarke R, Blom H, Kok F, Schouten E. MTHFR 677C→ T polymorphism and risk of coronary heart disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2002;288:2023-31.
74. Lewis S ES, Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C→ T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *Bmj*. 2005;331:1053.
75. Albert MA PG, Morris A, Rose L, Buring J, Ridker PM, Zee RY. Candidate genetic variants in the fibrinogen, methylenetetrahydrofolate reductase, and intercellular adhesion molecule-1 genes and plasma levels of fibrinogen, homocysteine, and intercellular adhesion molecule-1 among various race/ethnic groups. *Am Heart J*. 2009;157:777-83.
76. Wernimont SM CA, Stover PJ, Wells MT, Litonjua AA, Weiss ST, Gaziano JM, Vokonas PS, Tucker KL, Cassano PA. Folate network genetic variation predicts cardiovascular disease risk in non-Hispanic white males. *J Nutr*. 2012;142:1272-9.
77. Yang H MA, Zhou S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2012;11:1-9.
78. Rios DL DOL, Carvalho HG, Santos-Filho A, Galvão-Castro B. Sex-specific effect of the thermolabile C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene on angiographically assessed coronary artery disease in Brazilians. *Hum Biol*. 2007;79:453-61.
79. Sabino A FA, Lima LM. Polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) gene and homocysteine levels: a comparison in Brazilian patients with coronary arterial disease, ischemic stroke and peripheral arterial obstructive disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2009;27:82-7.
80. Todesco L AC, Litynski P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma homocysteine and age. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:1003-9.
81. Seelenfreund D LS, Quesada A, Saavedra JM, Wolff C, López-Stewart G, Araya AV, Durruty P. Association of the intronic polymorphism rs891512 (G24943A) of the endothelial nitric oxide synthase gene with hypertension in Chilean type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;96:e47-9.
82. Yang M FZ, Zhang Q, Xin Y, Chen Y, Tian Y. Association between the polymorphisms in intercellular adhesion molecule-1 and the risk of coronary atherosclerosis: a case-controlled study. *PLoS One*. 2014;9:e109658.
83. Bleda S DHJ, Varela C, Esparza L, De Maturana IL, Acin F. Impact of VEGF polymorphisms on the severity of peripheral artery disease in diabetic patients. *Growth Factors*. 2012;5:277-82.

84. Muniz JJ I-TT, Metzger IF, Sandrim VC, Tanus-Santos JE. Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms. *DNA Cell Biol.* 2009;11:567-72.
85. Renner W KH, Brodmann M. Factor II G20210A and factor V G1691A gene mutations and peripheral arterial occlusive disease. *Thromb Haemost.* 2000;83:20-2.
86. Ciftdoğan DY CS, Ulman C, Tikiz H. The factor V G1691A, factor V H1299R, prothrombin G20210A polymorphisms in children with family history of premature coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2009;7:435-9.
87. Shah P. Thrombogenic risk factors for atherothrombosis. *Rev Cardiovasc Med.* 2006;7:10-6.
88. Selvin E ET. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation.* 2004;110:738-43.
89. Theodoraki EV NT, Suhorutsenko J, Peppes V, Fili P, Kolovou G, Papamikos V, Richter D, Zakopoulos N, Krjutskov K, Metspalu A, Dedoussis GV. Fibrinogen beta variants confer protection against coronary artery disease in a Greek case-control study. *BMC Med Genet.* 2010;11:28.
90. Kotzé RC N-RC, De Lange Z, De Maat MP, Hoekstra T, Pieters M. Genetic polymorphisms influencing total and γ' fibrinogen levels and fibrin clot properties in Africans. *Br J Haematol.* 2015;168:102-12.
91. Yin YW LJ, Zhang M, Wang JZ, Li BH, Liu Y, Liao SQ, Zhang MJ, Gao CY, Zhang LL. Influence of interleukin-6 gene -174G>C polymorphism on development of atherosclerosis: a meta-analysis of 50 studies involving 33,514 subjects. *Gene.* 2013;529:94-113.
92. Binia A CA, Canizales-Quinteros S, Alonzo VA, Tejero ME, Silva-Zolezzi I. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism. *Genes Nutr.* 2014;9:421.
93. Juárez-Velázquez R CP, Canto-Cetina T, Rangel-Villalobos H, Rosas-Vargas H, Rodríguez M, Canizales-Quinteros S, Velázquez Wong AC,. Analysis of polymorphisms in genes (AGT, MTHFR, GPIIIa, and GSTP1) associated with hypertension, thrombophilia and oxidative stress in Mestizo and Amerindian populations of México. *Dis Markers.* 2010;28:323-31.
94. Luizon MR I-TT, Simoes AL, Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. *DNA Cell Biol.* 2009;28:329-34.

95. Guzmán N LG, Ávila A, Salazar LA. Three novel variants in the coagulation factor V gene associated with deep venous thrombosis in Chilean patients with Amerindian ethnic background. *Clin Chim Acta* 2015 24-8.
96. Rupert JL MM, Kidd KK, Tan C, Hochachka PW, Devine DV. Selective pressure has not acted against hypercoagulability alleles in high-altitude Amerindians. *Ann Hum Genet.* 2003;67:426-32.
97. Manichaikul A PW, Rodriguez CJ, Peralta CA, Divers J, Guo X, Chen WM, Wong Q, Williams K, Kerr KF, Taylor KD, Tsai MY, Goodarzi MO, Sale MM, Diez-Roux AV, Rich SS, Rotter JI, Mychaleckyj JC. Population structure of Hispanics in the United States: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *PLoS Genet.* 2012;4:8.
98. Guerzonil AR, Bisellil PM. Homocysteine and MTHFR and VEGF gene polymorphisms: impact on coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92:263-8.

Capítulo VI – Conclusiones

Conclusiones

1. La prevalencia de la EAP en la población de estudio fue del 4,4%, con una edad media general de (61 +/- 11,4 años). Siendo levemente mas alta en el género femenino (4,7%) respecto al género masculino (4,0%) y se incrementó en cada década de la vida siendo mayor a partir de los 70 años de edad (13,8%).
2. Esta investigación confirma la asociación de los factores de riesgo de ECV tradicionales como tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión, obesidad y dislipidemia en la población del Cauca, los cuales en general se incrementan con la edad y la raza auto-asignada Afro-descendiente
3. Este estudio epidemiológico es el más grande llevado a cabo hasta ahora en Latino América y el primer estudio poblacional de Cauca-Colombia, utilizando el ITB, para establecer la prevalencia de EAP en una población adulta, donde en los casos respecto al grupo control, la comorbilidad que atribuye más riesgo a EAP fue la diabetes (OR = 3.8), constituyéndose en la primera comorbilidad asociada a EAP para la región caucana, los anteriores resultados están en contra de lo esperado de la literatura mundial, que asocia al cigarrillo como el factor de riesgo más relevante y que mostró en nuestro estudio un (OR = 2.0) por debajo de la diabetes mellitus tipo 2.
4. En los casos de esta investigación se presenta la paradoja de la obesidad y se puede observar claramente que no existe asociación de la enfermedad con dicha condición, por otra parte el riesgo se incrementa mediante la interacción de cigarrillo*diabetes* hipertensión, mostrando un riesgo ajustado por edad y raza para EAP (OR = 6.4), constituyendo a esta interacción como la más fuertemente asociada en los pacientes con EAP respecto de los controles.
5. En Colombia se han realizado pocos estudios epidemiológicos para establecer factores de riesgo y la prevalencia de EAP; por lo tanto aún es necesario realizar este tipo estudios en los diferentes departamentos que conforman nuestra nación, para así conocer la etiología y distribución de la enfermedad, lo cual permitirá desarrollar a futuro programas de salud pública para la prevención de esta patología.
6. Todas las poblaciones presentaron contribuciones europeas y nativas americanas similares, que son ligeramente superior a la contribución africana, por lo tanto, se determinó que el Cauca es una población mixta. Este estudio es el primero que determina que la ancestría Africana se encuentra involucrada en el desarrollo de la enfermedad. En el departamento del Cauca existió una mayor proporción de casos Africanos (0,15) y Amerindios (0,40), respecto a los controles que tuvieron una mayor proporción de Europeos (0,49).

7. En este estudio se determinó la asociación de la enfermedad arterial periférica en individuos caucanos con polimorfismos implicados en la vía del estrés oxidativo *MTHFR* (rs 1801133), *NOS3* (rs891512), la respuesta inflamatoria *ICAM1* (rs5498) y la angiogénesis *VEGF* (rs699947 y rs2010963).
8. Este estudio sienta las bases para proponer la ruta molecular de la aterogenesis de la EAP en caucanos, donde *MTHFR* (rs 1801133) y *NOS3* (rs891512) contribuyeron en los pacientes a una disminución del NO por estrés oxidativo activando el endotelio y produciendo la expresión de moléculas de adhesión, posterior a esto, se dio la expresión de proteínas proinflamatorias de manera más prominente en pacientes con polimorfismos en *ICAM1* (rs 5498). Cabe anotar que la expresión de polimorfismos genéticos y su asociación con la ancestría, regulan el proceso patológico de la EAP y algunos pueden ser útiles como biomarcadores para identificación de poblaciones bajo riesgo.
9. Se observó que la ancestría amerindia se comporta como un factor protector mientras que la europea se encuentra asociada para el alelo de riesgo de los genes *MTHFR* (rs1801133), e *ICAM1* (rs 5498) y la africana se encuentra consistentemente asociada en esta investigación con *VEGF* (rs699947 y rs2010963), *NOS3* (rs891512) e *ICAM1* (rs 5498).

Capítulo VII – Recomendaciones

La AR es considerada una enfermedad multifactorial originada a partir de la interacción de mecanismos moleculares y la exposición a diferentes factores predisponentes al desarrollo de un proceso obstructivo. Factores de riesgo y alteraciones en mecanismos específicos asociados a la enfermedad, puede contribuir a la aparición temprana de la misma aumentando el riesgo de presentarse una ECV. Está claro que el entendimiento de las interacciones presentes en este tipo de enfermedades, abre nuevas puertas para la investigación en el campo clínico y científico con el fin de adquirir un mejor conocimiento acerca del inicio y progresión de la enfermedad, además de la adopción de estrategias terapéuticas para las personas enfermas y de detección temprana, para reducir los índices de mortalidad y morbilidad asociados a las ECV.

Un tema que ha cobrado una importancia relativamente reciente es el proceso de reparación del tejido endotelial. Se ha determinado que la falla en la reparación de la injuria endotelial desencadenada por la inflamación, promueve la aterogénesis. El factor de crecimiento endotelial vascular, ha sido asociado con la angiogénesis, promoviendo la mitosis y migración de las células endoteliales con el fin de reparar el sitio afectado. El estudio de este tipo de procesos permitirá un mejor entendimiento de la biología del tejido vascular y el conocimiento posibilitará la adopción de técnicas más moleculares que entrarían a “regenerar” zonas del endotelio vascular no sanas y retrasar o bloquear el inicio de la enfermedad aterosclerótica.

La investigación de moléculas de adhesión y los procesos de unión intercelular deberían ser abordados con más detalle para esclarecer aun más su relación con la enfermedad aterosclerótica; además, el estudio de alteraciones en la expresión de estas proteínas facilitaría el establecimiento de una asociación entre estas moléculas y la enfermedad y se identificarían la predisposición de la población a desarrollar la AR. Adicionalmente, la caracterización del proceso la respuesta inmune adaptativa en procesos inflamatorios como AR, pueden generar nuevas herramientas moleculares para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Con respecto a la formación de la placa de fibroateroma, hay poca información acerca del papel que cumplen sustancias liberadas por el tejido muscular vascular como colágeno y elastina. Aunque varios estudios han reportado el papel que cumplen estos compuestos, falta mucho por investigar acerca del tema, y las conclusiones generadas no son muy exactas. Además, conocer ampliamente todos los mecanismos subyacentes alrededor de estas moléculas y la formación de la parte fibrosa de la placa, brindará herramientas para facilitar la identificación de placas vulnerables y evitar complicaciones posteriores.

Los efectos adversos de fumar y las interacciones entre el tabaquismo y los factores de riesgo establecidos para EAP destacan la importancia de la intervención de poblaciones con riesgo en términos de una prevención de la enfermedad. En las poblaciones de alto riesgo.

Es importante cuantificar los niveles de homocisteína, en este estudio no se contó con financiación para esta prueba, pero cabe anotar que la hiperhomocisteinemia

se encuentra asociada con el estrechamiento o bloqueo arterial y por ende EAP, valores elevados de homocistena se podrían correlacionar con el polimorfismo 677 C>T, pues se ha demostrado asociación entre los portadores T/T del polimorfismo 677 de *MTHFR* y la hiperhomocisteinemia. Como existe la hipótesis de que la condición crónica de la enfermedad arterial engendra la inflamación y el daño endotelial en respuesta a las citocinas liberadas en el torrente sanguíneo de los pacientes con EAP circulante, es pertinente explorar los niveles circulantes de citosinas en el suero de los pacientes con EAP y su interacción con altos niveles de *VEGF* el cual ha sido asociado en el presente documento.

A futuro contando con presupuesto, se podría evaluar los factores epigenéticos relacionados con la enfermedad, como la modificación de histonas, la remodelación de la cromatina y la metilación del ADN. Estos procesos inducen modificaciones estructurales en la molécula de ADN, teniendo como consecuencia un gen susceptible a la transcripción que pueda alterar su expresión.

Perspectivas

La EAP es una enfermedad prevalente, que todavía tiene necesidades médicas no cubiertas, el enfoque de los factores de crecimiento angiogénicos y ensayos clínicos se introducen como una frontera de la angiogénesis terapéutica. En la EAP la terapia génica ha emergido para promover la angiogénesis en pacientes con isquemia crítica de las extremidades, los investigadores que trabajan en este campo se han centrado en los factores pro-angiogénicos, como el *VEGF* y el factor de crecimiento de fibroblastos FGB, en el proceso de reparación del tejido endotelial. Se ha postulado que se puede estimular la regeneración de la red de la vasculatura funcional localmente, re-perfundir el tejido isquémico, y así salvar la extremidad. Por otra parte también ha sido utilizada la terapia celular mediante células mononucleares de médula ósea, células madre mesenquimales, células mononucleares de sangre periférica movilizadas, y células progenitoras endoteliales. Por último, nano y micro injertos vasculares fibrosos pueden ser diseñados para imitar mejor la estructura y la composición de los vasos. En Colombia el estudio y aplicabilidad de la tecnología en mención, permitirá elucidar la biología de la vasculatura en pacientes con EAP con la finalidad promover la angiogénesis en zonas de isquemia crítica dando fin a la enfermedad.

Finalmente pienso que existe una gran responsabilidad para todos los que estudiamos y tratamos de elucidar los caminos que llevan a la enfermedad aterosclerótica a partir de tres fenotipos principales como la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica, pero es esta última enfermedad quizá la más olvidada en la consulta, por tanto se debe implementar una estrategia de salud pública en el departamento del Cauca teniendo en cuenta determinantes que influyen los diferentes grados de la enfermedad respecto a la salud, es fundamental el estudio de factores biológicos y epidemiológicos involucrados en la enfermedad, se deben contar de igual forma con estrategias de prevención en salud, son los entes de salud quienes deben

acompañar este proceso desde la prevención primaria haciendo uso del ITB en su consultorio para reducir la probabilidad de aparición, desde la prevención secundaria actuando en el periodo patogénico subclínico y desde la prevención terciaria actuando desde el periodo patogénico en adelante. La fase de promoción debe ser igualmente importante mediante procesos de capacitación a la población para que conozca la problemática de EAP y de esta forma cambie su estilo de vida en pro de una comunidad saludable que sea capaz de reducir las cifras ateroscleróticas.

Anexos

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA HUMANA APLICADA
ATEROSCLEROSIS: INTERACCIÓN ENTRE FACTORES DE RIESGO,
POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y ANCESTRÍA

Código _____

Entidad _____

Fecha: dd/mm/aaaa

[][][]

SECCIÓN A. VARIABLES
SOCIODEMOGRÁFICAS

A1. DOCUMENTO DE IDENTIDAD

A2. NOMBRES Y APELLIDOS

A3. TELÉFONOS

A4. DIRECCIÓN PERMANENTE

A5. FECHA DE NACIMIENTO:

dd/mm/aaaa [][][]

A6. EDAD: [][]

A7. SEXO:

1. MASCULINO ☐

2. FEMENINO ☐

A8. ETNIA:

1. BLANCA ☐

2. NEGRA ☐

3. MESTIZA ☐

A10. LUGAR DE NACIMIENTO:

DEPARTAMENTO

MUNICIPIO

1. URBANA (Acueducto,
Energía, Piso min cemento) ☐

2. RURAL CABECERA ☐

3. RURAL DISPERSO ☐

VDA/ _____

**A11. EN QUE LUGAR HA VIVIDO
POR MÁS AÑOS?**

DEPARTAMENTO

MUNICIPIO

1. URBANA (Acueducto,
Energía, Piso min cemento) ☐

2. RURAL CABECERA ☐
3. RURAL DISPERSO ☐
- VDA/_____

A12. CUANTOS AÑOS HA VIVIDO ALLÍ? [_____]

- A12. CUANTOS AÑOS HA VIVIDO ALLÍ? [_____]**

B1. CUAL ES SU NIVEL EDUCATIVO?

- ### B3. OCUPACIÓN EN LA QUE HA TRABAJADO POR MAS TIEMPO?

1. AGRICULTOR []
5. CONSTRUCTOR []
2. AMA DE CASA [] 6.
JUBILADO []
3. COMERCIANTE [] 7.
PROFESIONAL []
4. TRAB. PUBLICO [] 8.
OTROS []

**B4 . AFILIACIÓN AL SIST.
SEGURIDAD SOCIAL:**

1. VINCULADO ☐
2. SUBSIDIADO ☐
3. CONTRIBUTIVO ☐

C5. RESPECTO AL HABITO DE BEBER USTED ES?

C1. RESPECTO AL HÁBITO DE FUMAR USTED ES?

- 1. FUMADOR ☐
 - A. Fumador diario* ☐
 - B. Fumador ocasional** ☐
 - C. Ex-fumador*** ☐
- 2. NO FUMADOR ☐
- 3. FUMADOR PASIVO ☐

* FUMA AL MENOS 1 CIGARRILLO AL DÍA EN EL ÚLTIMO AÑO.

** FUMA AL MENOS 1 CIGARRILLO EN INTERVALOS MAYORES AL DIARIO.

*** FUMADOR DIARIO QUE HA DEJADO DE FUMAR EN EL ÚLTIMO AÑO.

C2. SI USTED ES FUMADOR DIARIO, CUANTOS

CIGARRILLOS POR DIA FUMA (FUMABA)?

[_____]

C3. SI USTED ES FUMADOR OCASIONAL, CUANTOS

CIGARRILLOS POR MES FUMA?

[_____]

C4. POR CUANTOS AÑOS HA FUMADO O FUMO?

[_____]

1. BEBEDOR ☐

- A. Bebedor habitual* ☐
- B. Bebedor ocasional** ☐
- C. Ex-bebedor*** ☐

2. NO BEBEDOR ☐

* BEBE AL MENOS 1 VEZ POR SEMANA EN EL ÚLTIMO AÑO.

** BEBE CON INTERVALOS MAYORES A LA SEMANA.

*** BEBIÓ AL MENOS 1 VEZ POR SEMANA Y LO DEJO EN EL ULTIMO AÑO.

C6. SI USTED ES BEBEDOR, CUANTO CONSUME DE ESTAS

BEBIDAS POR OCASIÓN?

1. AGUARDIENTE [c_____] 6. WHISKY [v_____] 8.

2. CERVEZA [b_____] 7. VODKA [v_____] 9.

3. RON [c_____] 8. TEQUILA [c_____] 9.

4. GUARAPO [v_____] 9.

5. VINO [cp_____] 9. BRANDY [c_____]

c:copa (25cc), b:botella (330cc), cp:copa vino (100cc), v:vaso (45cc).

Botella = 750cc; Media = 375cc.

C7. POR CUANTOS AÑOS HA CONSUMIDO? [_____]

SECCIÓN E. HÁBITOS ALIMENTICIOS Y CLASIFICACION NUTRICIONAL

E1. CUANTAS COMIDAS CONSUME USTED AL DIA? [_____]

E2. DONDE PREPARAN GENERALMENTE SUS COMIDAS?

- 1. CASA ☐ 2. REST. ☐ 3. CASA Y REST. ☐

E5. REUTILIZA EL ACEITE PARA FREIR SUS ALIMENTOS?

- 0. NUNCA ☐ 1. ALGUNAS VECES ☐ 2. SIEMPRE ☐

E6. CONSUME POSTRE AL FINAL DEL ALMUERZO Ó CENA?

- 0. NUNCA ☐ 1. ALGUNAS VECES ☐ 2. SIEMPRE ☐

E3. COCINA USTED CON SAL SUS ALIMENTOS?

0. NUNCA ☐ 1. ALGUNAS VECES ☐ 2. SIEMPRE ☐

E4. AÑADE MAS SAL A LOS ALIMENTOS?

0. NUNCA ☐ 1. ALGUNAS VECES ☐ 2. SIEMPRE ☐

E7. CONSUMO DE AGUA (NUMERO DE VASOS AL DIA) [_____]

ALIMENTO	NUNCA	DIARIO	1-2 VECES/SEM	1-2 VECES/MES	1-6 VECES/AÑO
PROTEÍNAS					
RES					
<i>a. Carne Magra</i>					
<i>b. Carne grasa (costilla)</i>					
<i>c. Carnes preservadas con sal</i>					
POLLO					
<i>a. Sin piel</i>					
<i>b. Con piel</i>					
CERDO					
<i>a. Carne magra (jamón)</i>					
<i>b. Carne grasa (chicharrón, costilla, tocino)</i>					
<i>c..Embutidos y Productos de Salsamentaria (Chorizo, Salchicha)</i>					
PESCADO					
<i>a. Peces de mar</i>					
<i>b. Peces de agua dulce (salmón, trucha)</i>					
<i>c. Mariscos (Camarones, langostinos)</i>					
<i>d. Enlatados (atún en aceite, sardinas)</i>					
<i>e. Enlatados (atún</i>					

en agua)					
ALIMENTO	NUNCA	DIARIO	1-2 VECES/SEM	1-2 VECES/MES	1-6 VECES/AÑO
OTRAS FUENTES DE PROTEINA					
a. Huevos					
b. Leche de soya					
LACTEOS					
a. Leche entera					
b. Leche semidescremada					
c. Leche descremada					
d. Leche deslactosada					
e. Derivados Lácteos Enteros (Queso, Yogur, kumis, Avena)					
CEREALES					
a. Entero o integral (arroz integral, pasta integral, avena entera)					
b. Refinado (arroz blanco, pasta, avena en hojuelas,).					
VEGETALES					
a. Verduras crudas (tipo ensalada)					
b. Verduras cocidas					
c. Tubérculos (papa, yuca, uyuco, arracacha)					
d. Plátanos (plátano, maduro, banano, guineo)					
LEGUMINOSAS (Frijol, lenteja, arveja, garbanzo, blanquillo)					

ADEREZOS Y SALSAS (Mayonesa, salsa de tomate, vinagreta)					
FRUTAS					
Frutas cítricas (naranja, mandarina, limón)					
Frutas no cítricas (guayaba, manzana, pera, papaya)					
Frutas con alto contenido en agua (sandía, melón, piña)					
Frutos rojos y del bosque (mora, fresa, uva, frambuesa, lulo)					
Frutas pasionarias (maracuyá, curuba, granadilla)					
Frutas oleaginosas (maní, nueces, almendras, macadamias)					
GRASAS					
a. manteca animal (carne, pollo)					
b. manteca vegetal					
c. margarina (vegetal)					
d. mantequilla (animal)					
ACEITE					
a. Aceites puros (aceite de girasol, oliva ó canola)					
b. Aceite de varios componentes (Oleocali, Olesoya, Aceite de Palma)					

ENDULZANTES						
a. Endulzantes calóricos (azúcar, miel, panela, fructuosa)						
b. Endulzantes no calóricos (splenda, sucralosa, stevia)						
DULCES Y POSTRES (chocolate, mermelada, repostería, confitería, manjar blanco)						
BEBIDAS						
a. Bebidas azucaradas (café, chocolate, agua de panela, refrescos gaseosos, jugos procesados, aromáticas)						
b. Bebidas no azucaradas (café, chocolate, agua de panela, refrescos gaseosos, jugos procesados, aromáticas)						
c. Agua mineral						

SECCIÓN F. MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

E8. MEDIDA DEL INDICE DE MASA CORPORAL (PESO/TALLA²). PESO
[] TALLA []

E9. MEDIDA PORCENTAJE GRASA CORPORAL []

E10. MEDIDA DE CIRCUNFERENCIA DE LA CINTURA []

SECCIÓN G. ANTECEDENTES FAMILIARES Y CLINICOS PERSONALES

G1. ES MENOPAUSICA?

0. NO ☐ 1. SI ☐ 2. No aplica ☐

G2. FECHA DE LA ULTIMA MENSTRUACION: dd/mm/aaaa

I II II I

G3. CONSUME HORMONAS PARA EL CONTROL DE LA MENOPAUSIA?

0. NO ☐ 1. SI ☐ 2. No aplica ☐ Desde hace cuanto?

[]

G4. CONSUME ANTICONCEPTIVOS?

0. NO ☐ 1. SI ☐ 2. No aplica ☐ Desde hace cuanto?

[]

G5. HISTORIA CLINICA PERSONAL Y FAMILIAR

ENFERMEDAD	MAM A	PAP A	HERMANO S	ABUELOS PATERNO S	ABUELOS MATERNO S
ATEROSCLERORIS					
INFARTO AGUDO MIOCARDIO (ataque al corazón)					
ISQUEMIA CEREBRAL (derrame cerebral)					
DISLIPIDEMIA					
DIABETES					
HTA					
OBESIDAD					
ENFERMEDAD HEPATICA					
ENFERMEDAD RENAL					

G6. HISTORIA CLINICA PERSONAL Y CONSUMO DE MEDICAMENTOS

SU MÉDICO LE HA DICHO QUE USTED ES ?	S I	N O	NO SA BE	HAC E CUA NTO
1.HIPERTENSO				

p. sistólica: _____ mmHg p. diastólica: _____ mmHg				
Antihipertensivos				
a. captopril				
b. metropolol				
c. propanolol				
d. losartan				
e. enalapril				
f. alodipino				
g. _____ otros: _____ _____				
Diureticos				
a. lasix (hidroclorotiazida)				
b. furosemida				
b. _____ otros: _____ _____				
2. DIABETICO				
Que tipo: _____ _____				
Hipoglucemiantes				
a. glitazonas				
b. metformina				
c. _____ otros: _____ _____				
3. DISLIPIDÉMICO				
Hipolipemiantes				
a. estatinas (Lovastatina, Atrovastatina, Simvastatina)				
	S I	N O	NO SA BE	HAC E CUA NTO

b. gemfibrosilo				
c. otros: _____				
4. INFARTO AGUDO MIOCARDIO				
5. ISQUEMIA CEREBRAL				
Antiagregantes plaquetarios				
a. aspirina (aspirineta, cardioaspirina)				
b. clopidogrel				
c. cilostazol				
d. otros: _____				
Anticoagulantes				
a. warfarina				
b. heparina				
c. otros: _____				
ENFERMEDAD HEPATICA				
Medicamentos: _____				
ENFERMEDAD RENAL				
Medicamentos: _____				

G7. LE HAN DIAGNOSTICADO INFECCION POR

	SI	NO	HACE CUANTO?
<i>Helicobacter pylori</i>			
<i>Chlamidia Pneumoniae</i>			
<i>Citomegalovirus</i>			

G8. INDICE TOBILLO BRAZO

Arteria Pedial Derecha []
Arteria Tibial Derecha []
Arteria Pedial Izquierda []
Arteria Tibial Izquierda []
Arteria Braquial Derecha []
Arteria Braquial Izquierda []
Valor ITBD []
Valor ITBI []

G9. PULSOS ARTERIALES

ARTERIAS	0. No se palpan	1. Se palpan disminuidos	2. Se palpan normales
Pedial derecha			
Tibial derecha			
Pedial izquierda			
Tibial izquierda			

G10. SINTOMATOLOGÍA

a. Claudicación intermitente: 0. No ☐ 1. Si ☐ hace cuanto? _____

G11. CLASIFICACION FONTAINE

ESTADO	CLINICO	
I	Asintomático	
Ila	Claudicación intermitente no limitante para el modo de vida del paciente	
Iib	Claudicación intermitente limitante para el paciente	

III	Dolor Isquémico ó parestesias en reposo	
IV	Ulceración o Gangrena	

G12. DIGNÓSTICO ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA (EAP)

Diagnosticado: 1. Previamente ☐
2. Por primera vez ☐

G12. EXAMENES DE LABORATORIO CLINICO

Glicemia [] mg/dl
 Colesterol Total [] mg/dl
 Trigliceridos [] mg/dl
 HDL [] mg/dl
 LDL [] mg/dl
 VLDL [] mg/dl

SECCION H. MEDICION DE LA ACTIVIDAD FISICA PERSONAL

1. Su principal ocupación es*..... 1 (Baja actividad) ☐ 3 (actividad moderada) ☐ 5 (alta actividad) ☐
2. En el trabajo estoy sentado
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Siempre.....
1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
3. En el trabajo estoy de pie
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Siempre.....
1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
4. En el trabajo camino
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Siempre.....
1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
5. En el trabajo levanto cargas pesadas
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Muy frecuentemente..... 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
6. Luego del trabajo me siento cansado
Muy frecuentemente / Frecuentemente / Algunas veces / Rara vez / Nunca..... 5 ☐ 4 ☐ 3 ☐ 2 ☐ 1 ☐
7. En el trabajo sudo

- Muy frecuentemente / Frecuentemente / Algunas veces / Rara vez /
Nunca..... 5 ☐ 4 ☐ 3 ☐ 2 ☐ 1 ☐
8. En comparación con otras personas de mi misma edad, pienso que mi trabajo es físicamente
Mucho más pesado / Mas pesado / Igual de pesado / Mas ligero / Mucho más ligero..... 5 ☐ 4 ☐ 3 ☐ 2 ☐ 1 ☐
9. Practica algún deporte**
Si ☐ / No ☐
Si responde afirmativo:
- Cual deporte practica más frecuentemente.....
Intensidad 0,76 ☐ 1,26 ☐ 1,76 ☐
 - Cuantas horas a la semana... <1 / 1-2 / 2-3 / 3-4/ >4.....
Tiempo 0,5 ☐ 1,5 ☐ 2,5 ☐ 3,5 ☐ 4,5 ☐
 - Cuántos meses al año... <1 / 1-3 / 4-6 / 7-9 / >9.....
Proporción 0,04 ☐ 0,17 ☐ 0,42 ☐ 0,67 ☐ 0,92 ☐
- Si practica un segundo deporte:
- Cuál es el deporte.....
Intensidad 0,76 ☐ 1,26 ☐ 1,76 ☐
 - Cuantas horas a la semana... <1 / 1-2 / 2-3 / 3-4/ >4.....
Tiempo 0,5 ☐ 1,5 ☐ 2,5 ☐ 3,5 ☐ 4,5 ☐
 - Cuántos meses al año... <1 / 1-3 / 4-6 / 7-9 / >9.....
Proporción 0,04 ☐ 0,17 ☐ 0,42 ☐ 0,67 ☐ 0,92 ☐
10. En comparación con otros de mi misma edad, pienso que la actividad física durante mi tiempo de ocio es
Mucha más / Mas / Igual / Menos / Mucho menos..... 5 ☐
4 ☐ 3 ☐ 2 ☐ 1 ☐
11. Durante mi tiempo de ocio yo sudo
Muy frecuentemente / Frecuentemente / Algunas veces / Rara vez /
Nunca..... 5 ☐ 4 ☐ 3 ☐ 2 ☐ 1 ☐
12. Durante mi tiempo de ocio practico deporte
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Muy
frecuentemente..... 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
13. Durante mi tiempo de ocio miro televisión
Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Muy
frecuentemente..... 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐
14. Durante mi tiempo de ocio camino

Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Muy
frecuentemente..... 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐

15. Durante mi tiempo de ocio monto bicicleta

Nunca / Rara vez / Algunas veces / Frecuentemente / Muy
frecuentemente..... 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5 ☐

16. Cuantos minutos camina y/o monta bicicleta por día desde o hacia el trabajo, la escuela o de compras

<5 / 5-15 / 15-30 / 30-45 /

>45..... 1 ☐ 2 ☐
3 ☐ 4 ☐ 5 ☐

*** Tipos de Ocupación**

Baja actividad: Administrativo, conductor, vendedor/comerciante, profesor, estudiante, ama de casa, personal salud, profesional universitario, jubilado

Mediana actividad: Trabajadores de fábrica, plomero, carpintero, agricultor

Alta actividad: Construcción, deportista

**** Deportes**

Baja intensidad: Billar, golf

Mediana intensidad: Ciclismo, nadar, bailar, tenis, squash, atletismo, artes marciales

Alta intensidad: Boxeo, básquetbol, futbol, voleibol,

Tomado de:

Baecke JA, et al. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. Am J Clin Nutr 1982;36(5):936-42.

SECCION I. DETERMINACION DEL NIVEL DE ESTRÉS

ÍTE MS PSS	ÍTE MS PSS 10	PREGUNTA (En el último mes)	NU NC A	CA SI NU NC A	DE VEZ EN CUAN DO	FREC UENT EME NTE	MUY FREC UEN
1.P SS	PS S10	¿Ha estado afectado por algo que le ha ocurrido inesperadamente?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐

2.P SS	PS S10	¿Se ha sentido incapaz de controlar las cosas importantes de su vida?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
3.P SS	PS S10	¿Se ha sentido nervioso o estresado?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
4.P SS		¿Maneja con éxito los pequeños problemas irritantes de la vida?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
5.P SS		¿Afronta efectivamente los cambios importantes que ocurren en su vida?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
6.P SS	PS S10	¿Está seguro sobre su capacidad de manejar sus problemas personales?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
7.P SS	PS S10	¿Ha sentido que las cosas marchan bien?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
8.P SS	PS S10	¿Ha sentido que no puede afrontar todas las cosas que tiene que hacer?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
9.P SS	PS S10	¿Ha podido controlar las dificultades de su vida?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
10. PSS	PS S10	¿Ha sentido que tiene el control de todo?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
11. PSS	PS S10	¿Se ha sentido molesto porque las cosas que le han ocurrido estaban fuera de control?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
12. PSS		¿Ha pensado sobre las cosas que le quedan por lograr?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
13. PSS		¿Usted puede controlar la forma de pasar el tiempo?	4 ☐	3 ☐	2 ☐	1 ☐	0 ☐
14. PSS	PS S10	¿Ha sentido que las dificultades se acumulan tanto que no puede superarlas?	0 ☐	1 ☐	2 ☐	3 ☐	4 ☐
SUBTOTAL							

PUNTAJE TOTAL	
---------------	--

Tomado de:

Remor E. Psychometric Properties of European Spanish Versión of the Scale (PSS). The Spanish Journal of Psychology 2006;9(1):86-93.

Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. J Health Soc Behav 1983;24(4):385-96.

mmmmmm



Ancestral genetic composition in a population of South Western Colombian using autosomal AIM-INDELs



L. Urbano^{a,b}, E.C. Portilla^{a,b}, W. Muñoz^c, C.H. Sierra-Torres^{a,b}, H. Bolaños^{b,d},
Y. Arboleda^{a,b}, D.P. Aguirre^e, L. Mendoza^{e,f}, V. Carmona^{e,g}, C.H. Afanador^{e,h}, M. Salgar^{e,g},
L. Gusmão^{i,j}, J.J. Builes^{e,g,*}

^a Human Genetic Laboratory, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

^b InnovaGen Foundation, Popayán, Colombia

^c Department of Surgical Sciences, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

^d Department of Pathology, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia

^e GENES SAS Laboratory, Medellín, Colombia

^f School of Health Sciences, Pontificia Bolivariana University, Medellín, Colombia

^g Institute of Biology, University of Antioquia, Medellín, Colombia

^h School of Medicine, University of Antioquia, Medellín, Colombia

ⁱ IPATMUP, Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Portugal

^j DNA Diagnostic Laboratory (LDO), State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 August 2015/Accepted 16 September 2015

Available online 21 September 2015

Keywords:

Indels

AIMs

Latin-Americans

Human populations

Department of Cauca

Colombia

ABSTRACT

The Colombian population, for his history contains an ancestral mix of Europeans, Native Americans and Africans, these mixing ratios can be determined by Ancestry-Informative Markers (AIMs), this markers allow us to observe stratification in genetic association studies. The aim of this study was to determine the mixing ratios in a population sample of 500 individuals the Department of Cauca, Colombia with three different origins (European, Native American and African) using a set of 46 AIMs insertion-deletion (AIM-INDELs). The software STRUCTURE v 2.3.4 was used to determine the ancestral mixture. The average composition of the population of the Department of Cauca was 48% for Native American, 39% for European and 14% for African. It showed that the ancestral composition of the Department of Cauca has a greater contribution of Native Americans and Europeans compared to Africans which could be explained by the European migrations during the conquest of America.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genetic composition of the Colombian population, is the result of complex admixture processes between European, Native American and African ancestors produced during the Spanish conquest of America [1,2]. According to data from the National Administrative Department of Statistics (DANE 2005), the Department of Cauca has 1,182,022 inhabitants. The population from the Department of Cauca is well known for its highly multiethnic background because of the admixture of parental populations and it is characterized for harboring the highest percentage of Native American population in Colombia. About 20% of the Cauca population belongs to eight Native American groups officially recognized [3].

The implementation and use of polymorphic markers such as Ancestry Informative Markers (AIMs)—INDELs, allows to identify the allele frequency differences between populations and to infer their ancestral origin [4–6]. The aim of this study was to determine the admixture proportions of a population sample from the Department of Cauca based on the evaluation of ancestral contributions of three different continental populations: Native Americans, Europeans and Africans using autosomal AIMs-INDELs. This analysis will be useful to correct for population stratification effects in future case-control genetic association studies performed in this region of Colombia.

2. Materials and methods

In this study we used DNA of 500 individuals from the Department of Cauca who had previously provided informed consent according to the Ethics Committee of the University of Cauca. All samples were genotyped for the 46 AIM-InDel

* Corresponding author.

E-mail address: jbuiles@une.net.co (J.J. Builes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.076>

1875-1768/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

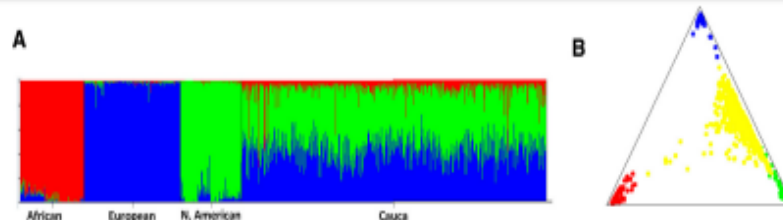


Fig. 1. Schematic representation of the individual admixture estimates (IAEs) in the Department of Cauca—Colombia mixed population, using STRUCTURE v. 2.3.4. software for $K=3$. In the bar plot (A) each vertical line represents one individual and the correspondent African (red), European (green), and Amerindian (blue) admixture proportions. In the triangle plots (B): each individual is represented by a colored point, and the correspondent admixture proportions are indicated by the distance to the edges of the triangle, green, red, and blue colors correspond to individuals from the parental populations (labelled as above), and individuals from admixed populations are plotted in yellow.

polymorphisms described in Pereira et al. [6], by two sets of multiplex PCR using the platform FMBIO IIe (Hitachi Co). These markers were selected to efficiently measure admixture proportions of African, European and Native American origins. The genetic ancestral contributions were estimated using the software STRUCTURE v2.3.4 [7,8]. To estimate the ancestral proportions, an analysis based on the geographical origin of the reference samples from Africa, Europe and Native America was performed. The STRUCTURE runs with 100,000 burning steps followed by 100,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) iterations. A tri-hybrid contribution from Native Americans, Europeans and Africans was assumed (i.e., $K=3$). The Admixture model was used and allele frequencies were correlated and updated using only individuals with POPFLAG = 1, the HGDP-CEPH and Native American samples were used as reference [6,9].

3. Results and discussion

Admixture proportions obtained for AIM-InDels are shown in Fig. 1, this results show that the average ancestry of our study population is 48% Native American, 14% African and 39% European.

The observed differences in ancestry proportions are the result of the admixture by both, European and African population with the existent Native American population of Cauca. Our findings are consistent with previous genetic composition studies in individuals from several municipalities of Cauca using different AIMS. The study by Acosta et al. showed a high percentage of European contribution in the Caucasian-Mestizo population and a high influence of African ancestry in Afro-Colombian individuals [10]. Furthermore, Córdoba et al. and Rojas et al. indicated that the Native American and European populations have contributed to a greater proportion to the current gene pool of Cauca population [2,3]. With this study we have excellent tools to correct population stratification effects in future case-control of genetic association studies performed in the Department of Cauca, Colombia.

Conflict of interest

None.

References

- [1] J.C. Chacón-Duque, K. Adhikari, E. Avendaño, et al., African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in Colombian populations, *Infect. Genet. Evol.* 27 (2014) 89–95, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.003.
- [2] W. Rojas, M.V. Parra, O. Campo, et al., Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers, *Am. J. Phys. Anthropol.* 143 (2010) 13–20, doi:http://dx.doi.org/10.1002/ajpa.21270.
- [3] L. Córdoba, J. García, L.S. Hoyos, et al., Genetic structure of a SouthWestern Colombian population, *Rev. Colomb. Antropol.* 48 (2012) 21–48.
- [4] F. Saloum, R. Pereira, R. Vianna, et al., Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-InDels, *PLoS One* 8 (2013) e75145, doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075145.
- [5] R. Kosoy, R. Nassir, C. Tian, et al., Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America, *Hum. Mutat.* 30 (2009) 69–78, doi:http://dx.doi.org/10.1002/humu.20822.
- [6] R. Pereira, C. Phillips, N. Pinto, et al., Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing, *PLoS One* 7 (2012) e29684, doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029684.
- [7] J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly, Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155 (2000) 945–959.
- [8] D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard, Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics* 164 (2003) 1567–1587 PMID: 12930761.
- [9] C. Xavier, J.J. Builes, V. Gomes, et al., Admixture and genetic diversity distribution patterns of non-recombining lineages of native american ancestry in Colombian populations, *PLoS One* 10 (3) (2015) e0120155, doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0120155.
- [10] M.A. Acosta, A. Blanco-Verea, M.V. Lareu, et al., The genetic male component of two South-Western Colombian populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) e59–e61.



Journal of Basic & Applied Genetics

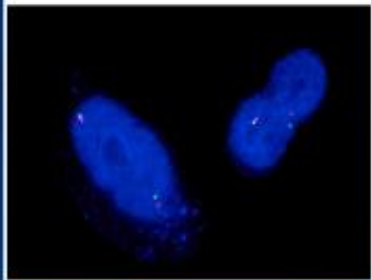
(Formerly MENDELIANA)

JOURNAL OF THE ARGENTINE SOCIETY OF GENETICS
REVISTA DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE GENÉTICA



Cited by
BIOLOGICAL ABSTRACTS
GENETICS ABSTRACTS
SISTEMA LATINDEX
THOMSON REUTERS
SCOPUS

Included in **SciELO**



BUENOS AIRES - ARGENTINA

GEN
B
A

ÍNDICE

7 - 15

Article 1 - research

MECHANISMS FOR THE EPIGENETIC REGULATION OF MITOCHONDRIAL DNA
MECANISMOS DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL ADN MITOCONDRIAL

Sierra-Delgado J.A., Contreras-García G.A.

17 - 24

Article 2 - research

PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS (PGDs) IN CARRIERS OF BALANCED STRUCTURAL REARRANGEMENTS BY ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (aCGH)
DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTATORIO (DGP) EN PORTADORES DE REARREGLOS ESTRUCTURALES BALANCEADOS POR aCGH (ARRAY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)

Ducatelli M.E., A. Grazziotin Mondadori, F. Coco, N. Neuspiller, F.L. Gismondi, R. Coco.

25 - 35

Article 3 - research

PERSISTENT GENETIC DAMAGE INDUCED BY TOPOISOMERASE II POISONS IN NORMAL HUMAN FIBROBLASTS: GENERATION OF CHROMOSOME INSTABILITY
DAÑO GENÉTICO PERSISTENTE INDUCIDO POR VENENOS DE TOPOISOMERASA II EN FIBROBLASTOS HUMANOS NORMALES: GENERACIÓN DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA

de Campos-Nebel M., Palmitelli M., Acevedo S., González-Cid M.

37 - 48

Article 4 - research

ANCESTRAL GENETIC COMPOSITION OF A HUMAN POPULATION FROM THE COLOMBIAN SOUTHWEST USING AUTOSOMAL AIM-INDELS
COMPOSICIÓN GENÉTICA ANCESTRAL DE UNA POBLACIÓN HUMANA DEL SUDOESTE DE COLOMBIA USANDO AIM-INDELS AUTOSÓMICOS

Urbano L., Portilla E.C., Builes J.J., Gusmão L., Sierra-Torres C.H.

49 - 58

Article 5 - research

STATISTICAL MODELS FOR PHENOTYPE-GENOTYPE ASSOCIATION STUDIES IN GENETICALLY STRUCTURED POPULATIONS
MODELOS ESTADÍSTICOS PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN POBLACIONES GENÉTICAMENTE ESTRUCTURADAS

Peña Malavera A., Gutierrez L., Balzarini M.

59 - 60

Obituary

TIRANTI, IVÁN NICOLÁS



ANCESTRAL GENETIC COMPOSITION OF A HUMAN POPULATION FROM THE COLOMBIAN SOUTHWEST USING AUTOSOMAL AIM-InDels

COMPOSICIÓN GENÉTICA ANCESTRAL DE UNA POBLACIÓN HUMANA DEL SUDOESTE DE COLOMBIA USANDO AIM-InDels AUTOSÓMICOS

Urbano L.^{1,2}, Portilla E.C.^{1,2}, Builes J.J.³, Gusmão L.^{4,5}, Sierra-Torres C.H.^{1,2,*}

¹ Human Genetics Laboratory, Department of Physiological Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Cauca, Popayán, Colombia.

² Molecular Diagnostics Unit, Innovagen Foundation, Popayán, Colombia.

³ Genes Ltda., Medellín Colombia.

⁴ IPATIMUP-Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Porto, Portugal.

⁵ DNA Diagnostic Laboratory (LDD), State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author: hsierra@unicauca.edu.co

ABSTRACT

Genetic markers with allele distribution differences in human populations provide human ancestry information that can be used to evaluate admixture proportions in different ethnic groups, including stratification in genetic association studies. The aim of this study was to determine the African, European and Native American admixture proportion by making use of 46 insertion-deletion informative ancestry record markers set in 500 Latin American people in the Department of Cauca, Colombia. Allelic frequencies were established, Hardy Weinberg test was performed, comparisons in genetic distances among population groups were estimated using Arlequin v 3.5, and STRUCTURE v 2.3.4 software was used to determine the population's ancestry admixture. The results revealed a diverse genetic base, resulting from the three continental populations tested. The average ancestry observed in the Cauca population was: 48 % Native American, 39 % European, and 14 % African. This study reveals the complex population stratification of the Department of Cauca, which is the result of the genetic admixture of three continental populations.

Key words: genetic ancestry, InDels, AIMS, Latin America, human populations.

RESUMEN

Los marcadores genéticos con diferencias en la distribución de alelos en las poblaciones humanas proporcionan información de ancestría que se puede utilizar para evaluar las proporciones de mezcla de diferentes grupos étnicos, incluyendo la estratificación en los estudios de asociación genética. El objetivo de este estudio fue determinar las proporciones de mezcla Africana, Europea y Nativo Americana utilizando un conjunto de 46 marcadores informativos de ancestría de inserción-delección en una población de 500 sujetos Latino-Americanos del Departamento del Cauca, Colombia. Se estimaron las frecuencias alélicas, la prueba de Hardy Weinberg, se realizaron comparaciones de distancias genéticas entre poblaciones utilizando Arlequin v 3.5. Se utilizó El programa STRUCTURE v 2.3.4 para determinar la mezcla ancestral de la población. Los resultados mostraron una base genética muy diversa producto de las tres poblaciones continentales evaluadas. La ancestría promedio observada en la población del Cauca fue del 48 % de Nativos Americanos, el 39 % Europeos y el 14 % de Africanos. Este estudio revela la compleja estratificación poblacional del Departamento del Cauca, la cual es el resultado de la mezcla genética de tres poblaciones continentales.

Palabras clave: ancestría genética, InDels, AIMS, América Latina, poblaciones humanas.

Fecha de recepción: 26/04/2015

Fecha de aceptación de versión final: 11/09/2016

INTRODUCTION

The genetic composition of the Colombian population, like most Latin American populations, is the result of complex admixture processes among European, Native American and African ancestors that took place during the Spanish conquest of America (Chacón-Duque *et al.*, 2014). In addition to the Spaniards, an important number of Afro-descendants were brought to the continent as slaves. Throughout the last 500 years of history, the Colombian population has undergone genetic mixture and, as a consequence, the Colombian Native American population has been notably reduced (Acosta *et al.*, 2009). The population with mixed ancestry is mainly concentrated in the urban areas of the country, particularly in the Colombian Andes; the Afro-Colombian population lives mainly in the Caribbean and Pacific coasts and the islands, whereas the Native American populations are located predominantly in the East and in rural areas of the Southwest and North of the country (Rojas *et al.*, 2010). The population from the Department of Cauca is well known for its highly multiethnic background as a result of the admixture of parental populations (Córdoba *et al.*, 2012). According to data from the National Administrative Department of Statistics, Cauca has 1,182,022 inhabitants, of whom 56.25 % are white and "Mestizo" and are located mainly in the central area of the Department; 21.55 % are Native Americans located in the East; and 22.2 % are Afro-descendants who reside in the Pacific Coast (DANE, 2005). Genetic ancestry studies of human populations from highly admixed regions such as the Department of Cauca is currently considered a powerful tool to determine their admixture patterns (Neves Manta *et al.*, 2013). The implementation and use of polymorphic markers such as Ancestry Informative Markers (AIMs)-InDels, which present high intercontinental allelic differentiation across populations, allows the identification of allele frequency differences among populations and to infer their ancestral origin (Bastos-Rodriguez *et al.*, 2006; *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2009; Tishkoff *et al.*, 2009; Pena *et al.*, 2011; Manta *et al.*, 2013; Neves Manta *et al.*, 2013; Pepinski *et al.*, 2013; Zaumsegel *et al.*, 2013; LaRue *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015).

The aim of this study was to determine the admixture proportions of a population sample from the Department of Cauca based on the evaluation of ancestral contributions of three different continental populations, Native Americans, Europeans and Africans, using autosomal AIMs-InDels.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The questionnaires, procedures, and protocols used were reviewed and approved by the Ethics Committee for Scientific Research at the University of Cauca; following guidelines and bioethical principles established in the Helsinki declaration of the 206 World Medical Association and the parameters outlined in Resolution 8430 of 1993 by the Colombian Ministry of Health.

Sample collection and DNA extraction

During this study, a total of 500 samples were collected from unrelated individuals from 23 municipalities of the Department of Cauca, Colombia, as follows: 67.2 % were collected in the central region and 1.2 %, 26.6 % and 5.0 % were collected from the north, south and east regions, respectively. According to 2005 census by the National Administrative Department of Statistics, the Department of Cauca had a 68.3 % of inhabitants in the central zone, 3.5 % in the north zone, 23 % in the south zone, and 5.2 % in the east zone. Therefore, the population sample included in this study represents the general population (DANE, 2005). The genetic markers information was obtained from Marshfield Diallelic Insertion/Deletion Polymorphisms database website (Weber *et al.*, 2002) and GENES Ltda. Blood samples were collected in tubes containing EDTA and coded with internal control codes to protect the identity of each participant. Then, DNA was extracted using the standard salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988). A DNA concentration of 30 ng/ μ L, measured with a NanoDrop 2000c Spectrophotometer, was used for the analysis (Desjardins *et al.*, 2010).

Genotyping

We used a set of 46 autosomal AIMs-InDels (Table 1), previously reported and validated for human population groups of Africans, Europeans and Native Americans (Shriver *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2009). Amplification and genotyping of the 46 AIM-InDels was performed using the QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen) combined with a mixture of 0.1 μ M of all primers and 5 ng of genomic DNA to complete a 6 μ L of final reaction solution. The amplified products were separated by electrophoresis in 5 % polyacrylamide gels and visualized with a FMBIO IIc Genetic Analyzer (HITACHI GENETIC Systems, Alameda, CA, USA).

Polymerase Chain Reaction

PCR reaction admixture calculus were done multiplying a sample volume (μL) by the total number of individuals; following, the 46 InDels panel markers were prepared according to the Genes laboratory protocol; the final volume per sample was 6 μL . For each assembly, a negative control under the same condition was considered (Tables 2 and 3).

Statistical analysis

Estimation of allele frequencies, Hardy Weinberg Equilibrium testing and population comparisons by pairwise genetic distances (F_{ST}) were carried out using Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) (Schneider *et al.*, 2009). For an easier visualization of the observed genetic distances, a multidimensional scaling (MSD) plot of the pairwise F_{ST} was performed using STATISTICA v7.0.

The software STRUCTURE v 2.3.4 was used to determine the ancestral admixture of the population under study and to infer the population structure (Pritchard *et al.*, 2000). The evaluation of the ancestral proportions was performed by using published information on the geographic origin of the reference samples. PDGH-CEPH were used as reference samples (Pereira *et al.*, 2012), and a tri-hybrid contribution from Native Americans, Europeans and Africans ($K=3$) to the current genetic makeup of Cauca population was assumed. Furthermore, 100,000 burning steps followed by 100,000 Markov Chain Monte Carlo iterations, using both "Admixture Model" and only the reference individual with POPFLAG=1, were considered in the STRUCTURE analysis (Pritchard *et al.*, 2000). The option "Use population Information to test for migrants" was used in the Admixture Model.

Table 1. InDels allele frequency, in HGDP-CEPH diversity panel population samples from Africa (AFR), Europe (EUR) and Native America (NAM).

Indel	Rs Number	Chromosome	Frequency of allele 1			Frequency of allele 2		
			AFR	EUR	NAM	AFR	EUR	NAM
MID-1470	rs2307666	11	0.162	0.563	0.031	0.838	0.437	0.969
MID-777	rs1610863	16	0.390	0.288	0.844	0.610	0.712	0.156
MID-196	rs16635	6	0.538	0.472	0.063	0.462	0.528	0.938
MID-881	rs1610965	5	0.324	0.880	0.992	0.676	0.120	0.008
MID-3122	rs35451359	18	0.552	0.991	1.000	0.448	0.009	0.000
MID-548	rs140837	6	0.338	0.196	0.172	0.662	0.804	0.828
MID-659	rs1160893	2	0.276	0.104	0.258	0.724	0.896	0.742
MID-2011	rs2308203	2	0.162	0.791	0.906	0.838	0.209	0.094
MID-2929	rs33974167	8	0.790	0.655	0.977	0.210	0.345	0.023
MID-593	rs1160852	6	0.695	0.006	0.008	0.305	0.994	0.992
MID-798	rs1610884	5	0.295	0.642	0.117	0.705	0.358	0.883
MID-1193	rs2067280	5	0.178	0.098	0.141	0.822	0.902	0.859
MID-1871	rs2308067	7	0.081	0.326	0.289	0.919	0.674	0.711
MID-17	rs4183	3	0.795	0.338	0.898	0.205	0.662	0.102
MID-2538	rs3054057	15	0.000	0.494	0.063	1.000	0.506	0.938
MID-1644	rs2307840	1	0.229	0.953	0.195	0.771	0.047	0.805

Indel	Rs Number	Chromosome	Frequency of allele 1			Frequency of allele 2		
			AFR	EUR	NAM	AFR	EUR	NAM
MID-3854	rs60612424	6	0.748	0.013	0.008	0.252	0.987	0.992
MID-2275	rs3033053	14	0.486	0.095	0.523	0.514	0.905	0.477
MID-94	rs16384	22	0.071	0.155	0.648	0.929	0.845	0.352
MID-3072	rs34611875	18	0.100	0.940	0.977	0.900	0.060	0.023
MID-772	rs1610859	5	0.943	0.968	0.781	0.057	0.032	0.219
MID-2313	rs3045215	1	0.110	0.247	0.730	0.890	0.753	0.270
MID-397	rs25621	6	0.771	0.766	0.344	0.229	0.234	0.656
MID-1636	rs2307832	1	0.148	0.785	0.992	0.852	0.215	0.008
MID-51	rs16343	4	0.057	0.642	0.867	0.943	0.358	0.133
MID-2431	rs3031979	8	0.052	0.11	0.234	0.948	0.889	0.763
MID-2264	rs34122827	13	0.162	0.465	0.133	0.838	0.449	0.867
MID-2256	rs133052	22	0.000	0.222	0.836	1.000	0.778	0.164
MID-128	rs6490	12	0.024	0.481	0.047	0.976	0.519	0.953
MID-15	rs4181	2	0.195	0.453	0.836	0.805	0.547	0.164
MID-2241	rs3030826	6	0.814	0.293	0.070	0.186	0.707	0.930
MID-419	rs140708	6	0.919	0.810	0.563	0.081	0.190	0.438
MID-943	rs1611026	5	0.176	0.791	0.398	0.824	0.209	0.602
MID-159	rs16438	20	0.752	0.570	0.734	0.248	0.430	0.266
MID-2005	rs2308161	10	0.029	0.671	0.325	0.971	0.329	0.675
MID-250	rs16687	7	0.824	0.715	0.328	0.176	0.285	0.672
MID-1802	rs2307998	5	0.543	0.003	0.000	0.457	0.997	1.000
MID-1607	rs2307803	3	0.424	0.161	0.555	0.576	0.839	0.445
MID-1734	rs2307930	6	0.852	0.835	0.375	0.148	0.165	0.625
MID-406	rs25630	6	0.048	0.823	0.703	0.952	0.177	0.297
MID-1386	rs2307582	1	0.138	0.218	0.766	0.862	0.782	0.234
MID-1726	rs2307922	1	0.176	0.700	0.758	0.824	0.300	0.242
MID-3626	rs11267926	15	0.124	0.699	0.039	0.876	0.301	0.961
MID-360	rs25584	12	0.591	0.864	0.523	0.317	0.136	0.477
MID-1603	rs2307799	5	0.081	0.389	0.820	0.919	0.611	0.180
MID-2719	rs34541393	20	0.448	0.345	0.469	0.552	0.655	0.531

Modified from Pereira et al. (2012).

Table 2. Reactive mixture for PCR (polymerase chain reaction).

Reactive	μL / Sample
Water	1.9
Mix Quiagen Multiplex PCR	3.0
Primer's	0.6
DNA	0.5
Final volume	6

Table 3. Multiplex PCR profile.

First denaturing/ Denaturalization	Anneal 10 cycles	Anneal 20 cycles	Final Extension	
95° C 15 minutes	94° C 30 Secs	94° C 30 Secs	60° C 10 Minutes	15° C 10 Infinite
	60° C 1.5 Minutes	58° C 1.5 Minutes		
	70° C 1 Minutes	72° C 1 Minutes		

RESULTS

Allele frequencies

The allele frequencies and expected heterozygosities estimated for the 46 AIM-InDels are presented in Table 4. The generated data from all samples were used to test Hardy Weinberg Equilibrium and p values were corrected by Bonferroni's correction for multiple tests (Bland *et al.*, 1995). The InDels frequency distribution showed no statistically significant deviations from HWE within Cauca population.

Genetic distance analysis

A two-dimensional MDS plot was drawn to improve the visualization of genetic distances (Figure 1). It can be observed that Cauca and Manaus populations are neighbors and that these two populations are the result of the Native Americans and Europeans admixture, as other Brazilian populations.

Analysis of admixture

The ancestry proportions from the admixture analysis are shown in Figures 2A and 2B. The average ancestry of the studied population is 48 % Native American, 14 % African and 39 % European (Figure 3).

Principal component analysis

Principal component analysis was done to reduce the data dimension (Figure 4). It can be observed that the studied population is composed of European and Amerindian populations (biplot's right side); on the other hand, a minority arrangement towards the African population is also observed (biplot's left side). These findings set the Department of Cauca as a mixed race population territory (Figure 4).

Table 4. Frequencies of 46 insertion/deletion polymorphisms, obtained in individuals from the Department of Cauca.

Population Samples	n (%)	Frec_AM	Frec_AF	Frec_EU
North	20 (3.9)	0.31	0.35	0.34
South	103 (20.6)	0.52	0.12	0.36
Center	355 (71.0)	0.46	0.13	0.41
Eastern	22 (4.5)	0.49	0.10	0.41
Average Department of Cauca	500 (100)	0.45	0.17	0.38

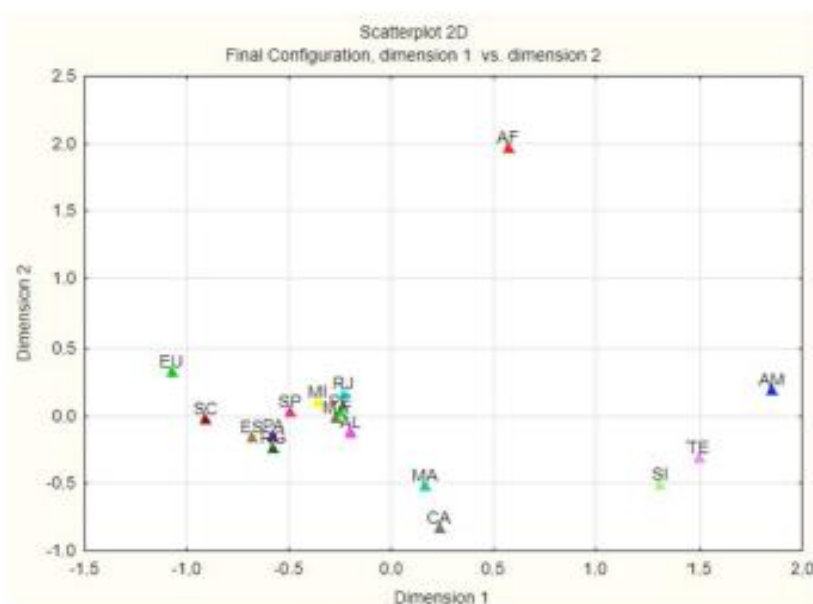


Figure 1. Multidimensional scaling plot of the pairwise F_{st} genetic distances calculated for samples from Native Americans, European, African and Cauca populations, including samples of Brazil; SI: Santa Isabel do Rio Negro; MA: Manaus; PE: Pernambuco; AL: Alagoas; MT: Mato Grosso do Sul; TE: Terena; MI: Minas Gerais; ES: Espírito Santo; RJ: Rio de Janeiro; SP: São Paulo; PR: Paraná; SC: Santa Catarina; RG: Rio Grande do Sul).

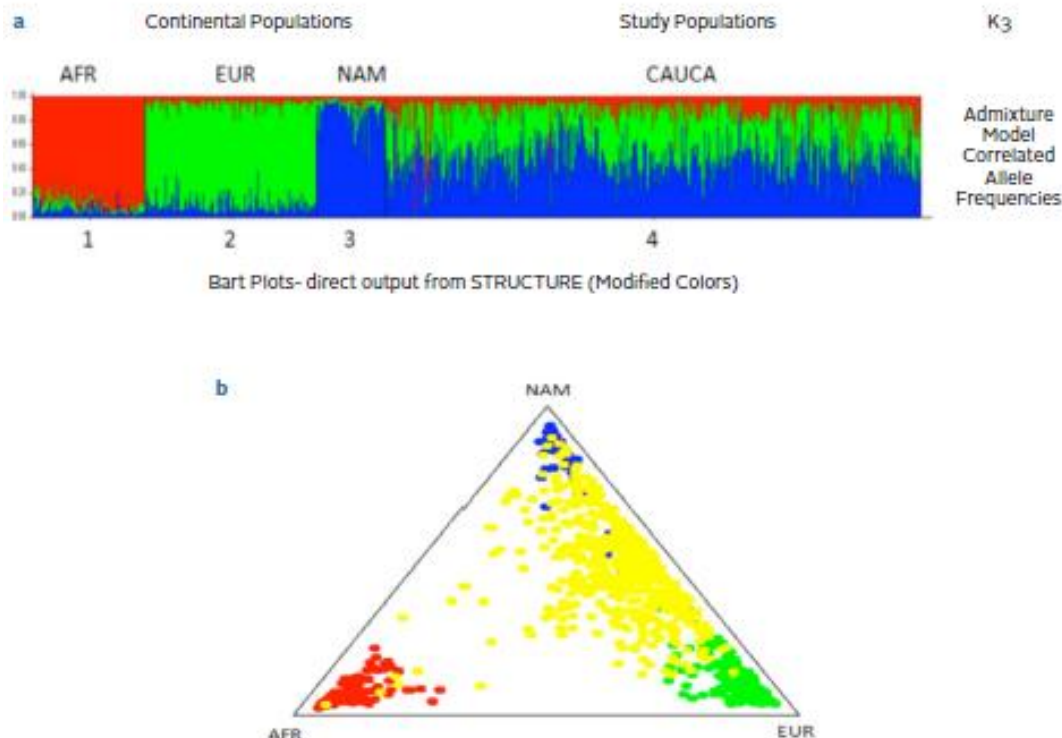


Figure 2A. Bar plot showing individual ancestry estimates obtained from Cauca population and parental populations. Based on STRUCTURE analysis with 100,000 burning steps followed by 100,000 MCMC iterations and $k=3$ with POPFLAG=1, treated in CLUMPP and plotted with destruct (AFR: Africa; EUR: Europe; NAM: Native America). Panels 1, 2 and 3 present the distribution of the African, European and Native American populations, respectively. On the other hand, panel 4 shows the distribution of individuals from the Department of Cauca evidencing a homogeneous contribution from both the Native American and European populations; notice that the largest proportion corresponds to "mestizo". The African contribution is present in a low proportion.

Figure 2B. Triangle plot representation to distinguish individuals from different parental populations. Based on STRUCTURE results from the run with highest $-\ln P(D)$ (left: admixture model; right: using population information; red: Africa; green: European; blue: Native American; yellow: Cauca). For each individual, the values of the three ancestry coefficients are indicated by the distance to the edges of the triangle. Each individual is represented by a colored point and a homogenous distribution of the population from Cauca in both clusters of European and Native American population is shown. Furthermore, a lower proportion of individuals from Cauca in the African population cluster are observed.

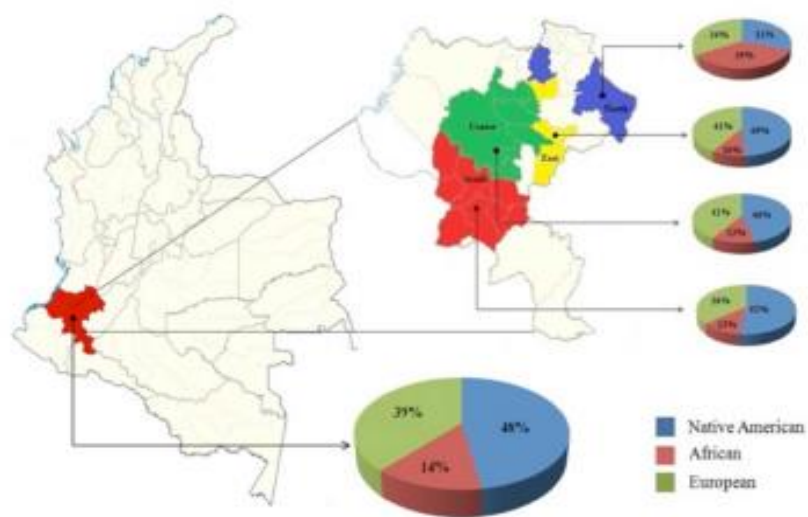


Figure 3. Map of regions studied from the Department of Cauca showing African, European and Native American ancestry contribution.

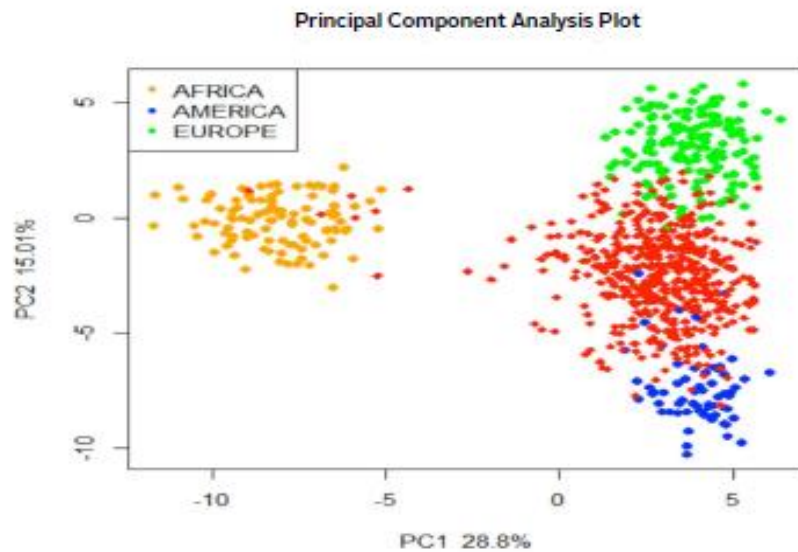


Figure 4. Principal Component Analysis, Biplot right side shows that the studied population is spread and compounded by the European and Amerindian origin, in contrast, in the biplot left side there is a minority population of African origin.

DISCUSSION

The estimation of the genetic composition of populations resulting from admixtures has been important in genetic analyses of many human populations (Lai *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Lins *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Avena *et al.*, 2012; Crouch *et al.*, 2012; Campos-Sánchez *et al.*, 2013; Heinz *et al.*, 2013; Shahabi *et al.*, 2013; Parolin *et al.*, 2014). A set of 46 AIMs-InDels reported by Pereira *et al.* (2012) was used to characterize the composition of genetic ancestry proportions of a population sample of 500 individuals from 23 out of 42 municipalities representing the central, northern, southern and eastern regions of the Department of Cauca (DANE, 2005). Individuals from western municipalities were not included in this study because jungle and maritime barriers limited the access to this part of the State. Thus, a random assessment of the genetic composition of the most representative regions from Cauca was accomplished.

The pairwise genetic distances analysis of the studied population showed a higher number of individuals closer to both Native American and European parental populations and a lower frequency closer to African population. The lower frequency of African population could be explained by the occurrence of cultural and geographic barriers which have resulted in the isolation of this ethnic group. These results are consistent with the admixture composition analysis conducted by STRUCTURE, which indicates that the ancestry genetic composition of the Cauca population is predominantly "Mestizo", resulting from the genetic contributions of both Native American and European populations and, to a lesser extent, the African population. The observed differences in ancestry proportions are the result of the admixture by both, European and African populations with the existent Native American population of Cauca. Our findings are consistent with previous genetic composition studies carried out in individuals from several municipalities of Cauca using different AIMs. The study by Acosta *et al.* showed a high percentage of European contribution in the Caucasian-Mestizo population and a high influence of African ancestry in Afro-Colombian individuals (Acosta *et al.*, 2009). Furthermore, it has been indicated that the Native American and European populations have contributed to a greater proportion to the current gene pool of Cauca population than the African (Rojas *et al.*, 2010; Córdoba *et al.*, 2012).

A previous study conducted in Cauca suggest that the DNAm lineage and Y chromosome ancestry did not contribute in the same way to the admixture process, as only 72.8 % of Y chromosomes comes from an European origin, but just a 0.65 % of DNAm comes from such origin (Córdoba *et al.*, 2012). In this study, a 17 % paternal contribution against an 89 % maternal contribution in the Amerindian component was also observed. In the African people an opposite phenomenon is observed, as there is a greater paternal contribution. These results suggest that there is a sexual bias in the studied population admixture process due to interethnic reproduction mainly between European conquerors and native women, which could also explain the results found in the present study.

The Department of Cauca harbors the highest percentage of Native American population in Colombia. About 20 % of the Cauca population belongs to this ethnic group; moreover, there are eight officially recognized indigenous groups which are established in 26 of the 42 municipalities (Zaumsegel *et al.*, 2013). The admixture analysis in our study revealed greater proportions of Native Americans in both eastern and southern regions of Cauca. This distribution is explained by the fact that numerous Native Americans tribes have inhabited predominantly in the municipalities of the eastern region (Caldono, Puracé, Totoró) since the Pre-Colombian period. Furthermore, several Native American tribes (e.g. Yanacona) are located predominantly in the South of the Department. On the other hand, the admixture proportions of Africans were significantly higher in the northern Region compared to the others. Despite the fact that the North of Cauca is inhabited mainly by Afro-Colombians, Native American and "Mestizo" populations exhibit a wide ethnic diversity. The various hard-labor activities carried out in this region, such as mining and agriculture, contribute to the large concentration of male Afro-descendants linked to them (DANE, 2005).

The population of the Department of Cauca according to the estimates of the National Administrative Department of Statistics -based on the census carried out at the national level in 2005- is constituted by 1,330,756 inhabitants who are spread over a territory of 30,169 km². According to this census, 20.50 % of the population is classified as indigenous. However, our study reveals that according to InDels markers the Amerindian ancestry is 48 %, being twice of that reported by the government. On the other hand, our study reveals a 14 % of the population having an

African ancestry, while the government reports 21 %; and the European ancestry is not established by the government. Data discrepancies are obviously the result of self-reported ethnicity that people provide during census interviewing, while genetic studies provide a more precise approach to ancestry origin.

CONCLUSIONS

All populations presented identical European and Native American contributions, which were slightly higher than the African contribution. Therefore it was determined that the Department of Cauca has a mixed population.

BIBLIOGRAPHY

- Acosta M.A., Blanco-Verea A., Lareu M.V., Brion M., Carracedo A. (2009) The genetic male component of two South-Western Colombian populations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3: 59-61.
- Avena S., Via M., Ziv E., Pérez-Stable E.J., Gignoux C.R., Dejean C., Huntsman S., Torres-Mejía G., Dutil J., Matta J.L. (2012) Heterogeneity in genetic admixture across different regions of Argentina. *PloS one*: e34695.
- Bastos-Rodriguez L., Pimenta J.R., Pena S.D. (2006) The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann. Hum. Genet.* 70: 658-665.
- Bland J.M., Altman D.G. (1995) Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ* 310: 170.
- Campos-Sánchez R., Raventós H., Barrantes R. (2013) Ancestry Informative Markers Clarify the Regional Admixture Variation in the Costa Rican Population. *Hum. Biol.* 85: 721-740.
- Chacón-Duque J.C., Adhikari K., Avendaño E., Campo O., Ramirez R., Rojas W., Ruiz-Linares A., Restrepo B.N., Bedoya G. (2014) African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in Colombian populations. *Infect. Genet. Evol.* 27: 89-95.
- Córdoba L., García J.J., Hoyos L.S., Duque C., Rojas W., Carvajal S., Escobar L.F., Reyes I., Cajas N., Sanchez A. (2012) Genetic Structure of a Southwestern Colombian Population. *RCA* 48: 21-48.
- Crouch D.J., Weale M.E. (2012) Inferring separate parental admixture components in unknown DNA samples using autosomal SNPs. *Eur. J. Hum. Genet.* 20: 1283-1289.
- DANE (2005) http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/Afro_indicadores_sociodemograficos_censo2005.pdf (Accessed April 2014).
- DANE (2005) <http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/censos> (Accessed April 2014).
- Desjardins P., Conklin D. (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *JoVE*: e2565-e2565.
- Excoffier L., Lischer H.E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 564-567.
- Heinz T., Álvarez-Iglesias V., Pardo-Seco J., Taboada-Echalar P., Gómez-Carballa A., Torres-Balanza A., Rocabado O., Carracedo A., Vullo C., Salas A. (2013) Ancestry analysis reveals a predominant Native American component with moderate European admixture in Bolivians. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7: 537-542.
- Kosoy R., Nassir R., Tian C., White P.A., Butler L.M., Silva G., Kittles R., Alarcon-Riquelme M.E., Gregersen P.K., Belmont J.W. (2009) Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum. Mutat.* 30: 69-78.
- Lai C.Q., Tucker K.L., Choudhry S., Parnell L.D., Mattei J., García-Bailo B., Beckman K., Burchard E.G., Ordovás J.M. (2009) Population admixture associated with disease prevalence in the Boston Puerto Rican health study. *Hum. Genet.* 125: 199-209.
- LaRue B.L., Lagacé R., Chang C.W., Holt A., Hennessy L., Ge J., King J.L., Chakraborty R., Budowle B. (2014)

- Characterization of 114 insertion/deletion (INDEL) polymorphisms, and selection for a global INDEL panel for human identification. *Leg. Med.* 16: 26-32.
- Lee Y.L., Teitelbaum S., Wolff M.S., Wetmur J.G., Chen J. (2010) Comparing genetic ancestry and self-reported race/ethnicity in a multiethnic population in New York City. *J. Genet.* 89: 417-423.
- Lins T.C., Vicira R.G., Abreu B.S., Grattapaglia D., Pereira R.W. (2010) Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. *Am. J. Hum. Biol.* 22: 187-192.
- Manta E.S.N., Pereira R., Caiafa A., Silva D.A., Gusmão L., Carvalho E.F. (2013) Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann. Hum. Biol.* 40: 94-98.
- Miller S., Dykes D., Polesky H. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16: 1215.
- Neves Manta E.S., Pereira R., Vianna R., Araújo A.R.B., Gitai D.L.G., da Silva D.A., de Vargas Wolfgramm E., da Mota Pontes I., Aguiar J.I., Moraes M.O. (2013) Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-InDels. *PloS one* 8: e75145.
- Parolin M.L., Carreras-Torres R., Sambuco L.A., Jaureguierry S.M., Iudica C.E. (2014) Analysis of 15 autosomal STR loci from Mar del Plata and Bahía Blanca (Central Region of Argentina). *Int. J. Legal Med.* 128: 457-459.
- Pena S.D., Bastos-Rodrigues L., Pimenta J., Bydlowski S. (2009) DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42: 870-876.
- Pena S.D., Di Pietro G., Fuchshuber-Moraes M., Genro J.P., Hutz M.H., Kehdy Ed.S.G., Kohlrausch F., Magno L.A.V., Montenegro R.C., Moraes M.O. (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one* 6: e17063.
- Pepinski W., Abreu-Glowacka M., Koralewska-Kordel M., Michalak E., Kordel K., Niemcunowicz-Janica A., Szeremeta M., Konarzewska M. (2013) Population genetics of 30 InDels in populations of Poland and Taiwan. *Mol. Biol. Rep.* 40: 4333-4338.
- Pereira R., Phillips C., Alves C., Amorim A., Carracedo Á., Gusmão L. (2009) A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis* 30: 3682-3690.
- Pereira R., Phillips C., Pinto N., Santos C., dos Santos S.E.B., Amorim A., Carracedo Á., Gusmão L. (2012) Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PloS one* 7: e29684.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rojas W., Parra M.V., Campo O., Caro M.A., Lopera J.G., Arias W., Duque C., Naranjo A., García J., Vergara C. (2010) Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. *Am. J. Phys. Anthropol.* 143: 13-20.
- Schneider S., Lischer H.E. (2009) Arlequin, version 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. University of Berne: 1-145.
- Shahabi A., Wilson M.L., Lewinger J.P., Goodwin T.M., Stern M.C., Ingles S.A. (2013) Genetic admixture and risk of hypertensive disorders of pregnancy among Latinas in Los Angeles County. *Epidemiology* 24: 285-294.
- Shi M., Liu Y., Bai R., Jiang L., Lv X., Ma S. (2015) Population data of 30 insertion-deletion markers in four Chinese populations. *Int. J. Legal Med.* 129: 53-56.
- Shriver M.D., Smith M.W., Jin L., Marcini A., Akey J.M., Deka R., Ferrell R.E. (1997) Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 957.
- Tishkoff S.A., Reed E.A., Friedlaender E.R., Ehret C., Ranciaro A., Froment A., Hirbo J.B., Awomoyi A.A.,

- Bodo J.M., Doumbo O. (2009) The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 324: 1035-1044.
- Wang H., Haiman C.A., Kolonel L.N., Henderson B.E., Wilkens L.R., Le Marchand L., Stram D.O. (2010) Self-reported ethnicity, genetic structure and the impact of population stratification in a multiethnic study. *Hum. Genet.* 128: 165-177.
- Weber J.L., David D., Heil J., Fan Y., Zhao C., Marth G. (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet* 71: 854-862.
- Zaumsegl D., Rothschild M.A., Schneider P.M. (2013) A 21 marker insertion deletion polymorphism panel to study biogeographic ancestry. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7: 305-312.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to all the volunteers who participated in the study from the municipalities of El Tambo, Puracé, Silvia, Mercaderes, Rosas, Timbio, Bolivar, La Sierra, La Vega, Cajibío, Argelia, Tunia, Sotará, Piendamó, Miranda, El Bordo, Santander de Quilichao, Totoró, Almaguer, Inzá, Puerto Tejada, Balboa, Morales, San Sebastián, Belalcazar, Coconuco, Sucre, and Popayán. Finally, we acknowledge the collaboration of the administrative personnel of the Human Genetics Laboratory and the Vice-presidency for Research of the University of Cauca.



Elsevier España, SLU
Av. Josep Tarradellas, 20-30 1ª Planta
08029 Barcelona
Spain
t +34 932000711
f +34 932091136
elsevier.com

Empowering Knowledge

Dra. Laura Casares, en calidad de Publishing Editor de Elsevier España, S.L.U.

CERTIFICA:

Que la Dra. Astrid Lorena Urbano consta como autora del artículo "Prevalencia y factores de riesgo asociados a la enfermedad arterial periférica en una población adulta de Colombia" (Ref.: ACMX-D-16-00126), que ha sido aceptado para publicarse en la revista Archivos de Cardiología de México.

Para que así conste y a petición de la Dra. Astrid Lorena Urbano, firmo el presente en Barcelona a nueve de febrero de dos mil diecisiete.