



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MEDICAS, ODONTOLOGICAS Y DE LA SALUD.**

DESCRIPCION DE LOS POLIMORFISMOS E67OG,
R46L Y F216L DEL GEN DE LA PROTEÍNA CONVERTASA SUBTILISINA/
KEXINA 9 (PCSK9) EN POBLACION MEXICANA CON INFARTO CEREBRAL
ATEROTROMBÓTICO

TESIS

PARA OÚVORÁPOR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

FABIOLA EUNICE SERRANO ARIAS

TUTOR DE TRABAJO

DR. ANGEL ANTONIO ARAUZ GONGORA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. CARLOS GERARDO CANTÚ BRITO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA NUTRICION
DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ
INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA CONDE DE LA VALENCIANA
DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENOMICA
DR. ERWIN CHIQUETE ANAYA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA NUTRICION

Ciudad de México, Noviembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. Resumen de la Investigación
2. Antecedentes
3. Planteamiento del Problema
4. Hipótesis
5. Objetivos
6. Justificación
7. Metodología
 - Casos
 - Controles
 - Identificación de Polimorfismos
 - Definición Operacional de Variables
8. Cronograma de Actividades
9. Análisis Estadístico
10. Consideraciones Éticas
 - Carta de aprobación Comité de Ética
 - Carta de aprobación Comité de Investigación.
11. Consideraciones Financieras
12. Resultados
13. Discusión.
14. Referencias Bibliográficas
15. Apéndices
 - Apéndice 1: Carta de Consentimiento Informado Casos
 - Apéndice 2: Carta de Consentimiento Informado Controles
 - Apéndice 3: Clasificación de ASCOD
 - Apéndice 4: Cuestionario para Evaluación de Pacientes Libres de EVC.

RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA:

La prevalencia de enfermedad cerebrovascular (EVC) a nivel mundial se ha incrementado en las últimas décadas. Los niveles elevados de LDL son uno de los mayores factores de riesgo que se correlacionan con el desarrollo temprano de EVC. La acumulación subendotelial de partículas de LDL en las paredes arteriales, es el paso inicial para la aterosclerosis, lo que conlleva a la acumulación patológica de lípidos y los desechos celulares y a la inflamación crónica, culminando en eventos coronarios e infartos cerebrales. (1)

La Proteína convertasa subtilisina / Kexin tipo 9 (PCSK9) es una proteasa, la cual ha ganado atención recientemente por su rol con la regulación en el plasma de los niveles de la lipoproteína de baja densidad (LDL).

Las mutaciones en este gen se han asociado a hipocolesterolemia y a hipercolesterolemia a través "pérdida de función" y "ganancia de función" respectivamente.

Basado en estudios genéticos humanos, la inhibición PCSK9 debe representar un nuevo enfoque potente para disminuir el colesterol LDL, con el objetivo de reducir la progresión de la aterosclerosis y el riesgo de EVC. (1)

Objetivos: Identificar una asociación entre los polimorfismo E670G, R218S y F216L del gen PCSK9 y el Infarto Cerebral Aterotrombótico en la población mexicana.

Hipótesis: Existe asociación genética entre los polimorfismos E670G, R218S y F216L del gen de la proteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9) en población mexicana con infarto cerebral aterotrombótico.

Metodología: Se llevará a cabo un estudio de casos y controles, en donde se reclutarán sujetos con diagnóstico confirmado de Infarto cerebral aterotrombotico (acorde a los criterios de la clasificación de ASCOD) y un grupo de controles sanos. Se realizará una descripción de las características demográficas, clínicas y de evolución de los casos y estimaremos la fuerza de asociación entre las variables predictoras (polimorfismos E670G, R218S y F216IL del gen PCSK9) y la presencia-ausencia de Infarto Cerebral Aterotrombótico.

ANTECEDENTES

Introducción

La prevalencia de enfermedad cerebrovascular (EVC) a nivel mundial se ha incrementado en las últimas décadas a la par de la enfermedad arterial coronaria (EAC), enfermedades que se espera sigan siendo las principales causas de la mortalidad hasta 2030. (1)

La enfermedad cerebrovascular aguda es un creciente problema de salud en países que viven la transición epidemiológica, de tal manera que para el año 2005, el 85% de las muertes atribuidas a infartos cerebrales alrededor del mundo ocurrió en países en vías de desarrollo.

En México, la enfermedad cerebrovascular ha pasado de ser la cuarta causa de mortalidad general en el año 2000, con poco más de 25.000 muertes, a ser en el año 2008 la tercera causa de mortalidad, con más de 30.000 fallecimientos.

La enfermedad vascular cerebral (EVC) es un síndrome clínico que se caracteriza por la presencia súbita de signos neurológicos focales, los cuales persisten por más de 24 horas.

Se pueden dividir en 2 subtipos: Evento vascular cerebral hemorrágico e isquémico:

- 1) El EVC hemorrágico se presenta después de la ruptura de un vaso sanguíneo lo que ocasiona una colección hemática en el parénquima cerebral o espacio subaracnoideo.
- 2) El EVC isquémico o Infarto Cerebral (IC) es la consecuencia de la oclusión de un vaso y puede tener manifestaciones transitorias (ataque isquémico transitorio) o permanentes, lo que implica un daño neuronal irreversible. Una vez que existe oclusión de un vaso cerebral con la consecuente obstrucción del flujo sanguíneo cerebral, se desencadena una cascada de eventos bioquímicos que inicia con la pérdida de energía y que termina en muerte neuronal.

Subtipos de infarto cerebral.

Los Infartos Cerebrales pueden subdividirse con base en diferentes parámetros;

- 1) Anatómico: circulación anterior o carotídea y circulación posterior o vertebrobasilar
- 2) Mecanismo que lo produce, lo que permite establecer medidas de prevención secundaria.

La clasificación ASCOD divide los tipos de infarto cerebral de acuerdo al mecanismo de la siguiente manera:

- A.** Ateroesclerosis de grandes vasos
- S.** Enfermedad de pequeño vaso
- C.** Embolismo cardiaco
- O.** Otras causas no comunes.
- D.** Disección.

La Ateroesclerosis de grandes vasos es el mecanismo más frecuente. La ateroesclerosis extracraneal afecta principalmente la bifurcación carotídea, la porción proximal de la carótida interna y el origen de las arterias vertebrales. El IC secundario a ateroesclerosis es el resultado de la oclusión trombótica (aterotrombosis) o tromboembólica (embolismo arteria-arteria) de los vasos. Debe sospecharse en pacientes con factores de riesgo vascular y puede confirmarse a través de Doppler carotídeo, angiografía (AIRM) o angiotomografía (ATC) y en algunos casos con angiografía cerebral.

Los siguientes hallazgos apoyan ateroesclerosis: a) estenosis sintomática > 50% en una de las principales arterias cerebrales, b) IC mayor de 1.5 cm, y c) exclusión de otras etiologías probables.

En el estudio PREMIER (Primer Registro Mexicano de Isquemia Cerebral) realizado por la Asociación Mexicana de Enfermedad Vascular Cerebral (AMEVASC), la mayor parte de los ictus se clasificó como de causa no determinada, debido al muy limitado uso de recursos de diagnóstico, comparado con lo comunicado en otros registros internacionales. En consecuencia, sólo el 8% de los eventos se clasificó como debido a enfermedad de grandes vasos, mientras que el 42% fue de etiología indeterminada. Ciertamente, cuando se analiza el subgrupo de pacientes PREMIER clasificados como indeterminados, encontramos que cerca del 40% tiene dos o más factores de riesgo vascular, o bien presenta evidencia de aterosclerosis sistémica

(p. ej., coronaria o periférica). Por lo tanto, se puede inferir que la mayor parte de los casos indeterminados puede deberse a aterotrombosis de grandes arterias.

En dicho registro se identificaron factores de riesgo vascular ampliamente modificables los cuales son responsables de la mayor parte de los casos de ictus en México, entre los que se encuentra la diabetes e hipertensión, seguido de tabaquismo, enfermedad arterial coronaria y fibrilación auricular.

La hipercolesterolemia es un problema de salud pública por su alta prevalencia, en México es de 26.5% y en Jalisco de 30%. Se caracteriza por valores de CT \geq 200 mg/dL y de C-LDL \geq 100 (ATP-III), los cuales tiene una relación causal con aterosclerosis temprana y sus manifestaciones clínicas, como la enfermedad coronaria, la enfermedad arterial periférica y el evento vascular cerebral isquémico (1, 5, 7).

El depósito subendotelial de partículas de LDL en las paredes arteriales, es el paso inicial para la aterosclerosis, lo que conlleva a la acumulación patológica de lípidos, desechos celulares e inflamación crónica, lo que culmina en eventos coronarios e infartos cerebrales. (5, 7). La proteína PCSK9 es un inhibidor natural del receptor de LDL (RLDL) y su deficiencia se asocia a niveles bajos de LDL y ejerce protección contra enfermedad coronaria.

En 2003, cuatro grupos informaron de la caracterización de un nuevo miembro de la familia de genes de la pro-proteína convertasa (6). La Proteína convertasa subtilisina / Kexin tipo 9 (PCSK9) es una proteasa, la cual ha ganado atención recientemente por su rol con la regulación en el plasma de los niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL) siendo un determinante de riesgo de enfermedad coronaria cardiaca (1, 2, 6). El descubrimiento de PCSK9 ha proporcionado nuevos conocimientos sobre el metabolismo de LDL y los factores determinantes de los niveles plasmáticos de colesterol LDL (LDL-C). (6)

Características estructurales de PCSK9

La PCSK9 es la novena integrante de la familia de subtilisina de proconvertasas Kexin que se han identificado, es conocida también como NARC1 (apoptosis neuronal regulada por convertasa 1) (1, 7).

El gen PCSK9 se localiza en el cromosoma 1p32.3, que engloba 12 exones y codifica a 692 amino-acido glicoproteínas. (1)

La proteína se sintetiza como un zimógeno inactivo precursor de 72-kDa que se somete a escisión autocatalítica entre el prodominio y dominio catalítico (1, 7). Al

igual que con otros miembros de la familia, la secuencia señal (aminoácidos 1-30) en PCSK9 es seguida por el prodominio (aminoácidos 31-152) y dominio catalítico (residuos 153-451) seguido de un dominio C-terminal (residuos 452- 692). La PCSK9 carece de un dominio P clásico, el cual se requiere para el plegado y la regulación de la actividad de proteasas en las otras proproteínas convertasas; más bien, el dominio catalítico es seguido por un ácido cisteína 279 y la región histidina-aminoácido C-terminal (1) En contraste con otras proproteínas convertasas, la escisión autocatalítica de PCSK9 no requiere de calcio.(6)

La PCSK9 actúa como una chaperona molecular que se une al factor de crecimiento epidérmico como el dominio A de receptor de LDL (LDLR) y promueve la degradación de LDLR a través de una vía endosomal / lisosomal (1). La PCSK9 también puede regular la producción de lipoproteínas que contienen ApoB-y la secreción de ApoB, promover la producción de la nascente lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en el estado de ayuno (1)

Sitio de acción de PCSK9 en las células.

Los caminos intracelulares de la PCSK9 y el LDLR son similares, pero en la superficie celular se separan. El LDLR permanece asociado con la membrana celular, mientras que la PCSK9 es secretado rápidamente y eficientemente en el medio celular. PCSK9 también es secretada in vivo, presumiblemente por el hígado y está presente en el plasma humano.

La sobreexpresión de PCSK9 aumenta la degradación predominantemente de la forma madura glucosilada de la LDLR. La PCSK9 podría promover la degradación del LDLR, ya que migra desde el retículo endoplásmico a la membrana celular. Alternativamente, la PCSK9 podría permanecer inactiva mientras migra a través de la vía secretora y podría actuar sobre el LDLR sólo después de que se secreta.

El prodominio de PCSK9 permanece firmemente unido a la proteína madura durante su secreción, presumiblemente por la inhibición de la actividad catalítica. En otras proproteínas de convertasas, el pro-segmento experimenta un evento de procesamiento proteolítico secundario, ya sea en el aparato de Golgi o después de la secreción.

En la ARH (hipercolesterolemia autosómica recesiva), una proteína adaptadora necesaria para la internalización endocítica LDLR, es necesaria para la degradación mediada por PCSK9 del LDLR. En ausencia de ARH, la LDLR y PCSK9 dejan de ser internalizados y no se observan ningún cambio en el número de LDLR. (6, 7)

Mediante la unión a la LDLR, PCSK9 podría interferir con el reciclaje normal de la LDLR después de la internalización, la reorientación de la LDLR a lisosomas en lugar de volver a la superficie celular. Si esta última hipótesis es correcta, la acción de PCSK9 en LDLR no podría implicar actividad catalítica. (6)

Las concentraciones en plasma de LDL-C se determinan principalmente por la actividad del receptor de LDL (LDLR) en el hígado. (1, 6). La PCSK9 promueve la degradación de los receptores de LDL (LDLR) en el hígado a través de un mecanismo aún desconocido de postranscripción. (2, 7). Su activación conduce a disminución en la cantidad de los receptores de LDL hepáticos y por consiguiente a desarrollar niveles más altos de colesterol LDL en plasma. Las mutaciones en este gen se han asociado a hipocolesterolemia y a hipercolesterolemia a través "pérdida de función" y "ganancia de función" respectivamente. (8)

La pérdida de función promueve la captación de LDL-colesterol y disminuye el colesterol sérico y el colesterol LDL (LDLC) y confiere protección contra las enfermedades cardiovasculares. La ganancia de función reduce la expresión en la superficie celular de LDLR, que inhibe la captación celular de colesterol LDL en suero lo que eleva el colesterol sérico que conduce a la hipercolesterolemia autosómica dominante (ADH) y la aterosclerosis prematura (1).

Antes de 2003, solo dos formas de hipercolesterolemia autosómica dominante se conocían:

- 1) La hipercolesterolemia familiar (HF), causada por mutaciones en el gen que codifica el receptor de LDL (LDLR)
- 2) La Apo-B100 defectuosa familiar (FDB), causada por mutaciones en ApoB-100 (APOB) que interrumpen la unión de la LDL a la LDLR.

Ambos trastornos disminuyen la endocitosis mediada por los LDLR en el hígado, la vía principal de eliminación de LDL circulante. (6)

Elevaciones crónicas en los niveles plasmáticos de LDL-C en HF y FDB resulta en acumulación de colesterol en los tejidos (xantomas) y en las arterias, especialmente las arterias coronarias (aterosclerosis coronaria). (6)

Inicialmente, tres mutaciones de sentido erróneo del gen que codifica la PCSK9 se identificaron en familias con un fenotipo clínico que asemeja HF y FDB: S127R, F216L y D374Y. Posteriormente, se identificaron mutaciones de sentido erróneo adicionales en sujetos hipercolesterolémicos. Los probandos heterocigotos para las mutaciones en tanto LDLR y PCSK9 tienen niveles plasmáticos de LDL que son 50% más altas que los parientes con una sola mutación. (6).

La mayoría de las expresiones de los defectos enzimáticos de PCSK9 y niveles LDLR causan trastornos recesivos. La observación de que la mutación de PCSK9 provoca hipercolesterolemia dominante sugiere que las mutaciones confieren una ganancia de función, ya sea mediante el aumento de la actividad normal de PCSK9 o al conferir una nueva actividad a la proteína. (6)

Con base a estudios genéticos humanos, la inhibición PCSK9 debe representar un nuevo enfoque potente para disminuir el colesterol LDL-C con el objetivo de reducir la progresión de la aterosclerosis y el riesgo de EVC. (7)

Las mutaciones PCSK9 adicionales asociados con una reducción en los niveles plasmáticos de LDL-C se han encontrado, incluyendo deleciones en marco y mutaciones sin sentido. Tres mutaciones de pérdida de función en PCSK9 - Y142X y C679X en los afroamericanos, y R46L en los caucásicos son lo suficientemente comunes. (6)

Los mecanismos por los que la pérdida de función de las mutaciones en el gen que codifica PCSK9 reduce los niveles de colesterol en plasma se investigaron en ratones en los que se inactivó PCSK9. Estos animales han aumentado los niveles de proteína LDLR hepáticas, el aclaramiento de LDL acelerado y la reducción de los niveles de colesterol en plasma. Por lo tanto, PCSK9 suprime tónicamente los niveles de LDLR, limitando de este modo la absorción de LDLR-mediada de las lipoproteínas. (6)

Un mecanismo alternativo por el cual las mutaciones PCSK9 pueden alterar los niveles de LDL en plasma es el influir en la tasa de secreción de ApoB-100-lipoproteínas que contiene desde el hígado, probablemente como un evento secundario relacionado con la reducción en los receptores de LDL. La Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) es el vehículo principal para la secreción de triglicéridos del hígado. Si PCSK9 causa hipercolesterolemia aumentando la producción de VLDL, sería de esperar que la pérdida de función de las mutaciones en PCSK9 redujera la secreción de VLDL, sin embargo los estudios no apoyan el concepto de que los cambios en los niveles de LDL asociados a mutaciones en PCSK9 se deben principalmente a los efectos sobre la síntesis de VLDL. (6)

El LDLR y la PCSK9 se regulan coordinadamente por un esteroide, un factor de proteína de unión al elemento 2 (SREBP-2) que regula la transcripción y activa varios genes implicados en el metabolismo del colesterol. La administración de estatinas reduce el LDL mediante la inducción de SREBP-2 de expresión, lo que aumenta la expresión de LDLR. Los bajos niveles plasmáticos de LDL-C asociados con la pérdida de función de las mutaciones en PCSK9 indican que la inhibición de

PCSK9 ya sea a través de pequeñas moléculas, anticuerpos o RNA, deben ser fármacos eficaces para reducir el colesterol de forma independiente a las estatinas.

Los avances recientes han revelado un gran número de variantes genéticas de PCSK9 que pueden modular los niveles de colesterol en plasma, ya sea positiva o negativamente, por lo tanto influir en el riesgo de aterosclerosis. (1)

Polimorfismos del gen PCSK9

El polimorfismo es la aparición de una población de dos o más formas determinadas genéticamente (alelos, variantes de secuencias) en frecuencias tales que las más raras de ellas no podría explicarse por una mutación sola. Por convención, un locus polimórfico es uno en el cual hay al menos dos alelos, cada uno de ellos con una frecuencia superior al 1%. Los alelos con frecuencias inferiores al 1% se denominan variantes raras.

Polimorfismo E670G del gen PCSK9

En el estudio LCAS (Lipoprotein Coronary Atherosclerosis Study) se han identificado polimorfismos de la PCSK9 como E670G (rs505151) en el exón 12 de PCSK9, lo que dan como resultado la sustitución de glutamato por un residuo de glicina en la posición 670 en la proteína, el cual se ha relacionado con los niveles de LDL en plasma y aterosclerosis severa coronaria (1, 8), sin embargo, estudios posteriores realizados en poblaciones caucásicas y africanas no encontraron esta asociación (1). Además, el polimorfismo E670G se asocia con los parámetros más altos séricos de lípidos (TC, LDL-C, HDL-C y ApoB) (1). En una población europea los portadores de E670G presentaron una elevación significativa de LDL en los hombres, no encontrándose la elevación en las mujeres (1). Más recientemente, la presencia del alelo E670G se asoció significativamente con un mayor riesgo de aterosclerosis de grandes vasos (LVA) y el espesor íntima-media (IMT). En un estudio, Slimini y Cols demostraron la asociación entre la variante E670G y un aumento de los niveles de C-LDL y el riesgo de enfermedad cardiovascular e isquemia cerebral, sugiriendo un papel directo de PCSK9 en la aterogénesis (1)

Polimorfismo R46L del gen PCSK9

El polimorfismo R46L en PCSK9 se ha asociado con reducciones en LDL-C de 0,28 a 0,54 mmol / l (9% a 15%) y con una reducción del 47% en el riesgo de cardiopatía isquémica en los portadores frente a los no portadores (8). Este menor riesgo de cardiopatía isquémica es considerablemente mayor que el esperado por ensayos

con estatinas, sin embargo la presencia del alelo no predice la mortalidad. (8). La frecuencia del alelo 46L fue de 1.3% en los 45699 sujetos estudiados. (8)

Polimorfismo F216L del gen PCSK9

Se identificó inicialmente en familias con fenotipo clínico de hipercolesterolemia familiar, posteriormente se identificó en sujetos solo con hipercolesterolemia. Su expresión produce ganancia de función de la PCSK9 con aumento subsecuente en los niveles de LDL. (6, 12)

Aplicaciones clínicas

Es importante buscar la reducción de los valores de LDL-C ya que esto significa disminución en la morbilidad y mortalidad cardiovascular. El concepto "entre más bajo mejor" soporta la terapia intensiva de reducción del LDL-C. De acuerdo a las guías de la Sociedad Europea de Cardiología, se recomiendan valores de LDL-C menores a 1.8 mmol/l (< 70 mg/dl) en pacientes con alto riesgo (riesgo cardiovascular establecido o presencia de Diabetes Mellitus tipo 1 y 2). (9)

Basado en lo anterior, se ha propuesto el uso de medicamentos como las estatinas para inducir la expresión en ratas de la PCSK9. Algunos estudios han demostrado que las estatinas disminuyen los niveles plasmáticos de la PCSK9 entre un 14 a 47% dependiendo del tipo y la dosis usada. (10), sin embargo se encuentra la limitación de los efectos adversos por las dosis elevadas, los cuales se presentan entre un 10 a 12 %. (11, 12). Los fibratos se han probado en estudios in vitro sin lograr hasta el momento comprobarse su eficacia en la elevación de los niveles de PCSK9 en humanos. (10)

Se ha intentado la combinación de estatinas con ezetimiba, especialmente en pacientes con cifras elevadas de LDL-C y elevado riesgo cardiovascular, sin embargo no se han podido lograr los objetivos deseados. (11).

Con base en meticulosos estudios genéticos y de biología molecular, se ha intentado la inhibición de PCSK9 con anticuerpos monoclonales. (11), con los cuales se ha visto una reducción de LDL-C del 55 al 65%, cuando se administran de manera subcutánea cada 2 a 4 semanas. (11, 13)

Dos anticuerpos monoclonales completamente humanos, evolocumab (AMG 145) y alirocumab (REGN727 / SAR236553), se han estudiado en pacientes con intolerancia a las estatinas, (14,15) en pacientes con monoterapia o en terapia

combinada con estatinas, así como en pacientes con hipercolesterolemia familiar. (14)

En conclusión, con el descubrimiento de la PCSK9 en la homeostasis del colesterol, el entendimiento del metabolismo de los lípidos ha sido renovado. Se sabe que PCSK9 puede reducir el reciclaje de los receptores de LDL y deprimir las actividades de los mismos, lo que aumenta el LDL-C. En los seres humanos, el aumento de PCSK9 o la presencia de mutaciones con ganancia de función dan como resultado el aumento de circulación de LDL-C y el riesgo de enfermedad cardiovascular significativo. Por el contrario, en los seres humanos con mutaciones a la baja de PCSK9, han reducido en la circulación el LDL-C y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. (13)

En nuestro estudio se evaluara el papel de los polimorfismos E670G, R46L (3) y F216L (4) del gen PCSK9 como un posible factor de riesgo para enfermedad cerebrovascular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

No existe una clara asociación entre los diversos polimorfismos de genes asociados a trastornos en el metabolismo de los lípidos y el riesgo de Infarto cerebral aterotrombótico.

HIPÓTESIS.

Existe asociación genética entre los polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen de la proteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9) en población mexicana con infarto cerebral aterotrombótico.

OBJETIVOS

Objetivo general de la investigación

- Describir los polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen PCSK9 en pacientes mexicanos con Infarto Cerebral Aterotrombótico.

Objetivo secundario

- 1) Identificar si los niveles de LDL son más difíciles de controlar en pacientes portadores de los polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen PCSK9

JUSTIFICACIÓN

Un importante porcentaje de los Infartos Cerebrales corresponden a la etiología aterotrombótica. La mayoría de estudios de asociación genética que se han realizado en esta condición, provienen de población no latinoamericana, por lo que evaluar y extrapolar estos estudios a la población mexicana resulta difícil.

A través de este estudio se pretende generar nuevo conocimiento en el área de la susceptibilidad genética del Infarto Cerebral aterotrombótico, al igual que los elementos que intervienen en su génesis y evolución, con el fin de mejorar la comprensión de su fisiopatología, evaluar la integración terapéutica actual y definir aportes en el manejo de pacientes con esta patología.

METODOLOGÍA

Se llevará a cabo un estudio de casos y controles, en donde se reclutarán sujetos con diagnóstico confirmado de Infarto cerebral aterotrombotico (acorde a los criterios de la clasificación de ASCOD) y un grupo de controles sanos. Se realizará una descripción de las características demográficas, clínicas y de evolución de los casos y estimaremos la fuerza de asociación entre las variables predictoras (polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen PCSK9) y la presencia-ausencia de Infarto Cerebral Aterotrombótico.

Se determinó la muestra mediante la fórmula para calcular muestras en estudios de casos y controles:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL EN ESTUDIOS DE CASOS Y CONTROLES		
<i>Cálculo del tamaño muestral mínimo necesario para detectar un odds ratio significativamente diferente de 1</i>		
Frecuencia de exposición entre los casos	▼	0,20
Frecuencia de exposición entre los controles	▼	0,06
Odds ratio a detectar	▼	3,52
Nivel de seguridad	▼	0,95
Potencia	▼	0,80
Número de controles por caso		1
<hr/>		
p1	▼	0,20
p2	▼	0,06
OR	▼	3,52
<hr/>		
TAMAÑO MUESTRAL MÍNIMO		
Casos		89
Controles		89
		<i>Sonia Pértega Díaz</i>
		<i>Salvador Pita Fernández</i>
		<i>Unidad de Epidemiología y Bioestadística</i>
		<i>Complejo Hospitalario "Juan Canalejo"</i>

Por lo que para este propósito se recolectará DNA de al menos 100 pacientes con Infarto Cerebral Aterotrombótico y 100 controles sanos. A todos se les tomará una

muestra de sangre periférica para extracción de DNA por métodos convencionales, previo consentimiento informado. (APENDICE 1 Y 2)

CASOS

Pacientes con diagnóstico confirmado de Infarto Cerebral Aterotrombótico (de acuerdo a los criterios de clasificación ASCOD ver APENDICE 3). Pueden haber sido diagnosticados desde enero de 1990 hasta diciembre del 2014 por la clínica de enfermedad vascular cerebral del Instituto Nacional de Neurología de México.

En todos los casos se registrarán los factores de riesgo vascular, el reporte del examen físico y neurológico, exámenes de laboratorio (colesterol total, colesterol LDL, HDL, triglicéridos y Hematócrito), electrocardiograma y estudios adicionales (ecocardiograma, Holter de 24 horas)

Evaluación radiológica: Todos los casos deben contar con los siguientes estudios: TAC convencional o IRM convencional y al menos uno de los siguientes: doppler de vasos extracraneales e intracraneales, angiorrsonancia, angiotomografía, o angiografía por sustracción digital de los vasos intra y extracaneales.

Los siguientes hallazgos son considerados como diagnósticos de Infarto Cerebral Aterotrombótico, A1 (de acuerdo a los criterios de clasificación ASCOD):

A1 (causa potencial):

- Estenosis arterial (intra o extracraneal) ipsilateral al territorio isquémico del 50 al 99%, o
- Estenosis arterial (intra o extracraneal) ipsilateral al territorio isquémico < 50% con trombo intraluminal, o
- Trombo móvil en el arco aórtico o
- Oclusión arterial (intra o extracraneal) ipsilateral al territorio isquémico con una placa aterosclerótica subyacente.

Los EVC isquémicos son categorizados de acuerdo al territorio vascular afectado (total de la circulación anterior, parcial de la circulación anterior, lacunares y territorio posterior); sitio de afectación aterosclerótica (intracraneal, extracraneal, intra/extracraneal); vaso arterial afectado (localización y segmento); grado de estenosis (definido por el estrechamiento de la luz arterial por la placa aterosclerótica).

Criterios de inclusión.

- Pacientes con Infarto Cerebral Aterotrombótico (A1) y hallazgos de sonografía, angiotomografía (AT) o angiorresonancia (AR) compatibles.
- Edad mayor a 50 años años.
- Infarto cerebral carotídeo o vertebrobasilar correspondiente con el territorio de la arteria con afectación aterosclerótica.
- Sin evidencia de alteraciones vasculares sugestivas de otras etiologías, tales como cardioembolismo, enfermedad de pequeño vaso, arteriopatía no aterosclerótica o vasculitis.
- Deben ser hijos de mexicanos y sus cuatro abuelos deben también haber nacido en México.

Criterios de exclusión.

- Imposibilidad de obtener datos completos del expediente clínico.
- Ausencia de estudios diagnósticos confirmatorios de aterosclerosis en circulación cerebral.
- Que cumpla criterios A0 de la clasificación de ASCOD.

CONTROLES

Se reclutarán prospectivamente 100 controles sanos, un control por caso, pareado para edad y género.

Pueden ser:

- Familiares no consanguíneos de los casos o amigos de estos.
- Deben ser hijos de mexicanos y sus cuatro abuelos deben también haber nacido en México.
- No tener historia de haber tenido episodios compatibles con isquemia cerebral transitoria o infarto cerebral previo.
- Pueden tener factores de riesgo vascular clásicos: DM, HTA, dislipidemia, obesidad.

Criterios de inclusión.

- Individuos sin historia de EVC previo de acuerdo al cuestionario para evaluación de pacientes libres de EVC el cual se muestra en el APENDICE 4 (16).

Criterios de exclusión.

- Pacientes con datos clínicos sugestivos de haber sufrido isquemia cerebral transitoria o EVC formal de acuerdo al cuestionario para evaluación de pacientes libre de EVC.
- Pacientes que hayan sido sometidos a algún estudio de imágenes (RM o TAC), en donde se haya documentado isquemia cerebral como hallazgo incidental, aún si el paciente se encuentra asintomático.

IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE (polimorfismo) E670G DEL GEN PCSK9

La variante será determinada mediante la Reacción de la Cadena de la Polimerasa y fragmentos polimórficos de restricción (PCR-RFLP). Se amplificará el exón 12 del gen PCSK9 mediante PCR usando los siguientes primers: (Forward) 5'-GATGTCGGAGGGAGAAATGA-3' y (reverse) 5'-GCCCCCAGAGTGAGTGAGT-3'. Las condiciones de reacción serán las siguientes: 94°C por 3 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos y finalmente una extensión a 72°C por 5 minutos. Los fragmentos de de PCR serán digeridos con la enzima de restricción Sau961. El alelo A generará fragmentos de 287, 69, 51, 33, 30 y 18 pares de bases y el alelo G producirá fragmentos de 215, 72, 69, 51, 33, 30, 18 y 6 pares de bases. Los productos de la digestión serán separados en geles de acrilamida al 8% y se visualizaran con tinción de bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta.

Los genotipos AA, AG y GG se checaran por secuenciación directa de Sanger. (Slimani, 2014) J Mol Neurosc 2014;53:150-157

DETERMINACIÓN DE LAS VARIANTES F216L Y R46L DEL GEN PCSK9

Debido a que estos polimorfismos se encuentran muy cerca, se llevará a cabo la secuenciación del fragmento donde se localizan. Se diseñaran los primers mediante el programa informático Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi). Se realizará un gradiente de temperaturas para determinar la temperatura de alineación de los primers, una vez determinada la temperatura de alineación se estandarizaran las condiciones de la PCR. Los fragmentos de PCR se purificaran mediante columnas y se checaran en geles de agarosa al 1%. A partir de los fragmentos purificados se realizará la reacción de secuenciación con el reactivo BigDye de Applied Biosystems, las reacción de secuenciación se purificará mediante columnas de sephadex y se secuenciaran mediante la técnica de Sanger.

DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES.

Variables	Definición Operacional	Escalas	Tipo de variable
<i>Edad</i>	18-50 años	<50 años >50 años	Cualitativa nominal
<i>Genero</i>	Masculino Femenino	Dicotomica 1-hombre 2- mujer	Cualitativa nominal
<i>Infarto Cerebral Aterotrombótico:</i>	Se define como un infarto cerebral por proceso oclusivo secundario a placas de ateroma en la luz del vaso (extracraneal, intracraneal o intra/extracraneal), con oclusión in situ del mismo o migración de fragmentos del material de la placa aterosclerótica a segmentos distales, con estudios confirmatorios y criterios tipo A1 de acuerdo a la clasificación de ASCOD.	Clasificación de ASCOD 0.Ausente 1.Definitiva 2.Causa incierta 3.Causa improbable 9.Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad-	Independiente Ordinal
<i>Enfermedad intracraneana aterosclerótica sintomática</i>	se define como estenosis del vaso intracraneal (ACM, ACA y ACP) Porcentaje de estenosis del 50 al 99% secundario a una placa aterosclerótica en el vaso afectado, confirmado por estudios de doppler transcraneal, AT, AR o angiografía digital	Dicotómica 1- Positivo 2- Negativo.	Cualitativa nominal
<i>Infarto cerebral total de circulación anterior:</i>	Se refiere a un infarto que cumple con características de circulación anterior.	1.Disfunción cerebral cortical (disfasia, discalculia, trastornos visuoespaciales) 2. Déficit motor y/o sensitivo en al menos dos de las tres áreas siguientes: cara, brazo, pierna. 3.Hemianopsia homónima.	Independiente Ordinal
<i>Infarto cerebral de circulación posterior:</i>	Se refiere a un infarto que cumple con características de circulación anterior.	1.Afectación ipsilateral de pares con déficit motor y/o sensitivo contralateral. 2.Patología oculomotora;	Independiente Ordinal

		<p>3. Déficit motor y/o sensitivo bilateral</p> <p>4. Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales</p> <p>5. Hemianopsia aislada.</p>	
<i>Evento vascular cerebral recurrente:</i>	Se define en un paciente con un evento vascular cerebral previo, y que ha sido registrado con un nuevo evento vascular cerebral.	<p>Dicotómica</p> <p>1- Positivo</p> <p>2- Negativo</p>	Cualitativa nominal
Polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen PCSK9	Es la aparición de una población de dos o más formas determinadas genéticamente (alelos, variantes de secuencias) en frecuencias tales que las más raras de ellas no podría explicarse por una mutación sola.	<p>Dicotómica</p> <p>1- Positivo</p> <p>2- Negativo</p>	Cualitativa nominal

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Tiempo
Identificación de casos y reclutamiento de controles. Registro de factores de riesgo vascular, manifestaciones clínicas, resultados de estudios de gabinete y neuroimagen. Toma de muestra de sangre venosa. Análisis molecular genético.	Marzo 2015- marzo 2016.
Análisis de resultados	Marzo 2016 a agosto del 2016.
Entrega de reporte final	Noviembre del 2016

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán analizados usando software estadístico (SPSS 20.0). Se realizara la descripción de cada grupo expresando las medidas de tendencia central junto con medidas de dispersión. Para medidas con desenlaces dicotómicos y nominales (asociación del polimorfismo o mutación con la enfermedad) se usara el método del χ^2 de Pearson, y el ajuste de Fisher según sea necesario. Las variables con una distribución normal se evaluarán mediante el método de T-Student y aquellas de distribución no normal se valorarán el método de Mann-Whitney. En caso de ser necesario la comparación entre más de dos grupos se usara el método de ANOVA y de Kruskal Wallis respectivamente. Se planea realizar un modelo de regresión logística para establecer las variables que se consideren se asocian con mal pronóstico, al igual que para el ajuste de variables de confusión. También se calcularán las odds ratios (OR) de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación. Se realizará un ajuste de equilibrio genético de la muestra por medio del método de Kruskal-Wallis.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se someterá ante el comité de Ética de la Institución. A todos los participantes (casos y controles) se les pedirá consentimiento informado (ver APENDICE 1 y 2) y el registro de los pacientes se manejará con estricta confidencialidad, de acuerdo a los principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos de la Declaración de Helsinki, última reunión en Seúl Corea 2008.



**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA
MANUEL VELASCO SUÁREZ**

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

Comité de Ética en Investigación

Dra. Teresa Corona
Presidenta Ex Officio

Dr. Ricardo Colín Piana
Presidente

Dra. Helgi Jung Cook
Vicepresidente

M.en C. Adriana Ochoa
Secretaría

Miembros Honorarios:

Dr. Antonio Torres Ruiz
Dr. Fernando Zermeño Pohls
Dra. Ma. Elisa Alonso Vilatela

Vocales:

Titular
Dra. Erika Rivera Durón
Suplente
Dra. Nancy Monroy Jaramillo

Titular
Dr. Daniel San Juan Orta
Suplente
M. en C. Iván Pérez Neri

Titular
Dra. Mariana Espinola Nadurille
Suplente
Dr. Adolfo Leyva Rendón

Titular
Dra. Zoila Trujillo de los Santos
Suplente
M.E. Guadalupe Nava Galán

Titular
Mtra. Alejandra Sánchez Guzmán
Suplente
Lic. Claudia García Pastrana

Titular
Dra. Yaneth Rodríguez Agudelo
Suplente
M. en C. Mireya Chávez Oliveros

Titular
Dr. Juan Barges Coll
Suplente
Dr. Daniel Crail Melendez

Consejo Consultivo:

Dr. Tirso Zúñiga Santamaría
M. en C. T.S. Francisco Calzada Lemus
Rosario Corona Cao Romero

México, D.F., 12 de Mayo del 2015.

OFICIO N° CEI/063/15
ASUNTO: PROTOCOLO 149/14

**DR. ANTONIO ARAUZ GÓNGORA
SUBDIRECCIÓN DE NEUROLOGÍA
TUTOR DE LA INVESTIGACIÓN
INNyN MVS.
PRESENTE.**

Estimado Dr. Arauz Góngora:

Recibimos el oficio N° DIC/161/15 firmado por la Dra. Ma. Lucinda Aguirre Cruz Directora de Investigación quien nos hace saber que el Comité Científico aprobó el Protocolo de Investigación N° 149/14 Titulado: "**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS E670G, R218S Y F216L DEL GEN DE LA PROTEÍNA CONVERTASA SUBTILISINA/KEXINA 9 (PCSK9) EN POBLACIÓN MEXICANA CON INFARTO CEREBRAL ATEROTROMBÓTICO**" y solicita la aprobación del Comité de Ética en Investigación para los efectos consiguientes.

Los aspectos relacionados con el Valor Social, la Validez Científica, Relación Riesgo-Beneficio, Selección Equitativa de la Muestra y el Consentimiento Informado reúnen los requisitos indispensables para que este protocolo sea **APROBADO.**

Una observación pertinente es que la última versión de la declaración de Helsinki es la de Fortaleza, Brasil del año 2013 lo cual se le hace saber para su información.

Reciba un saludo cordial.

**DR. ANTONIO TORRES RUIZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA**

**DR. RICARDO COLÍN PIANA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN**

**M. en C. ADRIANA OCHOA MORALES
SECRETARIA**

c.p. Ma. Lucinda Aguirre Cruz.- Directora de Investigación
c.p. Dr. Amin Cervantes Arriaga.- Titular de la Unidad de Apoyo al Predictamen
c.p. Dr. Daniel San Juan Orta.- Jefe del Depto. de Investigación Clínica
c.p. Dra. Fabiola Eunice Serrano Arias.- Maestría en Ciencias Médicas
c.p. Archivo ATR/mitch.

Insurgentes Sur # 3877 Col. La Fama C.P. 14269 México, D.F. Tel. (55)56063822 ext. 5027
www.innn.salud.gob.mx



Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D. F. a 08 de Abril de 2015
OFICIO N° DIC/160/15

DR. ANTONIO ARAUZ GÓNGORA
SUBDIRECCIÓN DE NEUROLOGÍA
P R E S E N T E

La presente es para informarle que su protocolo de investigación No. 149/14 intitulado: **"ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS E670G, R218S Y F216L DEL GEN DE LA PROTEÍNA CONVERTASA SUBTILISINA/KEXINA 9 (PCSK9) EN POBLACIÓN MEXICANA CON INFARTO CEREBRAL ATEROTROMBÓTICO"**, ha sido **APROBADO** por el Comité Científico. No obstante, el desarrollo del protocolo queda sujeto a la aprobación por el Comité de Ética en Investigación.

ATENTAMENTE

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

A

C.c.p. Dr. **Daniel San Juan Orta**.- Jefe del Depto. de Investigación

Insurgentes Sur # 3877 Col. La Fama 14269 México, D.F. Tel. (55) 56063822

www.innn.salud.gob.mx

CONSIDERACIONES FINANCIERAS

Recursos con los que se cuenta: Se solicitó autorización para compra de reactivos y empleo de marcadores de ancestría por parte del grant del SPS3 de la clínica de Vascular (Dr. Antonio Arauz).

Recursos que se solicitaron: Reactivos para montar técnica para Secuenciación de los polimorfismos E670G, R46L y F216L del gen PCSK9.

RESULTADOS

Se identificaron de la base de datos de la Clínica de Enfermedad Cerebrovascular del Instituto Nacional de Neurología un total de 960 pacientes que cumplían con los criterios de Infarto Cerebral de etiología Aterotrombótica según la clasificación de ASCOD.

De estos 960 pacientes se obtuvo la muestra de 98 pacientes. El resto de pacientes se excluyó ya que habían fallecido, su ascendencia no era de población mexicana, se perdió del seguimiento por cambio de domicilio o número telefónico, o porque no acepto participar en el estudio.

Se tomo muestra de 96 controles, los cuales fueron individuos mayores de 50 años de edad sin historia de ataque isquémico transitorio o infarto cerebral, según el Cuestionario para Evaluación de Pacientes libres de EVC publicado por Meschia, J y cols. Se obtuvo la muestra de pacientes que firmaron el consentimiento informado y que acudían a citas de control en el Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca y del Instituto Oftalmológico Conde de Valenciana.

Las características demográficas de los casos y de los controles se exponen a continuación.

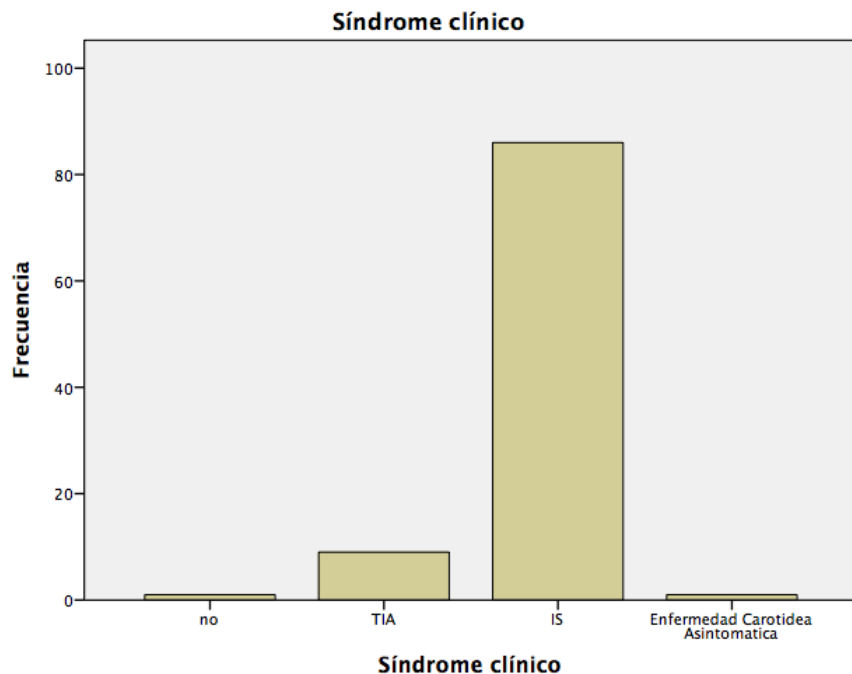
La edad media de los casos fue de 61 años (DE 9.3) y de los controles fue de 68.1 (DE 10.4). De los controles el 59.4 % fueron mujeres y de los casos el 31.6%.

De los antecedentes familiares de importancia se encontró que el 16.7% de los controles y el 29.6% de los casos tenían un familiar con EVC isquémico. Antecedente familiar de dislipidemia en 28% de los controles. Antecedente de cardiopatía isquémica en 29.2% de los controles y 26.5% de los casos.

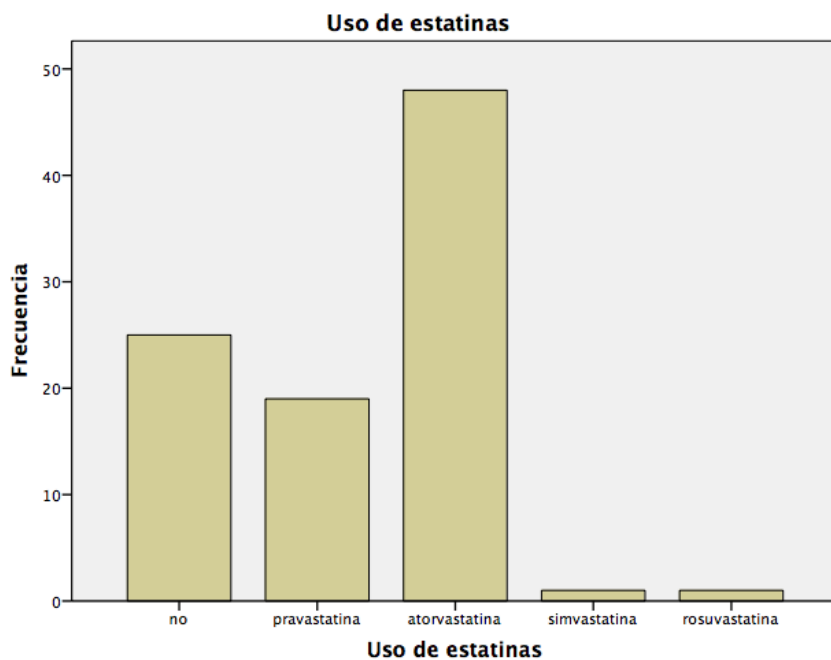
Dentro de los factores de riesgo cardiovasculares la hipertensión se presentó en 77.6% % de los casos y 57.3% de los controles, diabetes mellitus en 44.9% de los casos y 32.3% de los controles. Tabaquismo activo en 36.7% de los casos y 17.7% de los controles. Antecedente de consumo de tabaquismo en 49% de los casos y 27.1% de los controles. Hipertrigliceridemia en 46.9% de casos y 7.3% controles. Hipercolesterolemia en 62.2% de casos y 42.7% controles. Cardiopatía isquémica en 13.3% casos y 4.2% controles.

De los casos el 82.7% no ha tenido recurrencia e EVC, el 10.2% con recurrencia en una ocasión y el 6.1% con mas de dos recurrencias.

En la grafica 1 se ilustra el síndrome clínico que presentaron los casos como ntecedente. En la grafica 2 se resumen el tipo de estatinas que reciben los pacientes.



Grafica 1. TIA= Ataque isquémico transitorio. IS= Infarto cerebral.



Grafica 2. Tipo de estatinas empleadas.

Se realizó prueba de Chi cuadrada para valorar la asociación entre la presencia de EVC isquémico y los factores de riesgo de hipertensión, Diabetes Mellitus, Cardiopatía isquémica, Tabaquismo e Hipercolesterolemia (Graficas 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente). La estimación de riesgos de los diversos factores se resume en la Tabla 1.

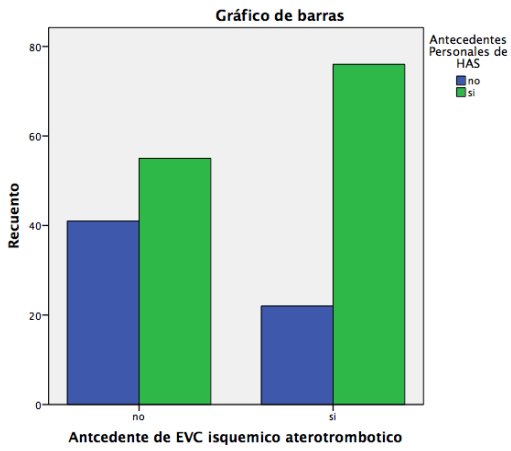


Grafico 3

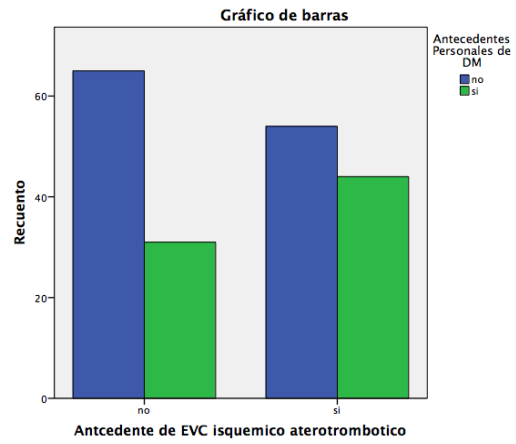


Grafico 4

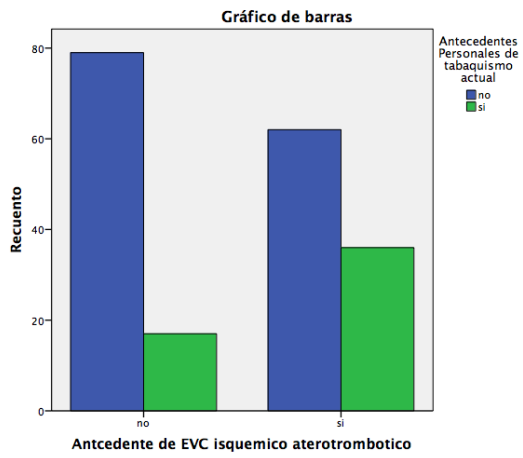


Grafico 5

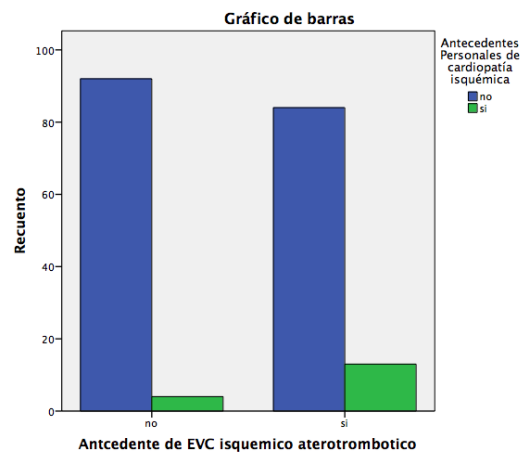


Grafico 6

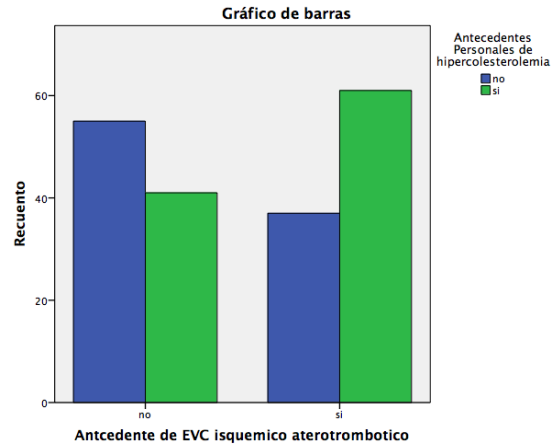


Gráfico 7

Tabla 1. Estimación de Riesgos

Factor de riesgo	OR	Intervalo de Confianza
Hipertensión arterial	2.6	1.3 - 4.8
Diabetes Mellitus	1.7	0.9 - 3.0
Tabaquismo	2.7	1.3 - 5.2
Cardiopatía Isquémica	3.6	1.1 - 11.3
Hipercolesterolemia	2.2	1.2 - 3.9

DISCUSION

La aterosclerosis es una de las causas principales de EVC isquémico. Tras el estudio y caracterización de la Proteína Convertasa Subtililina/Kexin 9, su papel se ha asociado a la aterosclerosis y con enfermedades como Cardiopatía Isquémica, demostrado en el estudio Lipoprotein Coronary Atherosclerosis Study (LCAS). Esto debido a que la PCSK9 regula las concentraciones del receptor de LDL en el hígado, cuando se encuentra activa disminuye los receptores de LDL hepáticos con un aumento posterior en los niveles plasmáticos de LDL. Mutaciones en esta proteína han sido relacionados con hipocolesterolemia e hipercolesterolemia debido a pérdida o ganancia de función respectivamente.

La hipótesis es que la presencia de los polimorfismos de ganancia de función de la PCSK9 propician el desarrollo de aterosclerosis de grandes vasos que irrigan al encéfalo produciendo el desarrollo de enfermedad cerebrovascular isquémica.

La media de edad de edad de 61 años similar a la reportada en la literatura. (Abboud et al., 2007).

Valoramos los diferentes factores de riesgo para enfermedad cardiovascular y cerebrovascular mas comunes, encontrando que todos aumentan el riesgo de EVC isquémico a excepción de la Diabetes Mellitus, similar al estudio realizado por Abboud y cols.

Aun la influencia de los polimorfismos en nuestra población esta por definirse, sin embargo se ha descrito que la presencia del polimorfismo E670G se asocia a un aumento del riesgo de infarto cerebral aterotrombotico, sin embargo esta pendeinte la descripción de este polimorfismo de los polimorfismos R46L y F216L en población mexicana.

El conocer la influencia de estos polimorfismos, nos ayudara a guiar el tratamiento que logre controlar los niveles de LDL y así reducir el riesgo de Infarto cerebral aterotrombótico.

REFERENCIAS.

- 1) Slimani, A; Harira, Y; Trabelsi, I, Jomaa, W; Maatouk, F y cols. Effect of E670G Polymorphism in PCSK9 Gene on the Risk and Severity of Coronary

- Heart Disease and Ischemic Stroke in a Tunisian Cohort. *J Mol Neurosci* (2014) 53:150–157
- 2) Abboud S, Karhunen PJ, Lutjohann D, Goebeler S, Luoto T, y cols. (2007) Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Gene Is a Risk Factor of Large-Vessel Atherosclerosis Stroke. *PLoS ONE* 2(10): e1043. doi:10.1371/journal.pone.0001043
 - 3) Allard, D; Amsellem, S; Abifadel, M; Trillard, M; Devillers, M y cols. Novel Mutations of the *PCSK9* Gene Cause Variable Phenotype of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *HUMAN MUTATION Mutation in Brief #854* (2005) Online.
 - 4) Abifadel, M; Varret, M; Rabes, J-P; Allard, D; Ouguerram, K; Devillers, M y cols. Mutations in *PCSK9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature genetics*. Volume 34, number 2, june 2003
 - 5) Poirier, S y Mayer, G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Design, Development and Therapy* 2013;7 1135–1148.
 - 6) Horton, J; Cohen, J y Hobbs, H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.32 No.2, pag 71-77.
 - 7) Poirier, S y Mayer, G. The biology of PCSK9 from the endoplasmic reticulum to lysosomes: new and emerging therapeutics to control low-density lipoprotein cholesterol. *Drug Design, Development and Therapy* 2013;7 1135–1148
 - 8) Benn, M; Nordestgaard, B; Grande, P, Schnohr, P y Tybjaerg-Hansen, A. PCSK9 R46L, Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels, and Risk of Ischemic Heart Disease. 3 Independent Studies and Meta-Analyses. *Journal of the American College of Cardiology*. Vol. 55, No. 25, 2010.
 - 9) Stawowy, P; Just, I y Kaschina, E. Inhibition of PCSK9: a novel approach for the treatment of dyslipidemia. *Coronary Artery Disease* 2014, 25:353–359.
 - 10) Cariou, B; Le May, C y Costet, P. Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis* 216 (2011) 258–265.
 - 11) Stein, E. Low-density lipoprotein cholesterol reduction by inhibition of PCSK9. *Curr Opin Lipidol* 2013, 24:510–517.
 - 12) Stein, E y Raal, F. New Therapies for Reducing Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *Endocrinol Metab Clin N Am* 43 (2014) 1007–1033.
 - 13) Cui, C-J; Li, S y Li, J-J. PCSK9 and its modulation. *Clinica Chimica Acta* 440 (2015) 79–86.
 - 14) Gouni-Berthold, I y Berthold, H. PCSK9 Antibodies for the Treatment of Hypercholesterolemia. *Nutrients* 2014, 6, 5517-5533.

- 15) Norata GD; Tibolla, G y Catapano, AL. PCSK9 inhibition for the treatment of hypercholesterolemia: Promises and emerging challenges, *Vascul. Pharmacol.* (2014).
 - 16) Meschia, JF, Brott, TG; Chukwudelunzu, FE; Hardy, J; Brown RD Jr y cols. Verifying the Stroke-Free Phenotype by Structured Telephone Interview *Stroke* 2000; 31, pag 1076-1080.
-



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C. P. 14269
México, D.F., Tel. 56-06-14-07
<http://www.innn.salud.gob.mx>

El protocolo titulado **“DESCRIPCION DE LOS POLIMORFISMOS E67OG, R46L Y F216L DEL GEN DE LA PROTEÍNA CONVERTASA SUBTILISINA/KEXINA 9 (PCSK9) EN POBLACION MEXICANA CON INFARTO CEREBRAL ATERTROMBÓTICO**

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CASOS

He sido informado(a) que he sufrido un Infarto Cerebral Aterotrombótico y que en el departamento de Clínica de Vascular se está realizando un estudio para conocer la prevalencia de polimorfismos de un gen conocido como proteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9), que podría estar asociado como a mi enfermedad.

Los genes son las unidades de herencia y contienen el ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material hereditario. En este estudio se investigarán partes de un gen que han sido relacionados a un mayor riesgo de presentar un acumulación de placas de grasa en las arterias (ateroesclerosis), como es el gen PCSK9

Este gen tienen funciones específicas en nuestro organismo, normalmente tienen variantes y algunas de ellas se han asociado a mayor riesgo de formar placas ateroscleróticas en las arterias del corazón y cerebro.

Si aceptó participar en el estudio, los médicos me realizarán algunas preguntas acerca de mi enfermedad, me elaborarán una historia familiar y me tomarán 20 ml de sangre periférica.

He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción (para la toma de la sangre).

Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad. La información obtenida será usada para fines única y exclusivamente académicos.

He sido informado(a) que mi participación es VOLUNTARIA y no tiene costo para mí, ni recibiré remuneración alguna.

Si no acepto, esto no afectará de ninguna forma mi atención médica como paciente del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.

Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para explicarme información suplementaria de utilidad para mí y mi familia.

Para cualquier duda o aclaración puedo dirigirme al departamento de enfermedad vascular cerebral este Instituto o hablar al teléfono 56063822 extensión 4466 con el Dr Antonio Arauz o con el presidente del comité de bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: Dr Antonio Torres Ruiz al teléfono 56063822 extensión 5027.

Este protocolo sigue los lineamientos de la declaración de Helsinki, última reunión Seúl Corea, 2008. Además se adhiere a los preceptos enunciados en la Conferencia Internacional de Armonización.

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre del participante y/o responsable legal: _____

Firma: _____ Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: _____

Firma: _____ Fecha _____

APÉDICE 2: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

Insurgentes Sur 3877
Col. La Fama, C. P. 14269
México, D.F., Tel. 56-06-14-07
<http://www.innn.salud.gob.mx>

El protocolo titulado “**DESCRIPCION DE LOS POLIMORFISMOS E67OG, R46L Y F216L DEL GEN DE LA PROTEÍNA CONVERTASA SUBTILISINA/KEXINA 9 (PCSK9) EN POBLACION MEXICANA CON INFARTO CEREBRAL ATERTROMBÓTICO**”

FORMA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO CONTROLES

He sido informado(a) que el departamento de Clínica de Vascular se está realizando un estudio para conocer la prevalencia de polimorfismos de un gen conocido como proteína convertasa subtilisina/kexina 9 (PCSK9), que podría estar asociado a infartos cerebrales

Un infarto cerebral se define como la oclusión del flujo sanguíneo en una arteria que lleva sangre a alguna región del cerebro

Los genes son las unidades de herencia y contienen el ácido desoxirribonucleico (ADN) que es el material hereditario. En este estudio se investigarán partes de un gen que han sido relacionados a un mayor riesgo de presentar un acumulación de placas de grasa en las arterias (ateroesclerosis), como es el gen PCSK9

Este gen tienen funciones específicas en nuestro organismo, normalmente tienen variantes y algunas de ellas se han asociado a mayor riesgo de formar placas ateroscleróticas en las arterias del corazón y cerebro.

Si aceptó participar en el estudio, los médicos me realizarán algunas preguntas acerca de mi enfermedad, me elaborarán una historia familiar y me tomarán 20 ml de sangre periférica.

He sido informado(a) que puedo sufrir enrojecimiento o ardor en la zona de punción (para la toma de la sangre).

Toda la información obtenida será confidencial y estará disponible solo para los investigadores. Mi muestra será codificada con una combinación de letras y números para proteger mi identidad. La información obtenida será usada para fines única y exclusivamente académicos.

He sido informado(a) que mi participación es VOLUNTARIA y no tiene costo para mí, ni recibiré remuneración alguna.

Los resultados de los estudios que se realicen a mi muestra no me serán entregados, a menos que se encuentre información relevante para mi salud o la de mis familiares. En dicho caso seré contactado por los investigadores para explicarme información suplementaria de utilidad para mí y mi familia.

Para cualquier duda o aclaración puedo dirigirme al departamento de enfermedad vascular cerebral este Instituto o hablar al teléfono 56063822 extensión 4466 con el Dr Antonio Arauz o la Dra. Eunice Fabiola Serrano Arias, o con el presidente del comité de bioética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía: Dr Antonio Torres Ruiz al teléfono 56063822 extensión 5027.

Este protocolo sigue los lineamientos de la declaración de Helsinki, última reunión Seúl Corea, 2008. Además se adhiere a los preceptos enunciados en la Conferencia Internacional de Armonización.

AL FIRMAR ESTA FORMA, ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN LA INVESTIGACIÓN DESCRITA.

Nombre del participante y/o responsable legal: _____

Firma: _____ Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del testigo 2: _____

Firma: _____ Parentesco: _____

Nombre del investigador que obtuvo el consentimiento: _____

Firma: _____ Fecha _____

APENDICE 3. CLASIFICACION DE ASCOD

Mecanismo de Enfermedad Vascular Cerebral	Nivel de confianza
A..Aterosclerosis de grandes vasos	0 Enfermedad ausente 1 Definitiva causa potencial de infarto 2 Causa incierta 3 Causa improbable 9 Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad
S. Small vessel disease (pequeño vaso)	0 Enfermedad ausente 1 Definitiva causa potencial de infarto 2 Causa incierta 3 Causa improbable 9 Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad
C. Cardiac embolism (embolismo cardiaco)	0 Enfermedad ausente 1 Definitiva causa potencial de infarto 2 Causa incierta 3 Causa improbable 9 Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad
O. Otras causas no comunes	0 Enfermedad ausente 1 Definitiva causa potencial de infarto 2 Causa incierta 3 Causa improbable 9 Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad
D. Disección	0 Enfermedad ausente 1 Definitiva causa potencial de infarto 2 Causa incierta 3 Causa improbable 9 Insuficiente evidencia para graduar la enfermedad

P. Amarenco, J. Bogousslavsky, L.R. Caplan, G.A. Donnan, M.E. Wolf, M.G. Hennerici. The ASCOD Phenotyping of Ischemic Stroke (Updated ASCO Phenotyping). Cerebrovasc Dis 2013;36:1--5

APENDICE 4. CUESTIONARIO PARA EVALUACIÓN DE PACIENTES LIBRES DE EVC

CUESTIONARIO PARA EVALUACIÓN DE PACIENTES LIBRES DE EVC	
Numero	Pregunta
1	¿Alguna vez le dijo algún médico que tuvo un accidente cerebrovascular (infarto cerebral)?
2	¿Alguna vez le dijo algún médico que tuvo un ataque isquémico transitorio o mini infarto?
3	¿Alguna vez ha tenido debilidad repentina en un lado de su cuerpo?
4	¿Alguna vez ha tenido entumecimiento o pérdida de la sensibilidad en un lado de su cuerpo?
5	¿Alguna vez ha tenido perdida repentina de la visión en uno o ambos ojos?
6	¿Alguna vez ha tenido perdida repentina de la visión en la mitad del campo visual?
7	¿Alguna vez ha perdido la capacidad de comprender lo que la gente le dice?
8	¿Alguna vez ha perdido la capacidad de expresarse verbalmente o por escrito?

Meschia, J y cols. Verifying the Stroke-Free Phenotype by Structured Telephone Interview Stroke 2000: 31, pag 1076-1080