

**POLIMORFISMOS DEL GEN *LIPOPROTEÍNA LIPASA* COMO MARCADORES
GENÉTICOS PARA EL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR EN UNA
MUESTRA DE POBLACIÓN COLOMBIANA**

LEYDI CAROLINA VELÁSQUEZ PEREIRA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA
2015**

**POLIMORFISMOS DEL GEN *LIPOPROTEÍNA LIPASA* COMO MARCADORES
GENÉTICOS PARA EL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR EN UNA
MUESTRA DE POBLACIÓN COLOMBIANA**

LEYDI CAROLINA VELÁSQUEZ PEREIRA
Código 2127907

**Trabajo de investigación para optar por el título de Magister en Ciencias
Básicas Biomédicas**

Director
MD, MSc CLARA INES VARGAS CASTELLANOS

GRUPO DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA UIS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
BUCARAMANGA
2015**

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a Dios por darme vida y salud para desarrollar el proyecto.

A mis padres por su apoyo incondicional, consejos, cariño y comprensión. Por su esfuerzo y dedicación como padres han permitido mi desarrollo como persona y profesional, para lograr cada una de las metas que me propongo.

Agradecimientos

A Dios por darme vida y salud para llevar a cabo el proyecto.

A mis padres por su apoyo incondicional.

Agradezco la colaboración y apoyo del grupo de investigación de Genética Humana de la Universidad Industrial de Santander:

Clara Inés Vargas; Directora del laboratorio por su apoyo, dirección, asesoría, acompañamiento, paciencia, disposición y enseñanzas durante todo el proyecto.

Adriana Castillo; Por sus enseñanzas durante pre y posgrado.

Adriana Gil y Adriana Pico; peritos, por su asesoría, acompañamiento y soporte en el desarrollo de la parte experimental.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	21
1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. OBJETIVOS	25
4.1. OBJETIVO GENERAL	25
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MARCO TEÓRICO	26
5.1. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR	26
5.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR	28
5.3. METABOLISMO DE LÍPIDOS	30
5.4. LIPOPROTEÍNA LIPASA	32
5.5. GENÉTICA DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR	33
5.6. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA	34
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
6. ASPECTOS METODOLÓGICOS	38
7.1. TIPO DE ESTUDIO	38
7.2. ÁREA DE ESTUDIO	38
7.3. MUESTRAS	38
7.3.1. <i>Criterios de inclusión</i>	39
7.3.2. <i>Criterios de exclusión</i>	39
7.4. VARIABLES DE ESTUDIO	39
7.5. GENOTIPIFICACIÓN	40
7.5.1. <i>Extracción de ADN</i>	41
7.5.2. <i>Métodos moleculares</i>	43
7.5.3. <i>Amplificación del ADN genómico</i>	45
7.5.4. <i>Digestión y electroforesis</i>	47
7.5.5. <i>Secuenciación</i>	48
7.6. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS	51
7.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
7.7.1. <i>Cálculo de tamaño efectivo de la población</i>	51
7.7.2. <i>Caracterización sociodemográfica</i>	51
7.7.3. <i>Análisis descriptivo de los polimorfismos</i>	52
7.7.4. <i>Análisis descriptivo de haplotipos</i>	52
7.7.5. <i>Test de equilibrio de Hardy Weinberg</i>	52
7.7.6. <i>Estructura genética</i>	52
7.7.7. <i>Análisis de asociación de polimorfismos con el ACV</i>	53
7.7.8. <i>Test de desequilibrio de ligamiento</i>	54

7.7.9. <i>Análisis de asociación de los haplotipos con la enfermedad</i>	54
7.8. ASPECTOS ÉTICOS.....	54
7.9. CONTROL DE CALIDAD.....	55
7. RESULTADOS	56
8.1. TAMAÑO DE MUESTRA.....	56
8.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN	57
8.3. RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN.....	58
8.3.1. <i>Electroforesis en agarosa</i>	58
8.3.2. <i>Secuenciación</i>	60
8.4 ANÁLISIS POBLACIONAL	62
8.4.1. <i>Frecuencias genotípicas y alélicas</i>	62
8.4.2. <i>Frecuencias haplotípicas</i>	63
8.4.3. <i>Test de equilibrio de Hardy Weinberg</i>	63
8.4.4. <i>Estructura genética</i>	64
8.4.5. <i>Análisis de asociación entre polimorfismos y ACV</i>	64
8.4.6. <i>Análisis de asociación de los haplotipos con ACV</i>	65
8.4.7. <i>Desequilibrio de ligamiento</i>	65
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
9. CONCLUSIONES	72
10. RECOMENDACIONES.....	73
11. DIVULGACIÓN.....	74
BIBLIOGRAFÍA	75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Composición de las lipoproteínas	30
Tabla 2 Genes asociados con ACV	34
Tabla 3 Variables de estudio	39
Tabla 4 Reacción de amplificación	45
Tabla 5 Reacción de digestión Ser447X (rs328), HindIII (rs320) y PvuII (rs285).....	47
Tabla 6 Cebadores para PCR para los tres polimorfismos estudiados, enzimas de digestión y fragmentos resultantes.....	48
Tabla 7 Identificación de dNTP en secuenciación	49
Tabla 8 Cálculo del tamaño de muestra	57
Tabla 9 Cálculo de poder de tamaño de muestra	57
Tabla 10 Característica sociodemográficas y bioquímicas	58
Tabla 11 Frecuencia genotípica y alélica para polimorfismos HindIII, PvuII y Ser447X	63
Tabla 12 Posibles haplotipos y su frecuencia	63
Tabla 13 Equilibrio de Hardy Weinberg	64
Tabla 14 Análisis de asociación para cada modelo de herencia.....	64
Tabla 15 Asociación haplotípica ajustada por edad y género.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de metabolismo de lipoproteínas.....	32
Figura 2. Localización del gen LPL en el cromosoma 8.....	33
Figura 3. Gen LPL.....	33
Figura 4. Protocolo de PCR.....	42
Figura 5. Protocolo de Termociclador para Ser447X (rs328).....	45
Figura 6. Protocolo de Termociclador para HindIII (rs320).....	46
Figura 7. Protocolo de Termociclador para PvuII (rs285).....	46
Figura 8. Protocolo de Secuenciación.....	50
Figura 9. RFLP para HindIII (rs320).....	59
Figura 10. RFLP para PvuII (rs285).....	59
Figura 11. RFLP para Ser447X (rs328).....	60
Figura 12. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo HindIII (rs320) del gen LPL ...	61
Figura 13. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo PvuII (rs285) del gen LPL	61
Figura 14. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo Ser447X (rs328) del gen LPL.	62

GLOSARIO DE SIGLAS

A: Nucleótido Adenina

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Acido desoxirribonucleico

ApoCII: Apolipoproteína C-II

ARN: Ácido ribonucleico

ASA: Ácido acetilsalicílico

bp: pares de base

C: Nucleótido Citosina

CAD: Enfermedad coronaria arterial

Cm: Centímetro

CRF: Formato de reporte de caso

dL: Decilitros

FCV: Fundación Cardiovascular

FRECVI: Prevalencia de Factores de Riesgo para Enfermedad Cerebrovascular Isquémica

G: Nucleótido Guanina

Gly: Aminoácido Glicina

HDL: Lipoproteína de alta densidad

HindIII: Enzima de restricción tipo III extraída de la bacteria *Haemophilus influenzae*

HTA: Hipertensión arterial

HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg

Kb: Kilobases

Kg: Kilogramos

LD: Desequilibrio de ligamiento

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPL: lipoproteína lipasa

Mg: miligramos

MmHg: milímetros de mercurio

MnII: Enzima de restricción tipo I extraída de la bacteria *Moraxella nonliquefaciens*

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Razón de momios

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: Reacción en cadena de la polimerasa-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

PvuII: Enzima de restricción tipo II extraída de la bacteria *Proteus vulgaris*

Ser: Aminoácido Serina

SNP: Polimorfismos de nucleótido simple

T: Nucleótido Timina

T°C/H: Temperatura en Centígrados por hora

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TG: Triglicéridos

U: Unidad de actividad enzimática

uL: Microlitros

umol: Micromoles

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

GLOSARIO

ACCIDENTE CEREBROVASCULAR: Grupo de afecciones caracterizadas por una pérdida súbita y sin convulsiones de la función neurológica debido a isquemia encefálica o hemorragias intracraneales. El accidente cerebrovascular se clasifica según el tipo de necrosis tisular, localización anatómica, vasculatura afectada, etiología, edad del individuo afectado y naturaleza hemorrágica o no hemorrágica.

ACCIDENTE CEREBROVASCULAR ISQUÉMICO AGUDO NO CARDIOEMBÓLICO: Se produce como consecuencia de la oclusión de una arteria cerebral por un trombo que proviene del corazón.

ALELO: Una de las dos formas alternativas de un gen en un locus dado. Dependiendo de la tecnología de genotipificación utilizada puede ser que no todas las variantes en secuencias de ADN sean reconocidas como alelos diferentes

ARTEROESCLEROSIS: Engrosamiento y pérdida de elasticidad de las paredes de las arterias que ocurre con la formación de placas ateroscleróticas en la íntima arterial.

ATEROGÉNICO: Conjunto de alteraciones que permiten la aparición en la pared de las arterias de un depósito de lípidos, que finalmente se transformara en una placa de calcificación y facilitara la perdida de elasticidad arterial y otros trastornos vasculares

CEBADOR: Secuencias cortas de ADN (generalmente alrededor de 10 pares de bases) que son complementarias a las secuencias de ARN mensajero y que permiten que la transcriptasa inversa comience a copiar las secuencias adyacentes del mRNA.

CODON: Conjunto de tres nucleótidos en la secuencia de ADN que codifica una proteína que especifica a un aminoácido individual o que da la señal de terminación.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO: Asociación no aleatoria de genes ligados. Es la tendencia de los alelos de dos loci separados, pero ligados, de encontrarse juntos con más frecuencia de lo que podría esperarse únicamente por la casualidad.

DIABETES: Condición caracterizada por hiperglicemia resultado de la incapacidad del cuerpo para usar el azúcar en la sangre para obtener energía. En la diabetes tipo 1, el páncreas no es capaz de producir insulina y por tanto el azúcar en la sangre no puede entrar en las células para ser usado como fuente de energía. En la diabetes tipo 2 el páncreas no es capaz de producir suficiente insulina o el cuerpo no es capaz de usar la insulina correctamente.

ENDONUCLEASA: Enzima aislada de bacteria que corta moléculas de ADN en secuencias específicas.

EQUILIBRIO DE HARDY WEIBERG (HWE): Explica como las frecuencias alélicas en una generación se pueden usar para calcular las proporciones genotípicas de la siguiente generación de una población que se aparea aleatoriamente en donde no hay selección, mutación o migración.

ESTUDIO ANALITICO: Tipo de estudio usado para probar una hipótesis de asociación entre una exposición y afectos adversos de la salud. En ellos se incluyen los estudios de casos y controles y estudios de cohorte.

ESTUDIO OBSERVACIONAL: Estudio en donde los individuos son observados o ciertos resultados se miden. No se hace ningún intento de influir en el resultado.

EXON: Es una porción del gen que codifica para aminoácidos. Las partes de secuencias genéticas que son expresadas en proteínas.

FACTOR DE PROTECCION: Característica que está asociada a una menor probabilidad que aparezca la enfermedad.

FACTOR DE RIESGO: Aspecto del comportamiento o estilo de vida, exposición ambiental, característica heredada o innata que está asociada con el aumento de la incidencia de una enfermedad u otro evento o condición relacionado con la salud.

GEN: Una categoría de secuencias de ácidos nucleicos que funciona como unidades de la herencia y que codifican las instrucciones básicas para el desarrollo, reproducción y mantenimiento de los organismos.

GENOTIPIFICACION: Método usado para determinar alelos o SNPs de individuos.

HAPLOTIPO: Constitución genética de los individuos con respecto a un miembro de un par de genes alélicos, o conjuntos de genes que están estrechamente relacionados y tienden a ser heredados juntos.

INTRON: Porción de un gen que no codifica para aminoácidos, parte de una secuencia génica que no se expresa en proteínas

LIPOPROTEINAS: Complejo lípido-proteína involucrado en el transporte metabolismo de lípidos en el cuerpo. Ellos son partículas esféricas consistentes en un núcleo central hidrofóbico de triglicéridos y esterios de colesterol, fosfolípidos y apolipoproteínas.

LIPOPROTEINA HDL: Clase de lipoproteínas que suele dividirse en HDL2 y HDL3 y en la variante menor HDL1. La HDL estimula el transporte de colesterol desde el tejido extrahepático al hígado para su excreción en la bilis. Es sintetizada por el hígado en forma de partículas "HDL nacientes" discoidales que carecen de núcleo central lipídico, acumulan un núcleo central de ésteres de colesterol durante el transporte inverso de colesterol y los transfieren al hígado directa o indirectamente por medio de otras lipoproteínas. La HDL vehicula apolipoproteínas C-II y E hacia y desde las lipoproteínas ricas en triglicéridos durante el catabolismo de las lipoproteínas. El colesterol HDL del suero se ha correlacionado negativamente con la enfermedad cardíaca coronaria prematura

LIPOPROTEINA LDL: Clase de lipoproteínas responsable del transporte de colesterol a los tejidos extrahepáticos. Se forma en la circulación cuando las proteínas de muy baja densidad son degradadas inicialmente a lipoproteínas de densidad intermedia y después a LDL por la ganancia y la pérdida de apolipoproteínas específicas y la pérdida de la mayor parte de sus triglicéridos. Es captada y metabolizada por el hígado y por los tejidos extrahepáticos mediante endocitosis específica mediada por receptor.

LIPOPROTEINA VLDL: Clase de lipoproteínas que transporta triglicéridos desde el intestino y el hígado a los tejidos adiposo y muscular. Sintetizada por el hígado, contiene principalmente triglicéridos en sus núcleos centrales lipídicos, con algunos ésteres del colesterol; cuando sus triglicéridos son escindidos por la lipoproteína lipasa endotelial y transferidos a los tejidos extrahepáticos, las partículas de la VLDL pierden la mayor parte de su apolipoproteína C y se convierten en lipoproteínas de densidad intermedia.

LIPOPROTEINLIPASA: Enzima de la clase hidrolasa que cataliza la escisión hidrolítica de los grupos acilos de ácidos grasos a partir de triglicéridos (o di- o monoglicéridos) en los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad y las lipoproteínas de baja densidad. Está presente en las superficies endoteliales capilares, especialmente en el tejido mamario, muscular y adiposo, y requiere apolipoproteína CII como cofactor.

MUTACION: Cambio en la secuencia de ADN. Las mutaciones pueden ser producto de errores en el proceso de transcripción durante la división celular, exposición a radiación ionizante, exposición a mutágenos o infección por virus. Mutaciones en la línea germinal suceden en los óvulos o espermatozoides y pueden pasar a la descendencia, mientras que las mutaciones somáticas ocurren en las células del cuerpo y no son pasadas a la siguiente generación.

OLIGONUCLEOTIDO: Polímero constituido por pocos nucleótidos (de 2 a 20).

POLIMORFISMO: Aparición regular y simultánea de dos o más genotipos discontinuos en una sola población de entrecruzamiento. El concepto incluye diferencias en los genotipos que oscilan desde un único sitio nucleotídico (polimorfismo de nucleótido simple) hasta grandes secuencias de nucleótidos visibles a nivel cromosómico. Se dice que un locus es polimórfico solo si ningún alelo tiene una frecuencia mayor a 99%.

POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP): Un polimorfismo identificado por diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción. Puede ser debido a polimorfismos en los sitios de restricción propios, o variaciones en la longitud de una secuencia entre los sitios.

POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO SIMPLE (SNP): Variación de un único nucleótido en una secuencia genética que aparece con apreciable frecuencia en la población.

QUILOMICRONES: Una clase de lipoproteínas que transportan el colesterol y los triglicéridos alimentarios del intestino delgado a los tejidos.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA: Método in vitro para producir grandes cantidades de fragmentos específicos de ADN o ARN de longitud y secuencia definidas a partir de pequeñas cantidades de cortas secuencias flanqueadoras oligonucleótidas (cebadores). Los pasos esenciales incluyen desnaturalización termal de las moléculas diana de doble cadena, reasociación de los cebadores con sus secuencias complementarias, y extensión de los cebadores reasociados mediante síntesis enzimática con ADN polimerasa. La reacción es eficiente, específica y extremadamente sensible. Entre los usos de la reacción está el diagnóstico de enfermedades, detección de patógenos difíciles de aislar, análisis de mutaciones, pruebas genéticas, secuenciación del ADN y el análisis de relaciones evolutivas.

TRANSICION: Tipo de sustitución de un par de nucleótidos en el que una purina se reemplaza por otra purina o una pirimidina a otra pirimidina. Por ejemplo GC->AT

TRANSVERSION: Tipo de sustitución de un par de nucleótidos en el que una purina reemplaza a una pirimidina o viceversa. Por ejemplo, GC->TA.

RESUMEN

Título: Polimorfismos del gen *lipoproteína lipasa* como marcadores genéticos para el accidente cerebrovascular en una muestra de población colombiana*

Autor: Velásquez, LC**

Palabras clave: Accidente cerebrovascular (ACV), Lipoproteína lipasa (LPL), Polimorfismos de nucleótido simple (SNP), HindIII, PvuII, Ser447X, PCR-RFLP, Población Colombiana

Descripción: Recientemente se han investigado los genes como marcadores de exposición para el desarrollo del ACV. Polimorfismos en el gen LPL han sido estudiados en diferentes poblaciones encontrándose variaciones de acuerdo a la población analizada; los polimorfismos HindIII y PvuII actúan como marcadores de riesgo para el desarrollo del ACV al aumentar los niveles de triglicéridos y disminuir la HDL; además Ser447X se ha visto que puede actuar como marcador de protección aumentando los niveles de HDL y disminuyendo los triglicéridos. El objetivo del trabajo fue determinar si existe asociación entre la presencia de polimorfismos en el gen *LPL* (HindIII, PvuII y Ser447X) con desarrollo de ACV en una muestra poblacional Colombiana. Se estudiaron 133 pacientes con accidente cerebrovascular (diagnóstico clínico y soporte TAC) y 269 sujetos sanos. Se utilizó la técnica PCR-RFLP para detectar los polimorfismos Ser447X, HindIII y PvuII en el gen *LPL*. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Stata12, SPSS9, snpstats y Arlequin. El comité de ética de la Universidad Industrial de Santander aprobó el presente estudio. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles. En el presente estudio no se encontró asociación entre HindIII, PvuII y Ser447X con el ACV en la muestra poblacional analizada. Se concluye que los polimorfismos en el gen de la LPL no actúan como marcadores genéticos asociados con el desarrollo del ACV en la muestra poblacional colombiana analizada.

* Trabajo de investigación

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Clara Ines Vargas Castellanos

ABSTRACT

Title: Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene as genetic markers for stroke in Colombian population.*

Author: Velásquez, LC**

Keywords: Stroke, Lipoprotein lipase (LPL), Single nucleotide polymorphisms (SNP), HindIII, PvuII, Ser447X, PCR-RFLP, Colombian population.

Recently, scientists are redirecting their researchers to find the genetic origin of diseases; stroke is part of them. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene have been extensively studied in different populations finding variations in results among and between population's societies. Showing that the HindIII and PvuII polymorphisms can act as risk markers for the development of cerebrovascular disease by increasing levels of triglycerides and decreasing HDL. However, Ser447X can be a protective marker causing an increase of HDL levels and reducing triglycerides levels. The aim of the study was to analyze if there is an association between the presence of polymorphisms in the LPL gene (HindIII, PvuII and Ser447X) with development of ischemic stroke in Colombian population. Sample size was 133 stroke patients (clinical diagnosis and x-ray CT) and 269 healthy subjects. PCR -RFLP technique was used to detect Ser447X, HindIII and PvuII polymorphisms in the LPL gene. Results were analyzed by Stata12, SPSS9, snpstats and Arlequin softwares. This study was approved by the Universidad Industrial de Santander ethics committee. Allele and genotypic frequencies of the studied polymorphisms did not show a statistically significant difference between the cases and controls. In the present research was not found any association between any of the LPL gene polymorphism and stroke in the population sample used. In conclusion, LPL gene polymorphisms are not genetic markers for the development of stroke in the Colombian sample used.

* Research work

** Health faculty. Master in Biomedical Basic Sciences. Clara Ines Vargas Castellanos

INTRODUCCIÓN

El accidente cerebrovascular isquémico (ACV) corresponde al grupo de las enfermedades cardiovasculares. Dicha enfermedad se produce por la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro por el bloqueo de un vaso sanguíneo con un coágulo que puede estar directamente en el sitio de la oclusión produciendo un daño permanente en la zona que solía ser irrigada (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011). Existen diversos factores de riesgo asociados con su desarrollo; hipertensión arterial, alteraciones en los niveles lipídicos, diabetes, tabaquismo, dieta, obesidad e inactividad física (Harmsen et al., 2009). Se estima que en el 2011 a nivel mundial murieron 6 millones de personas por esta causa (*The global burden of disease: 2004 update*, 2008.; *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, 2011.; *WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic*, 2004).

La lipoproteína lipasa es una enzima encargada de la hidrólisis de triglicéridos provenientes de quilomicrones circulantes y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), removiendo las lipoproteínas de circulación por medio de la liberación de ácidos grasos libres (Wong et al., 1994). Estudios genéticos han revelado cerca de 100 mutaciones y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en el gen de la lipoproteína lipasa (Wang et al., 2009), mostrando que alteraciones en dicha lipoproteína pueden afectar la formación de la placa ateromatosa de esta forma aumentando el riesgo de su diseminación en la sangre y producir un bloqueo. Dentro de los polimorfismos que se han estudiado se encuentran algunos que actúan como marcadores de protección o riesgo, para el primer caso; HindIII (rs320) ubicado en el intrón 8 producto de un cambio de T por G y Pvull (rs285) ubicado en el intrón 6 producto de un cambio de una C por T se han visto asociados con altos niveles de triglicéridos (TG) y bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) (Chen et al., 2008; Sepetiba et al., 2007). Por otra parte, Ser447X (rs328) en el exón 9 producto del cambio de una C por G, se ha visto que actúa como marcador de protección para desarrollar ACV al aumentar la actividad lipolítica en la proteína y ha sido asociada con altos niveles de HDL y disminución de los triglicéridos (Rip et al., 2006).

La investigación sobre estos polimorfismos se ha llevado a cabo en diferentes poblaciones encontrándose variaciones en los resultados obtenidos sobre su influencia en el control lipídico dependiente del grupo poblacional y la zona de origen de los pacientes, por lo que el análisis de los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa: Ser447X, HindIII y Pvull junto con el estudio de la distribución étnica de dichos polimorfismos en nuestra población constituye el primer estudio

latinoamericano en evaluar la influencia de los polimorfismos asociados a la LPL en pacientes con ACV isquémico. Teniendo en cuenta que la población colombiana tiene ancestría de origen europeo, africano y americano se eligieron los polimorfismos que han sido ampliamente y comúnmente estudiados en diferentes poblaciones a nivel mundial (Rojas et al., 2010). Es así como se plantea la hipótesis acerca de la posibilidad que polimorfismos presentes en el gen de la lipoproteína lipasa (HindIII, Pvull y Ser447X) actúen como marcadores de exposición para el desarrollo del accidente cerebrovascular en la población colombiana.

1. IDENTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El riesgo de la ACV tiene variaciones en su frecuencia e impacto en diferentes poblaciones, las cuales están íntimamente relacionadas con características genéticas de cada etnia (Anand SS, 2000). La población hispana, tiene características particulares y variaciones propias en los factores clásicos de riesgo cardiovascular.

Recientemente se ha descrito una estrecha relación entre polimorfismos en el gen que codifica para la lipoproteína lipasa (LPL), una enzima que juega un papel central en el metabolismo lipídico y se ha visto relacionada con el desarrollo de enfermedad aterosclerótica (Eckel, 1989; Mead et al., 2002; Murthy et al., 1996; Wong et al., 1994). Adicionalmente se ha observado una relación entre polimorfismos en esta enzima y el desarrollo del ACV, y su grado de asociación ha variado de acuerdo a la población estudiada (Hokanson, 1999; Xie et al., 2010). Por tanto la identificación de la distribución y posterior asociación de dichos polimorfismos con el desarrollo de ACV en la población Colombiana se podría convertir en una estrategia de diagnóstico temprano de susceptibilidad a desarrollar un ACV. En este estudio se han elegido polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen lipoproteína lipasa, los cuales son HindIII (rs320) ubicado en el intrón 8, Pvull (rs285) ubicado en el intrón 6 y Ser447X (rs328) ubicado en el exón 9, debido a que son las más comunes y han sido ampliamente estudiados en otras poblaciones (Chen et al., 2008; Gambino R, 1999; Georgiev et al., 2008; Gotoda et al., 1989; Guan et al., 2006; Herbeth et al., 2007; Kuivenhoven et al., 1997; Larson et al., 1999; Liu et al., 2004; Myllykangas et al., 2001; Sepetiba et al., 2007; Socquard et al., 2006; Wang et al., 2011; Yin et al., 2006; Zhao et al., 2003). Además en Colombia no se han realizado estudios de asociación entre estos polimorfismos de la *LPL* y el desarrollo de ACV.

Con el presente estudio se busca dar un aporte epidemiológico para que así se puedan desarrollar estrategias de prevención y control del accidente cerebrovascular de una forma global e integrada, en donde se reduzca el riesgo en la población de presentar la enfermedad, medidas de diagnóstico temprano para identificación de personas con alto riesgo y planes de atención a personas que ya padecen la enfermedad y limitar las consecuencias neurológicas del mismo, prevenir y tratar las complicaciones; por medio de estrategias para prevenir un nuevo episodio, incluyendo modificación de factores de riesgo, terapia antiagregante e hipolipemiente y promover una efectiva rehabilitación (Pérez, 2004; Pruissen et al., 2009; Silva FA, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

El accidente cerebrovascular es una enfermedad compleja que compromete un grupo heterogéneo de trastornos con múltiples factores de riesgo (Domingues-Montanari et al., 2008). Se cree que el ACV es principalmente causado por factores ambientales, y la genética tiene una función menor en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo estudios en el campo de la genética molecular y de poblaciones sugiere que se debe reexaminar el papel de marcadores genéticos en la patogénesis (Alberts, 1991; Catto, 2001). Además se han desarrollado estudios moleculares, bioquímicos y genéticos para elucidar el rol de los genes en la patogénesis del ACV llegando a la conclusión que existen marcadores genéticos que juegan un papel importante en la etiología de esta, además existen estudios en donde se ha demostrado que la genética tiene una mayor influencia en el desarrollo de la enfermedad que los factores ambientales (Hunt et al., 1989). Por tanto actualmente uno de los objetivos alcanzables con la genética molecular es la identificación y caracterización del defecto genético responsable de dicha enfermedad y su comportamiento en diferentes poblaciones (Alberts, 1991; Alrajeh et al., 2008; Hassan et al., 2000; Meschia et al., 2011; Munshi et al., 2010; Rastenyte et al., 1998).

El accidente cerebrovascular es una enfermedad costosa que causa gran número de defunciones prematuras (*The global burden of disease: 2004 update*, 2008.; *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, 2011.; *Heart and Stroke fact statistical supplement.*, 2000), discapacidad continua que afecta a muchos sobrevivientes, repercusión en las familias o en los prestadores de asistencia y los servicios de salud. Actualmente muchos países están invirtiendo grandes sumas de dinero en las consecuencias y problemas de las enfermedades transmisibles, mientras que las enfermedades crónicas no transmisibles están en aumento. Las cuales además de ser una causa importante de muerte, son causantes de algún grado de discapacidad en pacientes que sobreviven a un accidente cerebrovascular, los cuales después del evento necesitan ayuda en sus actividades cotidianas, la cual debe ser proporcionada por los miembros de la familia, el sistema de salud u otras instituciones sociales. De esta forma se hace necesaria una coordinación eficaz de la prevención, el tratamiento y la rehabilitación de los pacientes en riesgo de tener un accidente cerebrovascular.

3. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe asociación entre la presencia de los polimorfismos HindIII, Pvull y Ser447X del gen *Lipoproteína lipasa (LPL)* con el desarrollo del accidente cerebrovascular isquémico en una muestra poblacional Colombiana.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar las frecuencias alélicas de los polimorfismos HindIII, Pvull y Ser447X del gen *lipoproteína lipasa (LPL)* en una muestra poblacional colombiana.

Caracterizar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos HindIII, Pvull y Ser447X en el gen *lipoproteína lipasa (LPL)* en una muestra poblacional colombiana.

Establecer el genotipo más frecuente para HindIII, Pvull y Ser447X en el gen *lipoproteína lipasa* en pacientes con ACV isquémica en una muestra poblacional Colombiana.

4. MARCO TEÓRICO

5.1. ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

Inicialmente es importante aclarar la terminología usada para referirse a la enfermedad de interés en el presente estudio. Al consultar en la base de datos “Medical Subject Heading” (MeSH), el término “cerebrovascular disease” no se obtiene ningún resultado, sin embargo el término “stroke” da como resultado la definición para la patología de interés. Para determinar cuál es el mejor descriptor en español se hizo la búsqueda en la base de datos “Descriptor en Ciencias de la Salud” (DeCS) para el término “stroke”, el correspondiente descriptor en español es “accidente cerebrovascular”. Es así como durante el desarrollo de la presente investigación se usó el término accidente cerebrovascular para referirse a la enfermedad objeto de la presente investigación.

El cerebro es un órgano complejo que controla las funciones intelectuales, el control centralizado del cerebro permite que el cuerpo de respuestas rápidas y coordinadas frente a cambios en el ambiente. Un buen suministro de sangre es vital para la función normal del cerebro; dos grandes vasos que van a lo largo de cada lado del cuello, llevan la sangre desde el corazón hasta el cerebro. Los vasos sanguíneos se ramifican en las arterias cerebrales y transportan el oxígeno de nutrientes a todas partes de cerebro (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud el accidente cerebrovascular isquémico se define como la interrupción del flujo sanguíneo al cerebro, normalmente porque un vaso sanguíneo es bloqueado por un coágulo que puede estar directamente en el sitio de la oclusión (accidente cerebrovascular isquémico trombótico) o en otra parte del sistema cardiovascular y sigue el torrente sanguíneo hasta que obstruye las arterias del cerebro (accidente cerebrovascular isquémico embólico). Cortando el suministro de oxígeno y nutrientes, causando daños en el tejido cerebral. El síntoma más común es la debilidad o entumecimiento repentino de la cara, brazo o pierna y tiene una frecuencia mayor en un lado del cuerpo. Otros síntomas incluyen: confusión, dificultad para hablar; dificultad para ver con uno o ambos ojos, dificultad para caminar, mareo, pérdida del equilibrio o de la coordinación, dolor de cabeza severo sin causa conocida, desmayo o pérdida de conciencia (*Estrategia paso a paso de la OMS para la vigilancia de accidentes cerebrovasculares*, 2005; *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011; *Heart and Stroke fact statistical supplement.*, 2000).

Los efectos de un accidente cerebrovascular dependen de qué parte del cerebro se lesiona y la severidad del cuadro clínico, en algunos casos puede causar la muerte

súbita. Se considera una afección neurológica focal (o a veces general) de aparición súbita, que perdura más de 24 horas (o causa la muerte) y de presunto origen vascular. Su diagnóstico es clínico y soportado con pruebas de diagnóstico por imágenes cerebrales (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011).

El accidente cerebrovascular es una enfermedad multifactorial en la que una combinación de factores de riesgo influyen con el transcurso del tiempo en la probabilidad de que el sujeto presente esta afección (*Estrategia paso a paso de la OMS para la vigilancia de accidentes cerebrovasculares*, 2005). Los principales factores de riesgo se pueden dividir en tres categorías:

- ☀ Modificables: hipertensión arterial (HTA), niveles elevados de colesterol, consumo de tabaco, inactividad física, régimen alimentario, consumo excesivo de alcohol, sobrepeso, diabetes, fibrilación auricular y antecedente de enfermedades cardíacas.

La hipertensión ha sido establecida como el principal factor de riesgo para el ACV isquémico o hemorrágico, independiente de la filiación étnica o el sexo (Harmsen et al., 2009; Ikeda et al., 2009; Sen et al., 1998; Sugiyama et al., 1999). Las alteraciones cardíacas son ampliamente conocidas como una importante fuente de embolismo cerebral (Evans et al., 2000; Rosamond W, 2007; Sen et al., 1998). La relación del sobrepeso y la obesidad con el ACV no son del todo consistentes y se encuentra influenciada por otros factores como el tabaquismo, hipertensión y diabetes. Sin embargo la evidencia apunta a que la obesidad y el sobrepeso son claros factores de riesgo para el ACV, particularmente en poblaciones en desarrollo en las cuales los hábitos alimenticios y estilo de vida ha cambiado con el paso del tiempo (Flegal et al., 2002; Shinton et al., 1995; Suk et al., 2003), adicionalmente las concentraciones séricas de fibrinógeno están relacionadas como factor de riesgo para el ACV y otras enfermedades cardiovasculares (Tanne D, 1999). La diabetes y la intolerancia a la glucosa son uno de los factores de riesgo más importantes para el ACV debido al daño macro y microvascular sistémico asociado. La susceptibilidad de la intolerancia a la glucosa y al desarrollo de diabetes mellitus tiene variaciones étnicas implícitas (Kissela et al., 2005). El uso de anticonceptivos orales se ha relacionado con la ocurrencia del ACV isquémico y hemorrágico (Bushnell, 2009; Bushnell et al., 2001; Mant et al., 1998). La dieta puede estar asociada a otros procesos como la hipertensión, los niveles séricos de lípidos y el desarrollo de aterosclerosis. Las dietas ricas en ácido fólico se asocian con un nivel reducido de homocisteína, cuyos niveles elevados están asociados con enfermedad aterosclerótica prematura (López-Jaramillo P, 2001). También se ha observado una relación inversa entre el consumo de potasio en la dieta y la mortalidad por el ACV en la población de raza negra hipertensa

(Bushnell, 2009). Las circunstancias nutricionales en los países en desarrollo están condicionadas por diferentes factores sociales, económicos, políticos y culturales (Fang et al., 2000; Lopez-Jaramillo et al., 2001). La enfermedad aterosclerótica carotídea es reconocida como factor de riesgo para ACV y su severidad condiciona el nivel de riesgo (Handa et al., 1995; Lee et al., 2007; Prati P, 2008; Sacco et al., 2009) (Daniels et al., 2009; Javorsky et al., 2007; Johansen et al., 2011; Larson et al., 1999; Long et al., 2006; Pasalic et al., 2001; Sepetiba et al., 2007; Xie et al., 2010).

- ☀ Ambientales: el cigarrillo está relacionado como factor de riesgo para las diferentes clases de ACV independiente de la HTA y la edad (Tanizaki Y, 2000).
- ☀ Inmodificables: edad, género y antecedentes familiares como la herencia genética.

Se han asociado como factores de riesgo tradicionales para ACV las variaciones étnicas y sociales evidenciando que en raza negra y los caribeños de ascendencia africana tienen tasas altas de incidencia y mortalidad para ACV (Anand SS, 2000; Pradilla G, 1984; Saposnik, 2000). El ACV es más frecuente en las clases sociales más bajas. La edad es el predictor más fuerte de ACV y está representado en las curvas de incidencia (Forster et al., 2009; Harmsen et al., 2009). El género es un factor independiente de la raza; los hombres tienen un riesgo aumentado de presentar ACV y mayor mortalidad asociada frente a las mujeres (Forster et al., 2009; Reiner et al., 2000; Truelsen et al., 2006). Recientes investigaciones han evaluado el papel de las alteraciones genéticas como marcadores de riesgo para el desarrollo de ACV, estudios sobre asociación molecular han demostrado que polimorfismos (variantes genéticas) en múltiples genes pueden ejercer un modesto pero potencialmente significativo incremento de riesgo de accidente cerebrovascular; al modificar enzimas involucradas en el metabolismo lipídico o proteínas estructurales que forman parte del sistema vascular (Humphries et al., 2004; Levine, 2005; Rastenyte et al., 1998; Reiner et al., 2000). Se ha descrito un número de polimorfismos que pueden incrementar el riesgo de ACV isquémico, promoviendo la actividad protrombótica, una actividad fibrinolítica alterada, la sintetasa endotelial de óxido nítrico, la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) o el incremento en la homocisteína (Humphries et al., 2004).

5.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, una de las formas más frecuentes de presentación es el accidente cerebrovascular (ACV); principal causa de incapacidad o pérdida funcional y la tercera causa de mortalidad en el mundo después de la cardiopatía isquémica y el cáncer (Silva FA, 2006).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2011, 16,5 millones de personas murieron por ECV, lo que representa el 30,4% de todas las muertes en el mundo. De estas muertes, siete millones fueron causadas por una enfermedad cardíaca isquémica y seis millones debido a un ACV (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011; *WHO methods and data sources for global causes of death 2000-2011*, 2013). La prevalencia del accidente cerebrovascular es de casi el 1% y la incidencia es de más de 100 por cada 100.000 habitantes (Flynn et al., 2008). En Colombia en el 2008 ocupó el tercer lugar como causa de muerte por enfermedades crónicas en hombres entre los 45 y 64 años, con una tasa de 34,8 por 100.000 habitantes; y el segundo puesto en mujeres mayores de 65 años con una tasa de 394,3 por 100.000 habitantes (Pérez, 2004; Warlow, 1998). En el año 2011, se presentó una tasa de 29,13 muertes por 100.000 habitantes (*WHO methods and data sources for global causes of death 2000-2011*, 2013).

15 millones de personas en el mundo han tenido un accidente cerebrovascular, de estos un tercio han muerto y cerca de cinco millones han quedado permanentemente incapacitados volviéndose una carga para la familia y para la comunidad. Más del 85% de las muertes corresponden a habitantes de los países de ingresos bajos y medianos y un tercio a personas menores de 70 años, la afección en personas menores de 40 años se debe a valores elevados de tensión arterial y en los niños (8% de los casos) se debe a la presencia de la anemia de células falciformes (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011; *The global burden of disease: 2004 update*, 2008.; Warlow, 1998). Hasta el presente, casi toda la investigación de evaluación de los factores de riesgo para el accidente cerebrovascular se ha realizado en países de altos ingresos, muy poca se ha realizado en países de bajos recursos (*Heart and Stroke fact statistical supplement.*, 2000; Warlow, 1998); dentro de ellos Colombia, considerado un país de medianos a bajos ingresos (Flynn et al., 2008).

La presencia de un accidente cerebrovascular tiene impactos tanto en la persona afectada, como en la familia, por los altos costos de la atención médica, seguimiento a la enfermedad y tratamiento. El accidente cerebrovascular es la quinta causa de pérdida de productividad (años de vida ajustados por discapacidad). Ello incluye los años de pérdida de productividad por razón de muerte o distintos grados de discapacidad (Flynn et al., 2008; *The global burden of disease: 2004 update*, 2008.; McKay, 2004).

Los países en donde hay alta prevalencia de la enfermedad se ven afectados debido a que deben destinar parte de su producto interno bruto en las secuelas producidas por el ACV. Un ejemplo de ellos se observa a continuación: En Estados Unidos, la

Asociación Americana del Corazón estima que la inversión en la atención del accidente cerebrovascular implicó un costo de 73,3 billones de dólares en el 2010, en costos directos como hospitalización, rehabilitación y posibles complicaciones médicas y en costos indirectos como la pérdida de productividad y mortalidad. En el Reino Unido, en el año 2010, el tratamiento y la pérdida de productividad de los pacientes con ACV tuvo un costo de 9,8 billones de libras (Saka et al., 2009). En Holanda la ACV es la segunda enfermedad en inversión en su atención, después de la demencia, se espera que para el 2015 los costos incrementen un 40%. En Australia el costo total por ACV en el año 2012 fue de 5 billones de dólares, incluyendo imagenografía, servicios médicos, medicamentos y terapia (2013; Flynn et al., 2008; McKay, 2004).

5.3. METABOLISMO DE LÍPIDOS

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares compuestos por lípidos y proteínas, encargados de transportar triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos por el torrente sanguíneo. Debido a que los ácidos grasos son menos densos que el agua, la densidad de las lipoproteínas disminuye a medida que la proporción de lípido-proteína aumenta.

Existen cuatro grupos principales de lipoproteínas con función fisiológica y útiles en el diagnóstico clínico: VLDL, IDL, LDL y HDL (Fromm, 2012; Murray R. , 2009). La parte proteica de una lipoproteína se conoce como apolipoproteína y constituye el 70% en la HDL y 1% en quilomicrones. Una o más apolipoproteínas están presentes en cada lipoproteína y dentro de sus funciones está formar parte de la estructura de la lipoproteína, ser cofactores enzimáticos y ligandos para interacciones con receptores de proteínas en tejidos. En la tabla 1 se puede observar la composición lipídica y proteica de cada una de las lipoproteínas.

Tabla 1 Composición de las lipoproteínas

Lipoproteína	Fuente	Densidad (g/mL)	Composición (%)		Composición lipídica	Apolipoproteínas
			Proteína	Lípido		
Quilomicrón	Intestino	0.92–0.96	1-2	98-99	Triglicéridos	A-I, A-II, A-IV,1 B-48, C-I, C-II, C-III, E
VLDL	Hígado Intestino	0.95–1.01	7-10	90–93	Triglicéridos	B-100, C-I, C-II, C-III
IDL	VLDL	1.01–1.02	11	89	Triglicéridos Colesterol	B-100, E
LDL	VLDL	1.02–1.06	21	79	Colesterol	B-100
HDL	Hígado Intestino VLDL Quilomicrón	1.06–1.25	57	43	Fosfolípidos Colesterol	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D,2 E

En la Figura 1 se observa un resumen del metabolismo de las lipoproteínas. Los ácidos grasos libres producto de la acción de la lipoproteína lipasa sobre los triglicéridos plasmáticos, son removidos rápidamente del torrente sanguíneo a procesos de oxidación o esterificación para formar triglicéridos en los tejidos.

La limpieza de quilomicrones de la sangre es rápida, aproximadamente una hora. El triglicérido que proviene de quilomicrones es entregado principalmente en el tejido adiposo, corazón, músculo e hígado. Sin embargo, el hígado no metaboliza quilomicrones nativos o VLDL, así, los ácidos grasos en el hígado son secundarios a su metabolismos en tejidos extrahepáticos (Christopher K. Mathews, 2012).

La lipoproteína lipasa se encuentra en las paredes de los capilares sanguíneos, anclada al endotelio por la carga negativa de cadenas de proteoglicanos de heparan sulfato y se encarga de la hidrólisis de triglicéridos de quilomicrones y VLDL. Tanto fosfolípidos como ApoCII son necesarios como cofactores para la actividad de la lipoproteína lipasa, mientras que ApoAII y ApoCIII son inhibidores. La hidrólisis se lleva a cabo mientras las lipoproteínas están unidas a la enzima en el endotelio. Los triglicéridos son hidrolizados progresivamente a diacilglicerol, luego a monoacilglicerol y finalmente a ácidos grasos libres y glicerol. Parte de los ácidos libres liberados vuelven a circulación, unidos a la albumina (Mead et al., 2002).

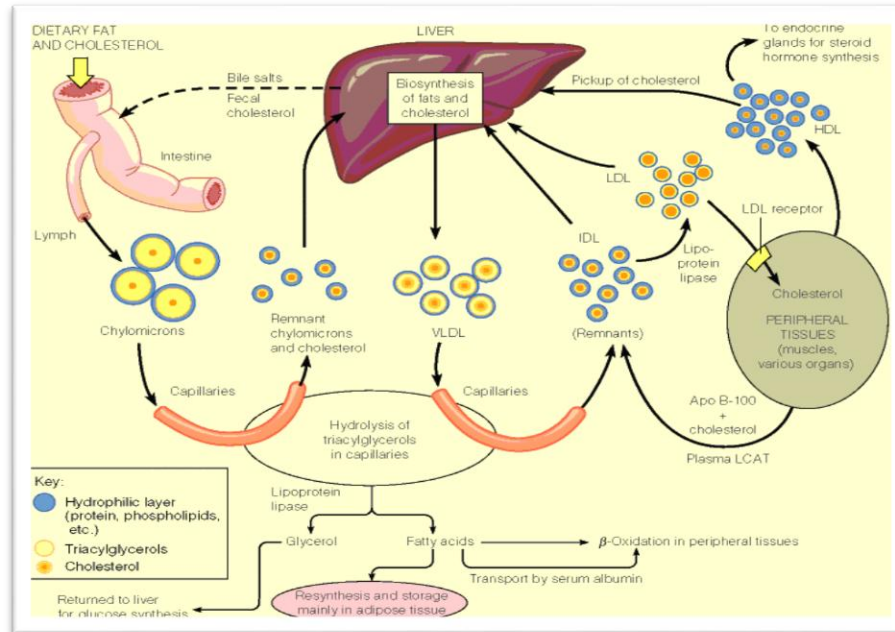
El receptor de VLDL permite que se produzca una interacción cercana de la VLDL con la lipoproteína lipasa facilitando de esta forma la hidrólisis del colesterol que la VLDL posee. Como producto de esta hidrólisis se forma el IDL. Adicionalmente, la VLDL puede ser tomada por el hígado directamente vía receptor de LDL o puede ser convertida en LDL. Solo una molécula de ApoB100 está presente en cada una de estas partículas de lipoproteínas y esta se conserva a través del metabolismo lipídico. Así, cada partícula de LDL es producto de una sola partícula precursora de VLDL (Christopher K. Mathews, 2012).

El LDL es captado a nivel hepático por los receptores B100: E por competencia con las IDL. Los receptores periféricos B100, la internalizan y permiten su catabolismo celular, libreando colesterol libre que inhibe la hidroximetilglutaril CoA reductasa, enzima clave para la síntesis de colesterol. El colesterol libre reduce la síntesis de receptores y estimula la esterificación de colesterol. De esta forma regula la concentración de colesterol a nivel celular (Christopher K. Mathews, 2012).

La HDL se encarga del transporte reverso del colesterol desde los tejidos hasta el hígado, único órgano capaz de excretarlo. Inicialmente actúa con los sistemas transportadores transmembrana de colesterol. El colesterol libre en la superficie de

la molécula, es esterificado e internalizado dejando un sitio para captar más colesterol (Fromm, 2012; Murray R. , 2009).

Figura 1. Resumen de metabolismo de lipoproteínas



Fuente: <http://www.pearsonhighered.com/mathews/ch18/frames.htm>

5.4. LIPOPROTEÍNA LIPASA

Las lipasas son enzimas solubles en agua que hidrolizan los enlaces éster de sustratos insolubles en agua, tales como fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. La lipoproteína lipasa (LPL) es miembro de la familia de genes de los triglicéridos, dentro de esta familia también se encuentra la lipasa hepática, lipasa pancreática, lipasa endotelial, proteínas de huevo de *Drosophila* 1, 2 y 3 (YP1, YP2, y YP3)(Kirchgeßner et al., 1989; Wang et al., 2009; Wong et al., 2002).

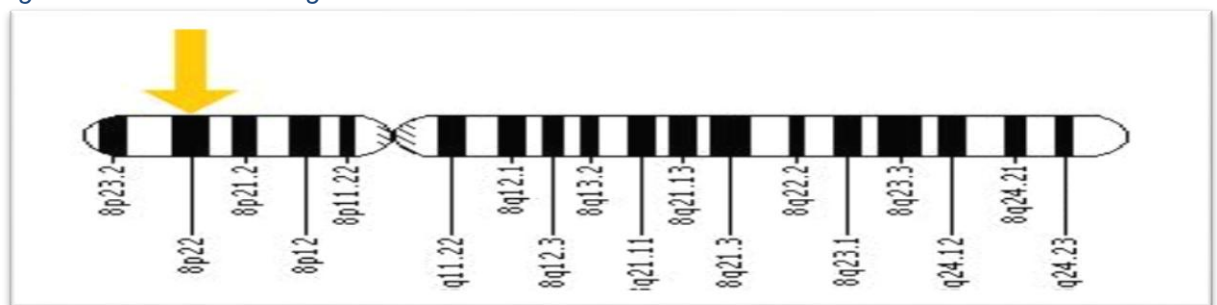
La lipoproteína lipasa es sintetizada en las células parenquimales del corazón, músculo esquelético y tejido adiposo pardo y se distribuye a través de la malla vascular. Después de la síntesis, la LPL es secretada y luego transportada a la superficie luminal de las células endoteliales en donde se ancla por medio de interacciones iónicas con proteoglicanos de heparan sulfato (Mead et al., 2002). La actividad de la enzima ha sido identificada en amplio rango de tejidos extra hepáticos incluyendo; tejido adiposo, corazón, músculo esquelético, pulmones, glándula mamaria, cerebro, riñón y macrófagos (Mead et al., 2002).

La función principal de la LPL es la hidrólisis de triglicéridos provenientes de quilomicrones circulantes y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), removiendo

las lipoproteínas de circulación por medio de la liberación de ácidos grasos libres; esto lo logra por medio de la unión a proteoglicanos heparan sulfato en la superficie celular. La apolipoproteína, ApoCII es un coactivador para la actividad de la LPL en presencia de lípidos en la superficie luminal del endotelio vascular (Mead et al., 2002; Oka et al., 1990; Wang et al., 2009; Wong et al., 2002).

El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 8p22 (Figura 2) que abarca 30 Kb y contiene 10 exones de los cuales nueve exones codifican para una proteína de 475 aminoácidos (Kirchgessner et al., 1989). (Figura 3)

Figura 2. Localización del gen LPL en el cromosoma 8.



Fuente: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LPL>

Figura 3. Gen LPL



Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4023>

5.5. GENÉTICA DEL ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

El accidente cerebrovascular isquémico es una enfermedad compleja que compromete un grupo heterogéneo de desórdenes con múltiples factores de riesgo, lo cual implica que su componente genético sea mucho más complejo (Rastenyte et al., 1998). De esta forma su estudio genético se debe realizar tomando como referencia genes causantes del ACV que no contribuyen directamente con el genotipo, pero que tienen un efecto modulador o independiente en el rasgo de ACV (Alrajeh et al., 2008). Existen factores de riesgos ampliamente descritos como lo son la diabetes y la hipertensión, que son parcialmente heredables, de esta forma varios loci contribuyen al fenotipo de ACV (Alrajeh et al., 2008).

Se han llevado a cabo diversos estudios tanto de asociación de genoma completo (GWAS) como de SNPs, con el propósito de encontrar genes individuales que aumenten el riesgo de ACV (Tonk et al., 2007). Sin embargo, los resultados son

confusos y difíciles de interpretar. Dentro de los posibles causales de la ACV se han estudiado polimorfismos en genes de los factores hemostáticos, renina angiotensina, óxido nítrico, metabolismo de la homocisteína y metabolismo lipídico (Hassan et al., 2000).

Los lípidos tienen una función clave en la patogénesis de la aterosclerosis en general (Hassan et al., 2000; Rastenyte et al., 1998). Se ha visto que individuos con altos niveles de colesterol plasmático, y de HDL, y bajo LDL tienen un mayor riesgo de aterosclerosis prematura. Este fenotipo se produce debido a la influencia de marcadores genéticos, que abarcan desde polimorfismos en los genes que codifican las apolipoproteínas, receptores de lipoproteínas o enzimas claves en el metabolismo lipídico (Hassan et al., 2000). Trabajos bioquímicos, genéticos y moleculares han permitido elucidar el rol de varios genes en la patogénesis de las hiperlipidemias que predisponen a arterosclerosis. Dentro de las proteínas estudiadas se encuentran: apoA1/CIII, apoB, lipoproteína lipasa, angiotensina, paraoxonasa y apoE (Tonk et al., 2007) (Tabla 2).

Tabla 2 Genes asociados con ACV

Gen	Polimorfismo	Resultado	Ref.
Lipoproteína lipasa	A291G	Asociación	(Hassan et al., 2000; Johansen et al., 2011; Rastenyte et al., 1998; Tonk et al., 2007)
	Ser447X	No asociación	
	HindIII		
	PvuII		
ApoE	apoE3/E3/E4	Asociación	(Hassan et al., 2000; Johansen et al., 2011; Rastenyte et al., 1998; Tonk et al., 2007)
	apoE2/E3/E4	No asociación	
Angiotensina	M235T	Asociación No asociación	(Hassan et al., 2000; Rastenyte et al., 1998)
ApoA1/CIII	SstI	Asociación	(Hassan et al., 2000; Johansen et al., 2011; Rastenyte et al., 1998)
	XmnI	No asociación	
ApoB	XbaI	No asociación	(Hassan et al., 2000)
Paraoxonasa I	glu192arg	Asociación	(Hassan et al., 2000)
	met54leu	No asociación	

5.6. POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA

Se han descrito cerca de 100 mutaciones y polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en el gen de la lipoproteína lipasa. Varias mutaciones causan deficiencia de la LPL produciendo hiperlipoproteinemia tipo I mientras que mutaciones menores pueden estar relacionadas con desordenes en el metabolismo de las lipoproteínas

(Mead et al., 2002; Wang et al., 2009). Las más frecuentes son mutaciones en sentido erróneo en donde hay una sustitución de un aminoácido por otro residual. Un 80% de las mutaciones ocurren en regiones codificantes mientras el resto están en regiones no codificantes (Murthy et al., 1996), por lo menos 10 mutaciones se han identificado en la región promotora, produciéndose pequeñas deleciones e inserciones que llevan a un cambio en el marco de lectura (Georgiev et al., 2008). Además, se han identificado más de 50 mutaciones con pérdida de función causando deficiencia de LPL (Reiner et al., 2000). La frecuencia de mutaciones varía significativamente entre poblaciones, como también ocurre en su relación con producir o no el accidente cerebrovascular. Dentro de los polimorfismos más estudiados se encuentran Ser447X, HindIII y PvuII (Chen et al., 2008; Hokanson, 1999; Rip et al., 2006).

El polimorfismo Ser447X (rs328) se produce por una mutación en el exón 9 del gen lipoproteína lipasa, que causa una transversión Citosina-Guanina produciendo un codón de terminación prematuro, por consiguiente una proteína madura truncada sin dos aminoácidos carboxilo terminales (Ser-Gly) (Stocks et al., 1992). El 20% de la población general es portadora de esta mutación (Rip et al., 2006). Aún no es muy claro el papel de esta mutación pero varios estudios sugieren que la LPL mutante tiene mayor actividad lipolítica, afectando la distribución de las lipoproteínas y el metabolismo en el cuerpo disminuyendo así la aparición de un fenotipo aterogénico que predispondrá para la hipertensión, por consiguiente se genera un incremento en los niveles de HDL y se disminuyen los niveles de triglicéridos plasmáticos, sugiriendo que esta mutación ejerce un efecto benéfico respecto al metabolismo lipídico (Clee et al., 2001; Kuivenhoven et al., 1997). Esta mutación ha sido estudiada extensamente pero los resultados de su actividad lipolítica y su efecto como factor de protección varían. En algunas poblaciones se ha observado una mayor actividad de la lipoproteína lipasa y en otras una actividad 45% mayor a la actividad normal lipolítica (Faustinella et al., 1991; Hata et al., 1990; Kozaki et al., 1993; Stocks et al., 1992). Se ha demostrado su efecto protector para ACV en población francesa (Meschia et al., 2011), japonesa (Shimo-Nakanishi et al., 2001), china (Zhao et al., 2003), finlandesa (Myllykangas et al., 2001), inglesa (Mattu et al., 1994; Stocks et al., 1992), sueca (Rachel E. Peacock, 1992), brasilera (Sepetiba et al., 2007), árabe (Salah et al., 2009), holandesa (Kuivenhoven et al., 1997). Sin embargo, estudios realizados en la población griega (Fidani et al., 2005) y norteamericana (Morrison et al., 2002), no demostraron algún tipo de protección. Por otra parte, está la hipótesis que el alto metabolismo de la lipoproteína lipasa puede liberar más ácidos grasos libres al tejido lo cual va a predisponer a la obesidad (Huang et al., 2006).

El polimorfismo HindIII (rs320) se localiza en el intrón 8 del gen lipoproteína lipasa, causado por una transversión de Timina por Guanina, y se ha encontrado asociado con niveles elevados de triglicéridos y bajos niveles de colesterol HDL (Fidani et al.,

2005; Myllykangas et al., 2001) además con el riesgo a desarrollar un accidente cerebrovascular (Chen et al., 1996). En estudios realizados se ha visto que molecularmente afecta el sitio de unión de factores de transcripción que regulan este proceso en el gen, de esta forma afectando la expresión del LPL (Chen et al., 2008). Estudios en la población de Estados Unidos (Anderson et al., 1999), Francia (Meschia et al., 2011), Gales (Mattu et al., 1994), India (Munshi et al., 2012), China (Xu et al., 2008), Japón (Shimo-Nakanishi et al., 2001), Brasil (Sepetiba et al., 2007), Túnez (Rebhi et al., 2012) y Alemania (Larson et al., 1999) han evidenciado que la presencia del polimorfismo altera los niveles lipídicos y actúa como marcador de predisposición para el desarrollo de ACV. Pero en Rusia (Parfenov et al., 2007), Arabia Saudita (Abu-Amero et al., 2003) e Italia [20] no se encontró asociación.

El polimorfismo Pvull (rs285) se encuentra en el intrón 6 del gen lipoproteína lipasa, y es producto de una transición Citosina-Timina (Castagnoli et al., 1987; Johnson et al., 1990; Nasri et al., 1987), la región que contiene dicho polimorfismo puede interferir con el correcto empalme del ARN mensajero (Horton et al., 1998). Se ha asociado con niveles elevados de triglicéridos (Fidani et al., 2005; Myllykangas et al., 2001), bajo colesterol HDL (Duman et al., 2004) y un aumento en la severidad de la enfermedad coronaria en pacientes con Diabetes Mellitus II (Socquard et al., 2006); esto ha sido revelado en poblaciones de China (Xu et al., 2008), Estados Unidos (Anderson et al., 1999), Brasil (Sepetiba et al., 2007), Australia (Wang XL, 1996), Francia (Meschia et al., 2011) y Japón (Shimo-Nakanishi et al., 2001). Mientras en Macedonia (Georgiev et al., 2008) y Arabia Saudita (Abu-Amero et al., 2003) no hubo diferencia en la distribución de los polimorfismos entre los casos y los controles.

En los estudios en donde no se encontró asociación, los investigadores plantean como posibles causas: dificultades en la selección de los pacientes (tamaño de muestra poblacional, características sociodemográficas) o la existencia de otros polimorfismos que podrían estar involucrados (Abu-Amero et al., 2003; Fidani et al., 2005; Gambino R, 1999; Georgiev et al., 2008; Parfenov et al., 2007).

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los polimorfismos de nucleótido simple: HindIII, Pvull y Ser447X en el gen *lipoproteína lipasa* están asociados con el desarrollo del accidente cerebrovascular en una muestra de población colombiana?

6. ASPECTOS METODOLÓGICOS

7.1. TIPO DE ESTUDIO

El diseño del estudio es de casos y controles, de tipo observacional y analítico.

7.2. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras usadas para la realización del estudio provenían de centros médicos de las ciudades de Cali, Bogotá, Bucaramanga y Medellín.

7.3. MUESTRAS

El presente estudio hace parte del macroproyecto “Evaluación de la asociación de polimorfismos de la lipoproteína lipasa y enfermedad cerebrovascular isquémica en población de raza hispana (estudio POLEC)”. En el cual se contó con la información epidemiológica y clínica, así como las muestras de sangre incluyendo buffy coat para el análisis de polimorfismos de 694 individuos, de ambos sexos pertenecientes al estudio FRECVI, estudio multicéntrico nacional denominado Prevalencia de Factores de Riesgo para Enfermedad Cerebrovascular Isquémica financiado por Colciencias (Código: 65660412913). El reclutamiento tanto de los casos como de los controles se hizo dentro del marco de este estudio. El muestreo se realizó en las ciudades de Cali, Bogotá, Bucaramanga y Medellín. Fue ejecutado por la Fundación Cardiovascular de Colombia y contaba con aval del comité ético de dicha institución, los pacientes al ingresar al estudio firmaron consentimiento informado en donde autorizaban el uso de los datos para análisis genético.

El estudio POLEC contaba con 347 casos que correspondían a pacientes con accidente cerebrovascular (ACV) isquémico; diagnosticado clínicamente y como soporte se tenía la Tomografía Axial Computarizada (TAC). Por otra parte los controles (347) eran personas sin ACV isquémico y sin ningún grado de consanguinidad con los casos (pacientes con ACV) y entre ellos, que visitaban los centros de salud en donde se encontraban los individuos reclutados. El Comité de Ética en Investigaciones de la Fundación Cardiovascular de Colombia y de la Universidad Industrial de Santander avalaron el proyecto POLEC.

El presente estudio contribuyó al macroproyecto POLEC con la realización de la genotipificación de las muestras en el laboratorio de genética de la Universidad Industrial de Santander y el respectivo análisis de genética de poblaciones. Fue avalado por el comité de ética de la Universidad Industrial de Santander

7.3.1. Criterios de inclusión

Pacientes participantes del estudio de Prevalencia de Factores de Riesgo para Enfermedad Cerebrovascular Isquémica (FRECVI)

Muestra de buffy coat para extraer DNA

- ☀ Casos: Personas con diagnóstico definitivo de ACV isquémico agudo no cardioembólico.
- ☀ Controles: personas sin ACV isquémico que no tengan ningún grado de consanguinidad definida con el paciente caso incluido.

7.3.2. Criterios de exclusión

- ☀ Antecedente de cirugía reciente (30 días previos), cáncer, enfermedad hematológica, hepática o renal (Creatinina > 1.5 mg%).
- ☀ Pacientes en tratamiento con anti-inflamatorios (excepto ASA en dosis como antiagregante 75 a 300 mg/d).
- ☀ Mujeres en embarazo.
- ☀ Se excluyeron todos los pacientes con eventos cardioembólicos.

5.4. VARIABLES DE ESTUDIO

En la tabla 3, se observan las variables que se tuvieron en cuenta para realizar el estudio, su escala de medición y tipo de variable.

Tabla 3 Variables de estudio

	VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	TIPO
Sociodemográficas	Edad	Años cumplidos	Razón
	Genero	Hombre/Mujer	Nominal
	Raza	Color de piel (autodefinición)	Nominal
	Estado civil	Condición civil	Nominal
Factor de exposición	Peso	Kilogramos (kg)	Razón
	Talla	Metros (m)	Razón
	Índice de masa corporal	Kg/m ²	Razón
	Circunferencia abdominal	Centímetros (cm)	Razón
	Antecedente familiar de ACV	Historia de ACV en familiares de cebador grado de consanguinidad	Nominal
	Antecedente personal de ECV	Historia personal de enfermedad cardiovascular.	Nominal

VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	TIPO
Nivel de presión arterial	Milímetros de mercurio (mmHg)	Razón
Nivel sérico de lípidos (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, HDL)	Miligramos por decilitro (mg/dL)	Razón
Glicemia	Miligramos por decilitro (mg/dL)	Razón
Tabaquismo	Numero de cigarrillos fumados por día	Razón
Consumo de medicamentos	antihipertensivos, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, anticoagulantes, compuestos hormonales	Nominal
Genotipificación		
Ser447X (rs328)	Alelo C Alelo G	Nominal
HindIII (rs320)	Alelo T Alelo G	
PvuII (rs285)	Alelo C Alelo T	

7.5. GENOTIPIFICACIÓN

Se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander.

Antes y después de empezar los experimentos, se limpió con extran y etanol 70%, tanto el área de trabajo como la centrifuga y micropipetas. El analista utilizó bata, guantes y tapabocas.

Además para cada ensayo se usó un control positivo para garantizar que las condiciones de la reacción fuesen las adecuadas y un control negativo para garantizar que no hubo contaminación en los reactivos o contaminación cruzada.

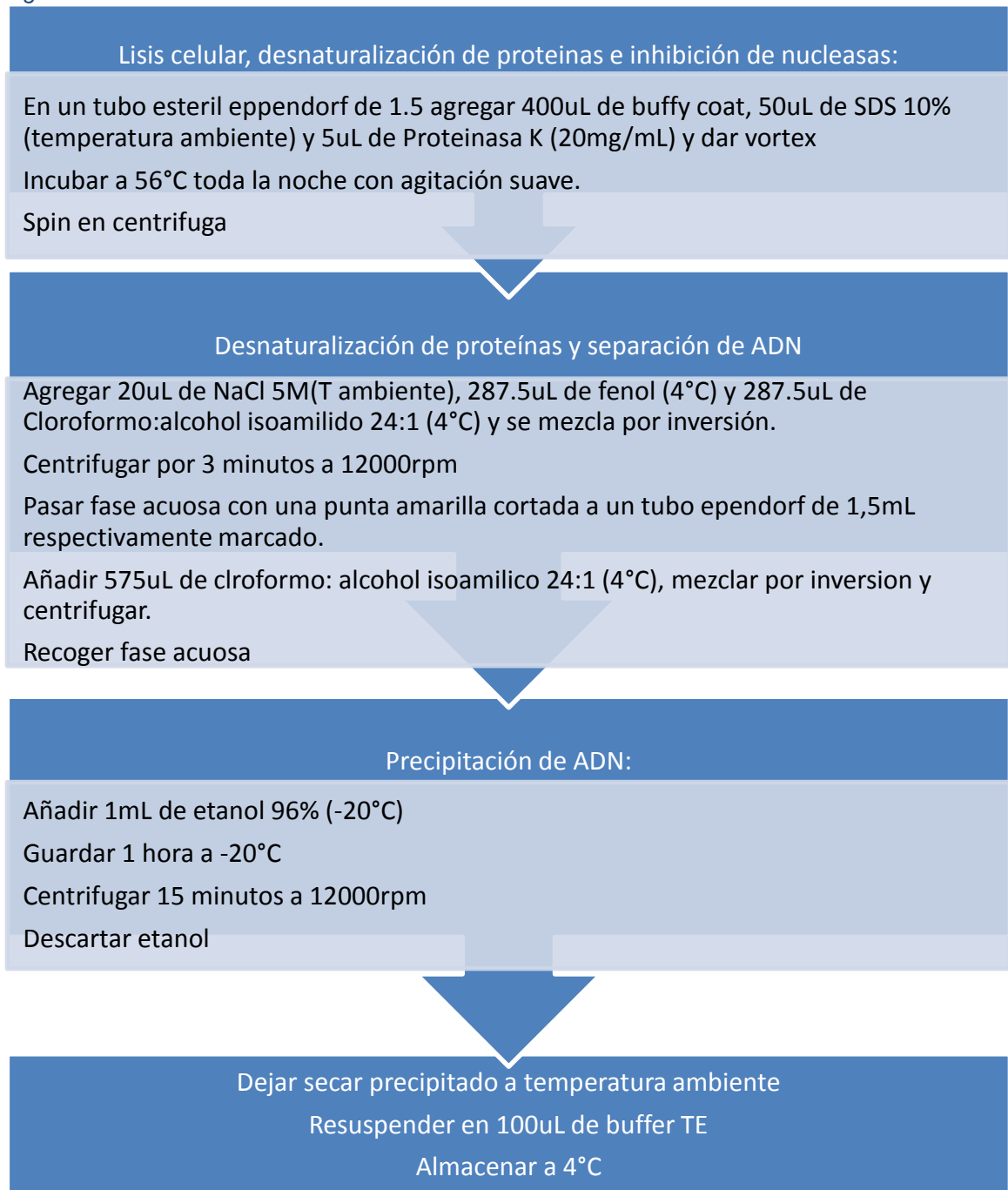
Para aumentar la validez del estudio y eliminar posibles sesgos diferenciales se usó la técnica de enmascaramiento en donde al hacer el procesamiento a nivel de laboratorio de las muestras, el analista no sabía que muestras actuaban como controles o casos. Además, el 10% de las muestras se procesaron por duplicado, con el objetivo de garantizar la calidad de los resultados obtenidos (repetibilidad y reproducibilidad)

7.5.1. Extracción de ADN

El ADN fue extraído a partir del buffy coat de cada paciente el cual se encontraba almacenado a -70°C. La técnica de extracción usada fue Fenol cloroformo siguiendo el protocolo que describe la Figura 4.

Debido a la alta toxicidad de las sustancias usadas en el proceso de desnaturalización de proteínas y separación de ADN, se tomaron medidas de bioseguridad adicionales; uso de doble guante de nitrilo, máscara de gas, gafas protectoras y bata desechable.

Figura 4. Protocolo de PCR



Protocolo validado en el laboratorio de genética UIS. Facultad de Salud UIS

Verificación de extracción

Para visualizar el ADN extraído se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2%. 20 minutos de corrido a 120V. Para teñir el ADN se usó bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Aquellas muestras en las cuales no se visualizaba banda se les hacía re-extracción.

7.5.2. Métodos moleculares

Los cebadores usados para detectar los SNPs HindIII y PvuII se tomaron de literatura publicada (Castagnoli et al., 1987; du Plessis et al., 1996; Groenemeijer et al., 1997; Shimo-Nakanishi et al., 2001; Stepanov et al., 1993; Wang et al., 2011; Zhao et al., 2003). Mientras que los cebadores para detectar Ser447X se diseñaron por medio del programa primer3. En la Tabla 6. Se pueden visualizar las secuencias de los cebadores utilizados.

Inicialmente se pensaban usar los cebadores comúnmente reportados en la literatura (Shimo-Nakanishi et al., 2001; Stocks et al., 1992) con su respectivo protocolo de amplificación, sin embargo al utilizar los cebadores hacia adelante (primer forward): 5'-CATCCATTTTCTTCCACAGGG-3' y Reverso (primer reverse): 5'-AGTCTGGTGAGCATTCTGGGCTA-3' para amplificar el fragmento que corresponde al polimorfismo Ser447X no se observó amplificado para 14 muestras procesadas a pesar de modificar la temperatura de hibridación. Por tanto se diseñó un cebador para amplificar el fragmento que corresponde al polimorfismo Ser447X, usando el programa primer3.

Los pasos para el diseño del cebador fueron:

En la base de datos dbSNP se buscó la identificación del SNP correspondiente a Ser447X, rs328, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=328) Dicha base de datos muestra información sobre el SNP; validez, ubicación, secuencia, diversidad poblacional, etc. Se copió la secuencia dentro del gen de la lipoproteína lipasa alrededor del SNP Ser447X, y se pegó en la página primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), antes de correr el programa se seleccionaron los parámetros "Pick left primer or use left primer below", en "Product Size" se ajustó el parámetro del tamaño del producto a 80-350.

En la nueva ventana aparecen posibles cebadores que se podrían utilizar con información correspondiente al lugar en donde empieza la secuencia, la longitud del cebador, la temperatura de hibridación (Tm), porcentaje de guanina-citosina (gc%), apareamiento de los cebadores (3') y tamaño del producto amplificado.

Los criterios de selección para elegir el cebador fueron:

T_m: no superar los 60°C

3': no superar 2

Posteriormente se ubicaron los cebadores dentro de la secuencia y se verificó si habían SNPs dentro de la secuencia del cebador, en caso de ser así el cebador era inválido. Para ubicar los SNPs dentro de la secuencia del cebador, se usó la base de datos dbSNP, dando clic en "Neighbor SNP" se pueden localizar los SNPs cercanos a Ser447X.

Se revisaron los cebadores hacia adelante y reverso reportados en la literatura (HindIII y PvuII) y los cebadores diseñados (Ser447X), usando las herramientas bioinformáticas Blast y Genebrowser; para asegurar que las secuencias de los cebadores estuvieran en los cromosomas del gen y no en secuencias diferentes dentro del genoma.

La verificación por blast se hizo como se describe a continuación: Ingresar a http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=OGP__9606__9558, pegar la secuencia del cebador hacia adelante en "Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)". Los resultados obtenidos permitieron evaluar la homología del cebador con el genoma del gen de interés, indicando que la secuencia del cebador se encuentra en el cromosoma 8 Humano con 100% de identidad y cobertura. Cabe resaltar que al momento de ingresar el cebador reverso fue necesario convertirlo en su reverso complementario. Teniendo en cuenta que el programa para el diseño de los cebadores lo diseña tomando como base la cadena de ADN con dirección 5'→3'.

La verificación por Genebrowser se hizo entrando a la página <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>, y en las casillas "primer Forward y primer Reverse" poner las respectivas secuencias. El programa abre una nueva ventana en donde se encuentra la secuencia y el tamaño en pares de bases. En caso que el cebador no fuese identificado por el programa, este se descartaba.

7.5.3. Amplificación del ADN genómico

-Reacción de amplificación (PCR)

En la tabla 4. Se observan los reactivos y la cantidad usada en la reacción de amplificación

Tabla 4 Reacción de amplificación

Reactivo	Cantidad
ADN genómico	13uL
Cebador (c/u)	200umol
Buffer 5x	5uL
MgCl ₂	2.5mM
Nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	50umol/L
Taq	1U
Volumen final	25uL

-Protocolo de amplificación

Los protocolos a usar en el termociclador para realizar las amplificaciones de cada una de las regiones a estudiar se mencionan en la Figura 5, 6 y 7.

Figura 5. Protocolo de Termociclador para Ser447X (rs328)

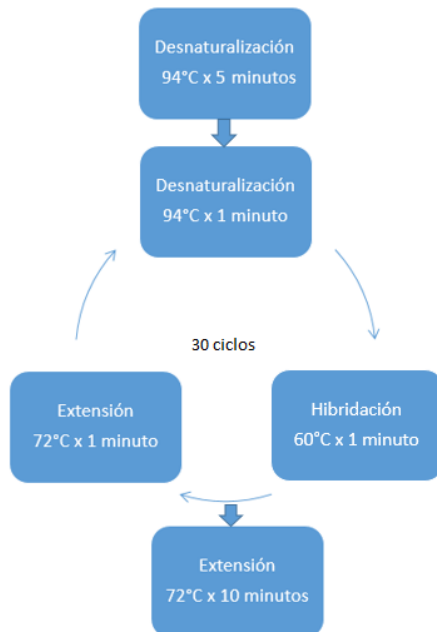


Figura 6. Protocolo de Termociclador para HindIII (rs320)

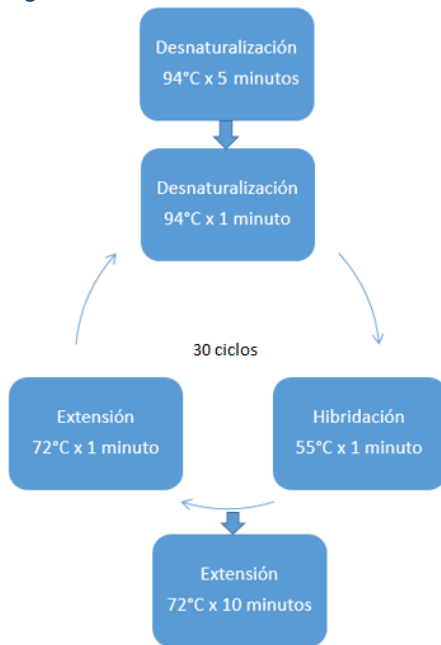
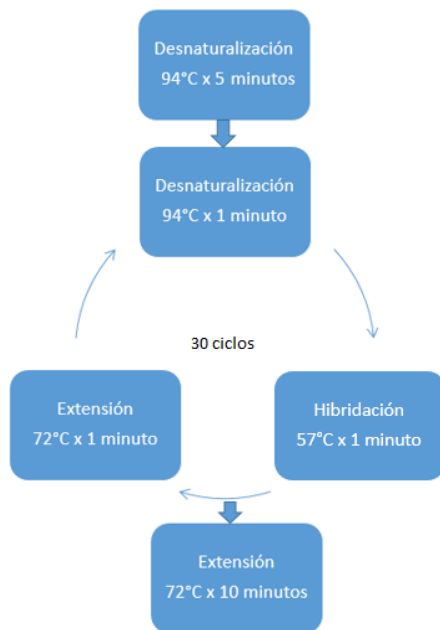


Figura 7. Protocolo de Termociclador para PvuII (rs285)



Verificación de amplificados

Para visualizar los fragmentos amplificados se hizo electroforesis en gel de agarosa al 2%. 60 minutos de corrido a 80V. Para teñir las bandas de ADN se usó bromuro de etidio y estas fueron visualizadas en un transiluminador.

7.5.4. Digestión y electroforesis

Los Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) son diferencias en la secuencia de ADN que son reconocidas por enzimas de restricción las cuales crean fragmentos que permiten distinguir individuos teniendo en cuenta los tamaños de estos (Cooper., 2007).

El ADN amplificado es tratado con enzimas de restricción las cuales hacen un proceso de corte en un punto de reconocimiento de la secuencia cortando un fragmento de ADN en dos o más fragmentos. En caso que la enzima de restricción no reconozca la secuencia, el ADN no es cortado. Los RFLP se visualizaron por medio de electroforesis. La presencia y la ausencia de un punto de restricción es equiparable a la existencia de dos alelos (Gahan, 2005). El reactivo y la cantidad usada para realizar la digestión se visualizan en la tabla 5.

Tabla 5 Reacción de digestión Ser447X (rs328), HindIII (rs320) y PvuII (rs285)

Reactivo	Cantidad		
	Ser447X (rs328)	HindIII (rs320)	PvuII (rs285)
Buffer4 10X	1X	-	-
Buffer2 10X	-	1X	1X
BSA 100X	0.5X	-	-
Enzima de restricción (New England Biolabs®)	4U MnIII	4U HindIII	4U PvuII
Amplificado	15uL	15uL	15uL
Volumen final	20uL	20uL	20uL

Las enzimas para digestión, las condiciones de electroforesis y los fragmentos resultantes se encuentran en la tabla 6.

Tabla 6 Cebadores para PCR para los tres polimorfismos estudiados, enzimas de digestión y fragmentos resultantes.

Cebadores (5'->3')	Enzimas y secuencia palindrómicas	T°C/H	Electroforesis	Fragmentos resultantes*
Polimorfismo Ser447X (rs328) 5'-CTGATTCTGATGTGGCCTGA-3' 5'-CATGAAGCTGCCTCCCTTAG-3'	4U MnlI 5'...CCTC (N) ₇ ^...3' 3'...GGAG (N) ₆ ^...5'			Alelo C: 315bp y 20bp Alelo G: 256bp, 59bp y 20bp
Polimorfismo HindIII (rs320) 5'-GATGCTACCTGGATAATCAAAG-3' 5'-CTTCAGCTAGACATTGCTAGTGT-3'	4U HindIII 5'-A [▼] AGCTT-3' 5'-TTCGA [▲] A-3'	37°C 16 horas	Agarosa al 2%. 80 voltios por 1 hora	Alelo T: 140bp y 210bp Alelo G: 350bp
Polimorfismo PvuII (rs285) 5'-ATCAGGCAATGCGTATGAGGTAA-3' 5'-GAGACACAGATCTCTTAAGAC-3'	4U PvuII 5'-CAG [▼] CTG-3' 5'-GTC [▲] GAC -3'			Alelo C: 431bp Alelo T: 222bp y 209bp

Visualización de fragmentos de restricción

La visualización de los fragmentos de digestión obtenidos se hizo con electroforesis en gel de agarosa al 2%. 45 minutos de corrido a 80V. Para teñir los fragmentos de digestión obtenidos se usó bromuro de etidio y se visualizaron con la ayuda de un transiluminador.

Para identificar el tamaño del fragmento obtenido, se usó marcador de peso molecular de 50bp (Promega®).

7.5.5. Secuenciación

Se realizó secuenciación de 12 muestras con diferente genotipo para cada uno de los polimorfismos para confirmar que el fragmento que estaba siendo amplificado pertenecía al gen de interés y que la asignación nucleótida para los fragmentos de restricción obtenidos en gel de agarosa correspondían al polimorfismo que se deseaba identificar.

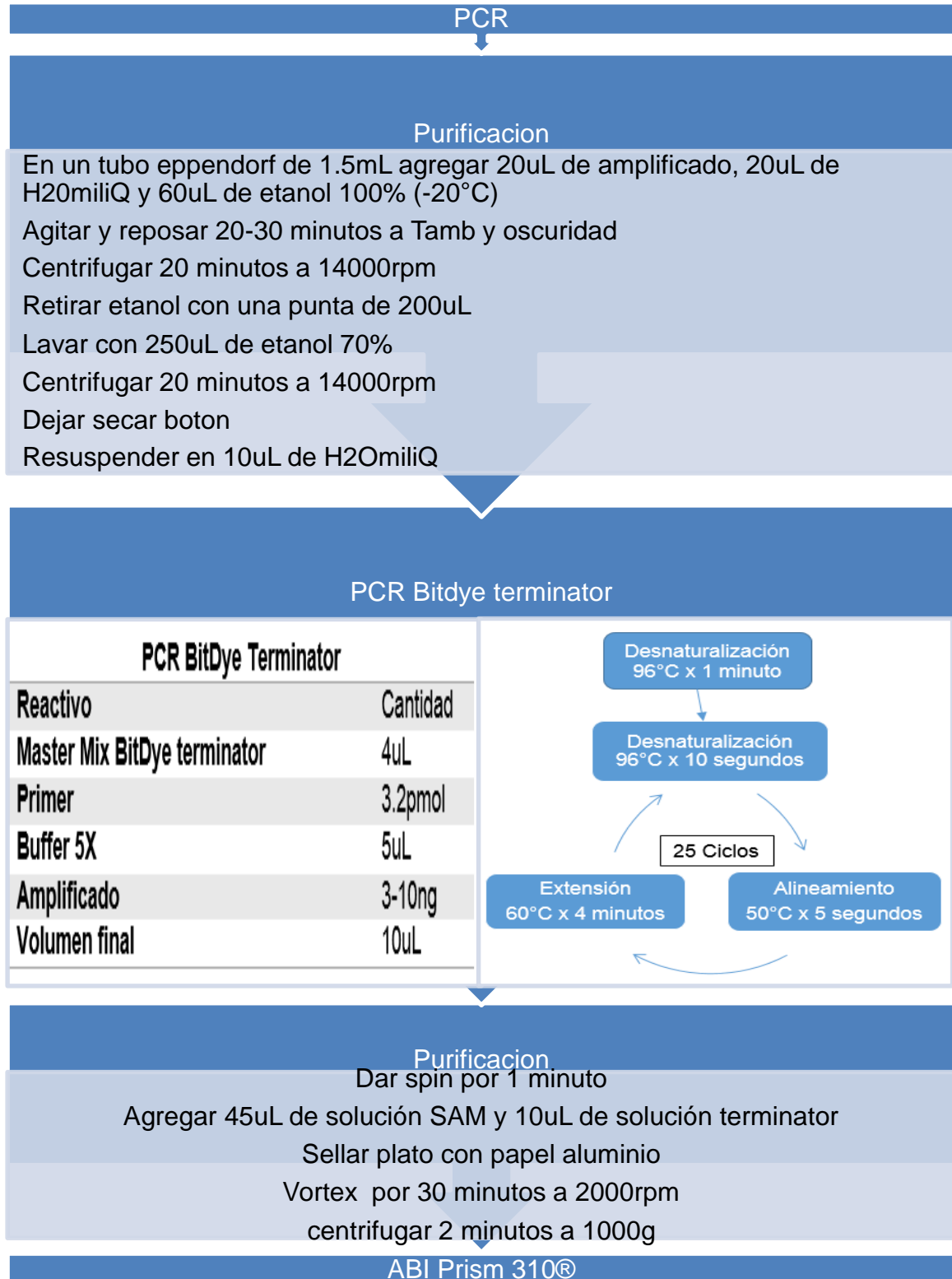
El kit usado para secuenciación fue “BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing kit” (Applied Biosystems®), la reacción de secuencia se fundamenta en el método enzimático de Sanger, en el cual se usan análogos dideoxirribonucleotidos (sin grupo 3’OH) que se incorporan a la cadena creciente de ADN, sin embargo el siguiente nucleótido no puede ser incluido, de esta forma la síntesis de la cadena de ADN se bloquea (Cooper., 2007). La reacción contiene cuatro dideoxynucleotidos que pueden ser agregados al mismo tiempo en la reacción, cada uno de los cuales se encuentra marcado con un fluorocromo (Tabla 7). Al incorporarse de manera aleatoria se van a crear un conjunto de fragmentos de ADN de diferentes longitudes, complementarios al molde de ADN que está siendo secuenciado con un dideoxynucleotido marcado. (Cooper., 2007)

El equipo funciona de manera automática, inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con polímero POP6 que funciona como gel de secuencia, permitiendo separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A medida que la cadena de ADN migra a través del gel, esta pasa por un láser que excita las sondas marcadas en los dideoxynucleotidos, emitiendo de esta forma luz que es detectada por un fotomultiplicador que está conectado a un computador que colecta y analiza los datos para determinar la secuencia de ADN. El protocolo de secuenciación utilizado se describe en la Figura 8.

Tabla 7 Identificación de dNTP en secuenciación

Color	Base	Fluorocromo
Azul	Citosina	5-FAM
Verde	Adenina	JOE
Amarillo	Guanina	TAMRA
Red	Timina	ROX

Figura 8. Protocolo de Secuenciación



7.6. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

Para el análisis se construyó una base de datos por duplicado, se verificó su contenido utilizando la herramienta Validate del software Epi Info®.

7.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.7.1 Cálculo de tamaño efectivo de la población

El tamaño efectivo de una población es el número de individuos en una población ideal (población hipotética en equilibrio de Hardy Weinberg, con tamaño estable, igual razón de sexo, no migración, mutación o selección) que tiene la misma magnitud de deriva genética aleatoria como la población que se está estudiando (Daniel L. Hartl, 1997).

Se evaluó el tamaño efectivo de la población teniendo en cuenta la razón de sexo (Hedrick, 2005). Debido a que diferencias en la distribución de hombres y mujeres en una población, crean un cuello de botella, ya que la mitad de los alelos en una generación deben venir de cada sexo, cualquier desviación de la igualdad en la razón de sexo puede aumentar la oportunidad de deriva genética aleatoria (Daniel L. Hartl, 1997; Hedrick, 2005).

El cálculo se hizo usando la fórmula:

$$N_e = \frac{4N_m N_f}{N_m + N_f}$$

7.7.2. Caracterización sociodemográfica

Se hizo utilizando medias y frecuencias con sus respectivas desviaciones estándar y porcentajes de las variables cuantitativas. Para comparar variables categóricas se utilizó la prueba de Chi cuadrado y para variables continuas la prueba t de Student. El procesamiento estadístico de las variables clínicas y demográficas se realizó utilizando el programa Stata12® y SPSS9® (Corp, 2010; support, 2011). En caso de encontrarse diferencias significativas entre las variables medidas en las poblaciones estudiadas se realizó una regresión logística ajustada por edad y género; dado los valores de las variables independientes, se estima la probabilidad de que se presente el ACV, la influencia de cada variable independiente sobre la presencia de ACV se evaluó en forma de OR intervalo de confianza del 95%. Un OR mayor que uno indica aumento de la probabilidad del evento y un OR menor que uno implica disminución (Lazcano-Ponce et al., 2001).

7.7.3. Análisis descriptivo de los polimorfismos

Las frecuencias alélicas y genotípicas en los grupos estudiados fueron calculadas usando el programa Arlequin3.5.1.2®(lab, 2010) y snpstats (Sole et al., 2006). La distribución de los alelos fue evaluada con una prueba de Chi cuadrado.

7.7.4. Análisis descriptivo de haplotipos

Las frecuencias para cada haplotipo se calcularon usando el programa Arlequin3.5.1.2® (lab, 2010), debido a que la fase gamética era desconocida; Arlequin® realizó el cálculo usando el algoritmo esperanza-maximización (EM). El cual es un procedimiento iterativo que permite obtener estimaciones de probabilidad máxima de las frecuencias de haplotipos a partir de datos de genotipo. Inicialmente estima frecuencias para cada posible haplotipo, posteriormente usa estas estimaciones para calcular las frecuencias genotípicas esperadas para cada fenotipo bajo HWE. Con las frecuencias de cada combinación de genotipos se pueden obtener las frecuencias de cada haplotipo. Este proceso se repite varias veces hasta que las frecuencias haplotípicas alcanzan el equilibrio (lab, 2010).

7.7.5. Test de equilibrio de Hardy Weinberg

Las frecuencias alélicas específicas observadas en casos y controles fueron evaluadas por medio de la prueba equilibrio de Hardy-Weinberg usando el programa Arlequin3.5.1.2® (lab, 2010). El estado de equilibrio ocurre cuando los apareamientos han ocurrido al azar (J.C et al., 2002; M.A et al., 2005). La presencia de un estado de equilibrio indica que la población estudiada es homogénea con respecto a la frecuencia y distribución de distintos alelos y no es una mezcla de subpoblaciones con distintas frecuencias y distribución de alelos para el gen estudiado (R et al., 2005). En este último caso (ausencia de equilibrio), si las subpoblaciones tienen diferente riesgo de presentar un accidente cerebrovascular, los casos y los controles no eran comparables. Para ajustar los resultados estadístico al hacer la comparación múltiple se usó la corrección de Bonferroni, debido a que si se manejaba un valor p 0,05 existía una probabilidad de 5% de cometer un error estadístico tipo 1 (rechazar falsamente la hipótesis nula). Aplicando la corrección de Bonferroni, el valor p 0,05 se dividió en el número de marcadores evaluados (3), dando un nuevo valor p de 0,016 (J.C et al., 2002).

7.7.6. Estructura genética

El análisis de estructura es importante en estudios de asociación ya que la existencia de estructura puede llevar a resultados falsos positivos (M.A et al., 2005).

El índice de fijación (F_{st}) mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones y por tanto la diferenciación genética entre ellas, evaluando el efecto

de las divisiones de una población en la heterocigocidad de las subpoblaciones debido al efecto de la deriva genética (M.A et al., 2005). Un valor cercano a 0 indica que no hay subpoblaciones y no existen divergencias genéticas entre las poblaciones y con un valor cercano a 1 indica subestructura extrema. Es así como valores entre 0 y 0,05 se pueden considerar como indicativos de poca diferenciación genética insignificante, el rango entre 0,05 y 0,15 indica moderada diferenciación genética, valores entre 0,15 y 0,25 indican grande diferenciación genética y valores superiores a 0,25 indican diferenciación genética altamente significativa (Daniel L. Hartl, 1997).

La distribución de los valores de F_{st} toma como hipótesis la no diferencia entre las poblaciones y se obtiene permutando haplotipos entre poblaciones, el valor p de la prueba es la proporción de permutaciones que conducen a un valor F_{st} mayor o igual al observado (lab, 2010).

El cálculo de estructura genética se hizo en el programa Arlequin® con un nivel de significancia del 0,05 (lab, 2010).

7.7.7. Análisis de asociación de polimorfismos con el ACV

Para controlar posibles sesgos dentro del estudio se realizó una regresión logística, en la cual se incluyeron las variables de confusión (Edad y género) en un modelo matemático. Debido al alto riesgo de perder muestras no se hizo apareamiento de variables.

La asociación entre el genotipo y el fenotipo se determinó por odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%. Las probabilidades de tener un alelo específico es definida como la frecuencia de sujetos portadores entre la frecuencia de sujetos no portadores. El OR para la ACV es la probabilidad del grupo de enfermos de tener el alelo asociado con el desarrollo del accidente cerebrovascular relacionado con el grupo de los no enfermos (E et al., 2001). Un valor de p 0,05 fue considerado estadísticamente significativo en todos los análisis. Dicho análisis se hizo en el programa Stata12®, SPSS9® y snpstats (Corp, 2010; Sole et al., 2006; support, 2011).

Modelos de herencia

Para estimar adecuadamente el grado de asociación usando OR se definieron modelos de herencia para cada marcador. Por ejemplo, para Ser447X la mutación C es un SNP en el que el alelo variante G modifica la exposición de la enfermedad de interés. Ya que cada individuo posee una pareja de alelos, el riesgo asociado

con cada genotipo puede depender del número de copias de G (Lewis, 2002; Lewis et al., 2012; R et al., 2005).

- ☀ Modelo dominante: supone que una única copia de G es suficiente para modificar el riesgo y ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud. De esta forma se comparan homocigotos GG y heterocigotos CG con los homocigotos CC.
- ☀ Modelo recesivo: supone que son necesarias dos copias de G para modificar el riesgo, así, se comparan heterocigotos CG y homocigotos CC con homocigotos GG.
- ☀ Modelo codominante: cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente. Se comparan los heterocigotos y homocigotos variantes por separado respecto a los homocigotos del alelo más frecuente.

7.7.8. Test de desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento, es la tendencia de los alelos de dos loci separados, pero ligados, de encontrarse juntos con más frecuencia de lo que podría esperarse únicamente por la casualidad (B.S, 1996; J.C et al., 2002; M.A et al., 2005). Esto se evaluó mediante la estimación de las frecuencias observadas de los haplotipos específicos, es decir, las posibles combinaciones de alelos en el loci HindIII, PvuII y Ser447X, se usó el programa Arlequin3.5.1.2® para realizar dicho cálculo (lab, 2010). Se usó la prueba de chi cuadrado con un grado de libertad y un valor $p=0,05$, en donde valores mayores a este permitirán rechazar la hipótesis nula de no desequilibrio de ligamiento en los marcadores analizados (R et al., 2005).

7.7.9. Análisis de asociación de los haplotipos con la enfermedad

Los posibles haplotipos se analizaron en relación con la enfermedad mediante un modelo de regresión logística usando el programa snpstats (Sole et al., 2006).

7.8. ASPECTOS ÉTICOS

El proyecto es de “riesgo mínimo”, según el numeral B del artículo 10 de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de la República de Colombia y los lineamientos contemplados en la última versión de la Declaración de Helsinki. Los objetivos de este estudio estaban contenidos desde el comienzo en el estudio FREC-VI y las personas que ingresaron como casos y controles realizaron el procedimiento del consentimiento informado en el que se especificó los objetivos de este estudio, por lo que no se requiere del proceso de re-consentimiento.

La participación fue voluntaria y no se proporcionó retribución económica por ella. La información recolectada en el estudio fue estrictamente confidencial y sólo estuvo disponible para los investigadores bajo un sistema de codificación desarrollado en el estudio, en el que no se cuenta con los nombres de los pacientes. No se manejó información catalogada sensible. Los resultados del estudio se publicarán, pero en ningún caso se identificará personalmente a ninguna persona participante en el estudio.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad Industrial de Santander. Durante la investigación se preservaron los principios de beneficencia, no maleficencia, autonomía y justicia

7.9. CONTROL DE CALIDAD

Las muestras de sangre ya colectadas se encontraban almacenadas e identificadas con un código interno. Toda la información recolectada se registró en formatos diseñados y estandarizados (CRF). Las bases de datos fueron digitadas por duplicado y todos los errores de digitación detectados fueron corregidos.

A nivel de laboratorio los analistas se encontraban enmascarados. Para cada ensayo se usaba un control positivo y un control negativo. La lectura de los geles de agarosa se hizo por duplicado. La estudiante de maestría hizo registro fotográfico de cada uno de los geles, lectura correspondiente y digitalización en base de datos, posteriormente los peritos del laboratorio de genética hacían lectura de la foto de los geles y las consignaban en una base de datos. Finalmente se comparaban las lecturas de los dos analistas. Adicionalmente, el 10% de las muestras se procesaron por duplicado.

La oficina de diseño y desarrollo de proyectos del Instituto del Corazón de la FCV fue la responsable por el manejo de los datos. Cuando los datos estuvieron correctamente consignados (doble digitación de la nueva información), se calcularon las medias y rangos y se cruzaron las variables relevantes para identificar inconsistencias o valores extremos, los cuales podrían resultar de errores del manejo de los datos (análisis de consistencia interna). Cualquier error detectado fue corregido usando el formato original y los reportes de laboratorio como referencia, preservando las bases originales sin cambios. Todas las modificaciones de las bases de datos fueron documentadas.

7. RESULTADOS

8.1. TAMAÑO DE MUESTRA

La FCV entrego 716 buffy coat, sin embargo algunas muestras no eran de buena calidad, al tener coágulos o la cantidad de muestra insuficiente para hacer la extracción, fue así como se logró extraer 701 ADN. Esta cantidad se sometió a PCR-RFLP para cada uno de los polimorfismos sin embargo algunas muestras no se pudieron genotipificar para los tres polimorfismos. Quedando con genotipificación completa 646 muestras.

Al evaluar la base de datos construida por la FCV, se encontró que no todos los pacientes tenían la información completa para cada una de las variables. La proporción de datos incompletos era alta, y si se usaban las variables planteadas inicialmente en el estudio, habría una pérdida de todos los controles. Una estrategia para recuperar información era realizar permutaciones, sin embargo la información faltante era mayor al 2%, fue así como esta metodología no se usó para garantizar la fiabilidad de los resultados respecto a los datos reales. Por lo tanto se usó el método de eliminación mediante lista (Pigott, 2001), en donde solo se analizaron casos con datos disponibles completos para cada variable. Se decidió evaluar solo las variables relacionadas con la lipoproteína lipasa (Edad, género, triglicéridos colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, colesterol VLDL, uso de hipolipemiantes y los genotipos para cada polimorfismo). Finalmente, para el análisis estadístico se usaron 402 muestras. El cálculo de genética de poblaciones acerva un tamaño efectivo de la población de 401 sujetos.

El cálculo de tamaño de muestra se realizó con el software EPIDAT 4®, teniendo en cuenta la frecuencia del alelo de menor prevalencia para los polimorfismos HindIII, Pvull y Ser447X en los casos, reportado en previos estudios.

En el estudio de Nicklas et al, (2000), realizado en población estadounidense se encontró que la frecuencia de menor prevalencia para el polimorfismo HindIII fue el alelo G (39%), para Pvull fue el alelo T (49%) y en Ser447X fue el alelo G (15%) (Nicklas et al., 2000), esta última prevalencia fue la usada para el cálculo del tamaño de muestra al ser la más baja de los tres polimorfismos analizados en los casos. Los parámetros para el cálculo de tamaño de muestra que se tuvieron en cuenta fueron: nivel de confianza 95%, poder 86%, riesgo relativo esperado (RRE) para HindIII y Pvull de 2,0 y para Ser447X 0,5, la relación caso: control 1:1. El tamaño de muestra arrojado por el software se observa en la tabla 8.

Tabla 8 Cálculo del tamaño de muestra

Polimorfismo	Alelo	Frecuencia (%)	RRE	Tamaño de muestra		Referencia
				Casos	Controles	
HindIII (rs320)	G	39	2,0	182	182	(Nicklas et al., 2000)
PvuII (rs285)	T	49	2,0	162	162	
Ser447X (rs328)	G	15	0,5	244	244	

Considerando que la información sociodemográfica y clínica de los pacientes se encontraba incompleta y no todas las muestras recolectadas por la FCV tuvieron una genotipificación, fue necesario ajustar el tamaño de muestra. De esta forma se hizo el cálculo del poder para cada uno de los polimorfismos teniendo en cuenta la cantidad de muestra disponible (402). Tabla 9.

Tabla 9 Cálculo de poder de tamaño de muestra

Polimorfismo	Alelo	Frecuencia (%)	RRE	Poder (%)	Referencia
HindIII (rs320)	G	39	2,0	89.3	(Nicklas et al., 2000)
PvuII (rs285)	T	49	2,0	92.5	
Ser447X (rs328)	G	15	0,5	78.8	

8.2. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Se estudiaron 402 individuos, los cuales se encontraban distribuidos en 133 casos y 269 controles. La edad promedio de los casos fue 69 años (27-93 años) y 64 años (26-92 años) en los controles. Los valores de las variables entre los casos y los controles fueron comparables, excepto en las variables edad, colesterol total y colesterol HDL, en las cuales se encontraron diferencias significativas. Las características sociodemográficas de la población estudiada se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10 Característica sociodemográficas y bioquímicas

Variables	Casos (n=133)	Controles (n=269)	p
Edad (años)	69 (27-93)	64 (26-92)	0.001*
Hombres: Mujeres	75:58	133:136	0.190**
Triglicéridos (mg/dL)	162.48 ± 93.95	156.40± 68.46	0.461*
Colesterol total (mg/dL)	201.35 ± 52.88	212 ± 43.88	0.033*
Colesterol LDL (mg/dL)	129.43 ± 44.42	130.61± 41.11	0.790*
Colesterol HDL (mg/dL)	39.42 ± 12.32	50.17 ± 12.66	0.000*
Colesterol VLDL	32.81 ± 18.78	32.59 ± 17.87	0.908*
Hipolipemiantes (%)	16 (12%)	45 (16.7%)	0.217**

*Los valores se dan en media +/- desviación estándar o número de sujetos con porcentaje de total en paréntesis. Valores p se calcularon usando el *t-Student o la **prueba de chi cuadrado*

Los triglicéridos en las poblaciones estudiadas se encontraban en el nivel límite alto, lo mismo sucedió con el colesterol total que arrojó niveles intermedios altos. El nivel de LDL en los casos era el óptimo sin embargo para los controles era intermedio alto; este comportamiento fue balanceado al contrastar con los niveles de HDL los cuales se encontraban inferiores al valor saludable en los casos, mientras que el valor de HDL en los controles tenían un valor saludable que no representaba riesgo para ACV. El nivel de VLDL en los casos y en los controles se encontraba dentro del rango normal. Estas conclusiones son resultado de comparación con los valores de referencia establecidos por el “National Cholesterol Education Program”. Se resalta que a pesar de no haber diferencias significativas, el porcentaje de controles que se encontraban en tratamiento con hipolipemiantes fue mayor que el observado en los casos.

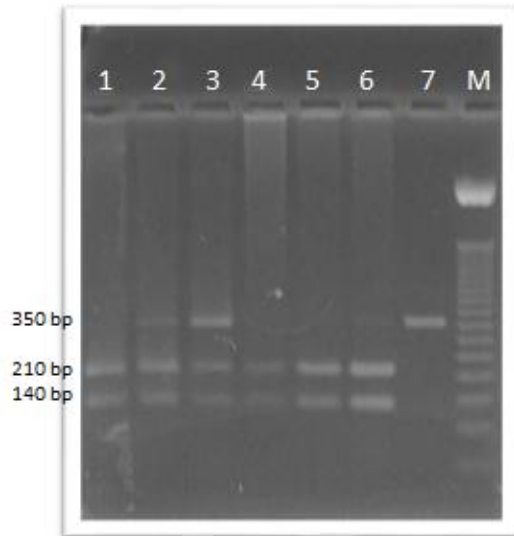
Aquellas variables con diferencias significativas fueron sometidas a una regresión logística en la cual la edad tuvo un valor OR de 1,04 (IC 95% 1.03–1.05), el colesterol total tuvo un valor OR de 1 (IC 95% 0.99–1) y los niveles de colesterol HDL tuvo un OR 0.94 (IC 95% 0.93-0.95).

8.3. RESULTADOS DE LA TIPIFICACIÓN

8.3.1. Electroforesis en agarosa

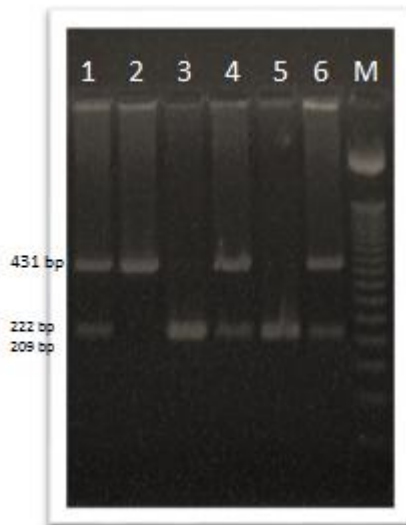
En las figuras 9, 10 y 11, se observan fotografías de los geles de agarosa para cada uno de los polimorfismos en donde se realizó la corrida de los resultados de digestión para determinar el genotipo.

Figura 9. RFLP para HindIII (rs320)



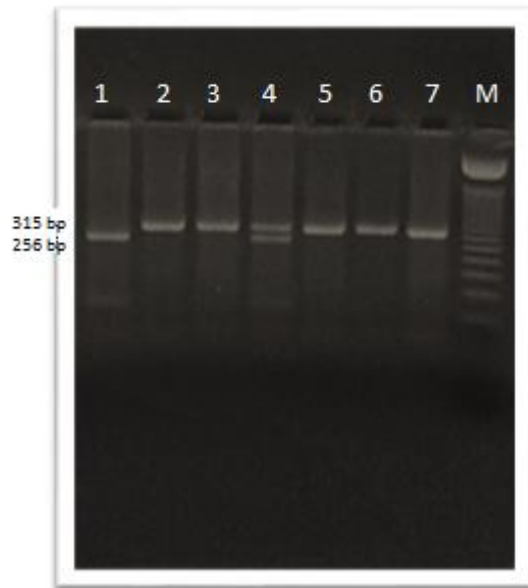
Agarosa 2%. Pozo 1, 4, 5, 6 genotipo TT; pozo 2, 3, genotipo GT; Pozo 7, genotipo GG; M, Marcador de peso molecular 50bp

Figura 10. RFLP para PvuII (rs285)



Agarosa 2%. Pozo 1, 4, 6, Genotipo CT; Pozo 2, genotipo CC; pozo 3,5, genotipo TT; M, Marcador de peso molecular 50bp

Figura 11. RFLP para Ser447X (rs328)



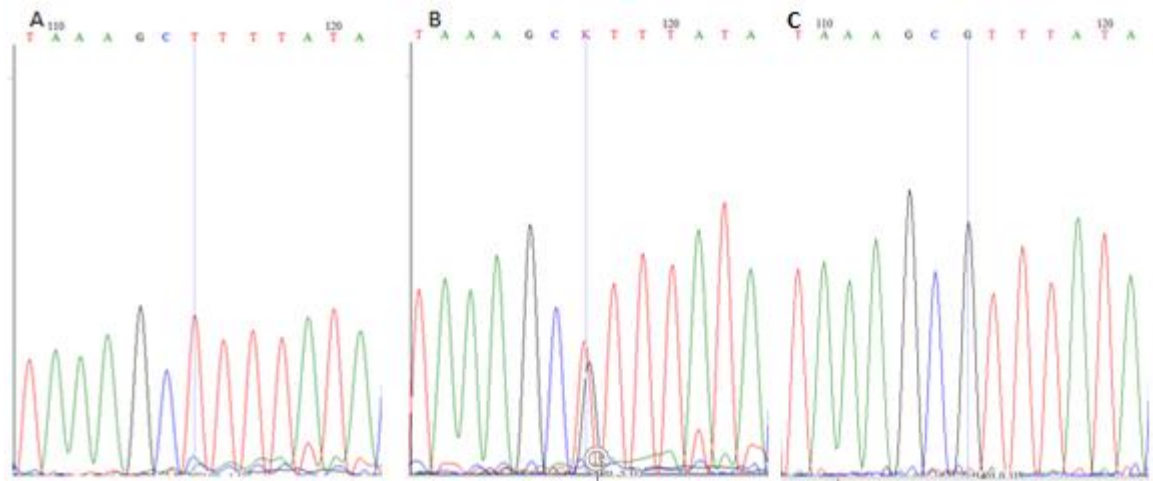
Agarosa 2%. Pozo 1, genotipo GG; pozo 2, 3, 5, 6, 7 Genotipo CC; pozo 4 genotipo CG; M, Marcador de peso molecular 50bp

8.3.2. Secuenciación

El análisis de las secuencias se realizó en la base de datos Blast. Para cada secuencia analizada la máxima similitud se encontraba para “Homo sapiens lipoprotein lipase (LPL), RefSeqGene on chromosome 8”. Teniendo mayor porcentaje de alineamiento y un “e-value” inferior a 1 dando significancia a la similitud de las secuencias evaluadas con la registrada en la base de datos. Además, en la visualización “graphics” fue posible identificar la ubicación del fragmento secuenciado (intrón, intrón o exón).

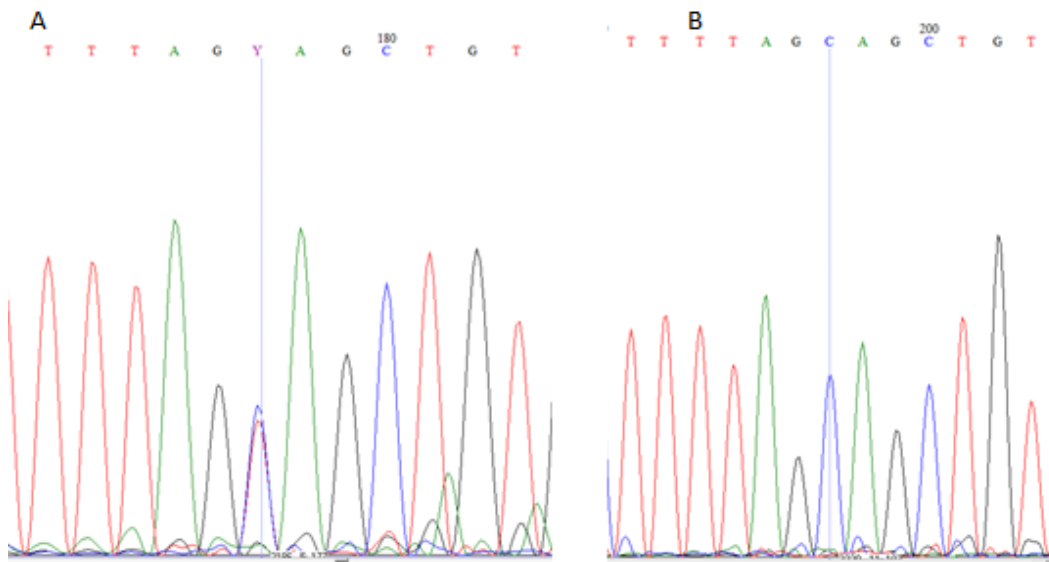
En la figura 12, 13 y 14 se observan electroferogramas que evidencian la identificación del nucleótido para cada polimorfismo estudiado.

Figura 12. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo HindIII (rs320) del gen LPL



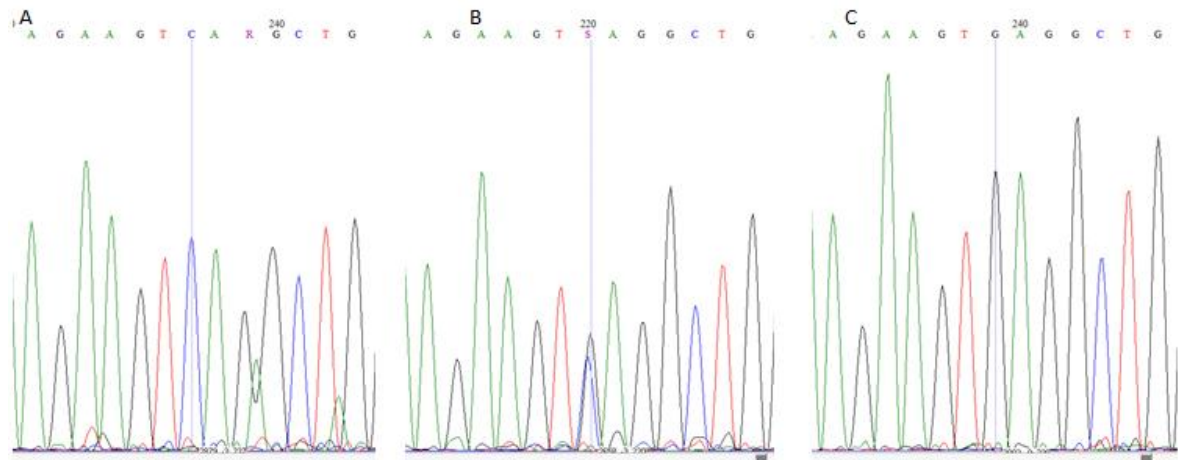
Muestra de un individuo homocigoto para TT (A), heterocigoto (B), homocigoto para GG (C).

Figura 13. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo PvuII (rs285) del gen LPL



Muestra de un individuo heterocigoto (A), homocigoto para CC (B)

Figura 14. Secuenciación de ADN genómico alrededor del polimorfismo Ser447X (rs328) del gen LPL.



Muestra de un individuo homocigoto para CC (A), heterocigoto (B), homocigoto para GG (C).

8.4 ANÁLISIS POBLACIONAL

8.4.1. Frecuencias genotípicas y alélicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los grupos estudiados no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, los valores se muestran en la tabla 11. Las frecuencias genotípicas y alélicas para HindIII tuvieron comportamiento similar tanto en casos como en controles, siendo el genotipo TT el más frecuente tanto en los casos (52%) como en los controles (51%). El genotipo más frecuente entre casos y controles para PvuII, fue el heterocigoto (CT); con una frecuencia de 48% y 45% respectivamente. En el polimorfismo Ser447X; el alelo G tuvo baja frecuencia tanto en casos (9%) y controles (7%) y el genotipo homocigoto para este alelo (GG) tuvo la menor frecuencia tanto en los casos como en los controles; 1%.

Tabla 11 Frecuencia genotípica y alélica para polimorfismos HindIII, PvuII y Ser447X

	Genotipo, n (%)			Frecuencia alélica
	GG	GT	TT	Alelo T (%)
HindIII (rs320)				
Control (n=269)	29 (11%)	103 (38%)	137 (51%)	70%
Caso (n=133)	18 (14%)	46 (35%)	69 (52%)	69%
Valor <i>p</i>	0.42	0.47	0.86	0.79
PvuII (rs285)				Alelo T (%)
Control (n=269)	73 (27%)	121 (45%)	75 (28%)	50%
Caso (n=133)	43 (32%)	64(48%)	26 (20%)	44%
Valor <i>p</i>	0.28	0.55	0.07	0.07
Ser447X (rs328)				Alelo G (%)
Control (n=269)	232 (86%)	34 (13%)	3 (1%)	7%
Caso (n=133)	110 (83%)	22 (17%)	1 (1%)	9%
Valor <i>p</i>	0.35	0.29	0.73	0.43

Valores *p* se calcularon usando la prueba de chi cuadrado

8.4.2. Frecuencias haplotípicas

Los resultados arrojaron 8 haplotipos posibles para los controles y 7 para los casos. El haplotipo que no se encuentra en los casos tuvo la menor frecuencia en los controles. El haplotipo más común entre los casos y los controles fue TTC, el cual contiene los alelos ancestrales para los tres polimorfismos. Las frecuencias para cada haplotipo se encuentran en la tabla 12.

Tabla 12 Posibles haplotipos y su frecuencia

Haplotipos	Control (n=269)	Caso (n=133)
GCC	0.142029	0.152887
GCG	0.062569	0.076229
GTC	0.092914	0.079155
GTG	0.001744	0
TCC	0.286836	0.327536
TCG	0.004849	0.007258
TTC	0.403871	0.350197
TTG	0.005187	0.006738

8.4.3. Test de equilibrio de Hardy Weinberg

El polimorfismos HindIII en los casos estaba por fuera del equilibrio de Hardy Weinberg con una significancia de *p* 0,05. Sin embargo se realizó ajuste según la corrección de Bonferroni, *p* 0,016, de esta forma la distribución de las frecuencias genotípicas para los polimorfismos estudiados fue similar tanto en los casos como

en los controles, y no se observaron diferencias significativas entre la prevalencia del genotipo en los grupos estudiados indicando que se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg. Los valores se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13 Equilibrio de Hardy Weinberg

Locus	Estado	n	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad esperada	Valor p
HindIII (rs320)	Control	269	0.38290	0.42019	0.14718
	Caso	133	0.34586	0.42809	0.04079
PvuII (rs285)	Control	269	0.44981	0.50090	0.11287
	Caso	133	0.48120	0.49369	0.85937
Ser447X (rs328)	Control	269	0.12639	0.13790	0.16812
	Caso	133	0.16541	0.16479	1.00000

Valor p calculado usando prueba de chi cuadrado. $p < 0,016$.

8.4.4. Estructura genética

El resultado obtenido en F_{st} fue 0,00178, valor que se encuentra dentro del rango de 0 a 0.05, indicando que la población tiene poca diferenciación genética (J.C et al., 2002).

8.4.5. Análisis de asociación entre polimorfismos y ACV

Para estudiar la posible asociación entre los polimorfismos estudiados y el desarrollo de ACV se calculó OR para cada uno de los modelos de herencia y los alelos. El grado de correlación para cada uno de los polimorfismos no fue significativo en ningún tipo de modelo de herencia. Tabla 14.

Tabla 14 Análisis de asociación para cada modelo de herencia

Polimorfismo	Modelo	Genotipo	OR	IC 95%
HindIII (rs320)	Codominante	TT	1	
		GT	0.89	0.56 - 1.39
		GG	1.23	0.64 - 2.37
	Dominante	GG	1	
		GT-TT	0.77	0.41 - 1.45
	Recesivo	GG-GT	1	

Polimorfismo	Modelo	Genotipo	OR	IC 95%
Pvull (rs285)	Codominante	TT	1.04	0.68 - 1.57
		CC	1	
		CT	0.90	0.55 - 1.46
	Dominante	TT	0.59	0.33 - 1.05
		CC	1	
		CT-TT	0.78	0.50 - 1.22
	Recesivo	CC-CT	1	
		TT	0.63	0.38 - 1.04
Ser447X (rs328)	Codominante	CC	1	
		CG	1.36	0.76 - 2.44
		GG	0.70	0.07 - 6.83
	Dominante	CC	1	
		CG-GG	1.31	0.74 - 2.31
	Recesivo	CC-CG	1	
		GG	0.67	0.07 - 6.52

8.4.6. Análisis de asociación de los haplotipos con ACV

Se realizó una regresión logística para ajustar la razón de momios teniendo en cuenta posibles parámetros de confusión como la edad y el género. A pesar de esto el estudio de asociación entre los haplotipos y el ACV no mostró diferencias significativas con ninguno de los haplotipos obtenidos. Tabla 15.

Tabla 15 Asociación haplotípica ajustada por edad y género

HAPLOTIPO	OR	IC 95%	p
TTC	1		
TCC	0.75	0.52-1.08	0.12
GCC	0.80	0.50 - 1.27	0.35
GTC	1.07	0.56 - 2.03	0.84
GCG	0.77	0.42 - 1.42	0.4
***	0.83	0.18 - 3.82	0.81

***Haplotipos con menor frecuencia (GTG, TCG, TTG)

8.4.7. Desequilibrio de ligamiento

Debido a que la fase gamética es desconocida, el procedimiento para evaluar el nivel de significancia de la asociación entre pares de loci se realizó comparando la probabilidad que la muestra evaluada bajo la hipótesis de no asociación entre loci (que estén en equilibrio) contra la probabilidad de la muestra cuando los loci están asociados. Encontrándose para todos los pares de loci valores p menores a 0,05. Lo cual indica que existe asociación gamética entre los loci.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se ha estudiado en diferentes poblaciones la posible asociación entre el desarrollo del accidente cerebrovascular con la presencia de los polimorfismos PvuII, HindIII y Ser447X, presentes en el gen de la lipoproteína lipasa; observándose diferencias en los resultados obtenidos entre las poblaciones estudiadas. En Latinoamérica, hasta la fecha solo se han publicado estudios de este tipo en Brasil en donde en tres estudios diferentes encontraron asociación de HindIII, PvuII y Ser447X ya sea con el perfil lipídico o con el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular (Gigek Cde et al., 2007; Salazar et al., 2000; Sepetiba et al., 2007). La presente investigación es la primera que se realiza en Colombia en busca de asociación genética con el desarrollo de ACV de los polimorfismos PvuII, HindIII y Ser447 en el gen *LPL* con el desarrollo de ACV.

Estudios de ancestría en Colombia revelan que las mayores diferencias genéticas se encuentran entre la población que habita la región pacífica y caribe comparada con la población que habita la región de los Andes (Ibarra et al., 2014). Las ciudades en donde se realizó el muestreo para el presente estudio geográficamente se encuentran en la región andina (Bucaramanga, Medellín, Bogotá y Cali), en un estudio de genética forense publicado por Ibarra et al. (2014), demuestra que sujetos de dichas poblaciones se pueden agrupar al no tener diferencias significativas en las frecuencias alélicas (Ibarra et al., 2014). Al realizar comparaciones de las frecuencias alélicas y genéticas obtenidas en el presente estudio y las frecuencias consignadas en la base de datos “dbSNP short genetic variations” se tomó como referencia las europeas teniendo en cuenta que estudios genéticos en la población colombiana demuestran que en promedio las poblaciones de la región andina urbana, tienen ancestría autosómica amerindia y europea, con relativamente baja ancestría africana (Rojas et al., 2010). Adicionalmente, el cálculo de estructura poblacional demostró que no hay evidencia de estructura genética en la muestra poblacional colombiana usada para el presente estudio.

Las frecuencias genéticas y alélicas para Ser447X, HindIII y PvuII fueron similares a las reportadas en HapMap para grupos poblacionales europeos y en otros estudios de asociación realizados (Anderson et al., 1999; Mattu et al., 1994; Morabia, 2003; Nicklas et al., 2000). Según HapMap, en la población europea los genotipos para PvuII se encuentran distribuidos de una manera equitativa entre la forma ancestral homocigota, heterocigota y homocigota mutada del locus, siendo similares a las encontradas en la población colombiana. Por otra parte, las frecuencias alélicas en la población colombiana se distribuyen de una manera similar que en la población española.

Al realizar el análisis genotípico entre los casos y los controles las frecuencias alélicas para HindIII, PvuII y Ser447X se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este hallazgo indica que no hay diferencias significativas entre la prevalencia de los genotipos correspondientes a los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa HindIII, PvuII y Ser447X, lo que sugiere una falta de asociación de dichos polimorfismos con el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular (R et al., 2005).

El desequilibrio de ligamiento hallado era de esperarse debido a que los marcadores analizados se encuentran en el mismo cromosoma y gen, además se encuentran muy cercanos (intrón 6, intrón 8 y exón 9). Estos hallazgos se han observado en otras publicaciones (Abu-Amero et al., 2003; Anderson et al., 1999; Fidani et al., 2005; Gambino R, 1999; Georgiev et al., 2008; Gigeck Cde et al., 2007; Jemaa R, 1995; Kuivenhoven et al., 1997; Mattu et al., 1994; Morabia, 2003; Munshi et al., 2012; Nicklas et al., 2000; Parfenov et al., 2007; Rebhi et al., 2012; Shimo-Nakanishi et al., 2001; Stocks et al., 1992; Thorn et al., 1998; Xu et al., 2008). Japoneses mostraron que Ser447X está en desequilibrio de ligamiento con HindIII y PvuII. Estudios realizados en Japón (Shimo-Nakanishi et al., 2001) y Túnez (Rebhi et al., 2012) evaluaron desequilibrio de ligamiento encontrando que HindIII, PvuII y Ser447X se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

En el presente estudio no se evaluó la asociación de los polimorfismos con alteraciones en el perfil lipídico, debido a que previos estudios han fallado en encontrar dicha asociación llevando a resultados inconsistentes. (Kay et al., 2002; Sing et al., 1999; Stepanov et al., 1998).

Se realizó una regresión logística a las variables en donde se observaron diferencias significativas entre los casos y los controles, encontrándose que la edad actúa como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular. Por otra parte los niveles de colesterol HDL se comportan como un factor de protección para el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular, lo que corrobora lo reportado en la literatura (*Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*, 2011; *The global burden of disease: 2004 update*, 2008.; *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, 2011.; Harmsen et al., 2009).

Los resultados de asociación teniendo en cuenta los tipos de herencia dominante, recesivo y codominante de los polimorfismos HindIII, PvuII y Ser447X en el gen de la Lipoproteína lipasa, indican que no se encontró asociación entre dichos marcadores con el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular, sin embargo, se debe tener en cuenta la posibilidad que exista una muy baja asociación de los marcadores, que el tamaño de muestra poblacional usado no fue suficientemente grande para detectarla o la existencia de otros marcadores de exposición para el

ACV. El poder de los resultados obtenidos para los polimorfismos HindIII y PvuII tienen un valor estadístico superior al 86%. El poder obtenido para Ser447X fue inferior al 86%, por tanto el análisis de asociación es insuficiente en poder, sin embargo se están aportando datos de prevalencia de dicho polimorfismo en la muestra poblacional colombiana utilizada.

Varios estudios han evaluado la posibilidad que los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa HindIII, PvuII, Ser447X se encuentren asociados con el desarrollo del accidente cerebrovascular. En el caso de la mutación Ser447X ha sido analizada extensamente pero los resultados de su actividad lipolítica y su efecto como factor de protección varían. En Francia, Reino Unido, Brasil, Holanda, se encontró que el alelo mutado de Ser447X (G), tenía un efecto al disminuir los niveles de TG y VLDL pero una correlación positiva con los niveles de HDL (Gigek Cde et al., 2007; Jemaa R, 1995; Kuivenhoven et al., 1997; Sepetiba et al., 2007). En Reino Unido se encontró que los controles con la mutación en Ser447X no tenían alteraciones en el perfil lipídico, sin embargo había una tendencia a altos niveles de HDL. Adicionalmente, se observaron diferencias significativas entre los individuos con hipertrigliceridemia primaria comparada con normolipémicos controles. Por tanto, permite plantear que la mutación puede actuar como efecto protector contra el desarrollo de hipertrigliceridemia (Stocks et al., 1992). Tanto en Suiza (Morabia, 2003) como en Grecia (Fidani et al., 2005) el estudio de asociación de Ser447X con ACV, no evidenció asociación, una de las posibles causas puede ser el tamaño de muestra usado (87 casos y 92 controles). Por otra parte, existen estudios en donde han encontrado resultados significativos en poblaciones más pequeñas, planteando la existencia de otros factores, principalmente de tipo ambiental que puedan estar afectando el desarrollo de ACV (Fidani et al., 2005).

Estudios realizados en las poblaciones de Estados Unidos, Gales, India, Japón, Brasil, China; coinciden al encontrar asociación entre el genotipo y el polimorfismo HindIII con el desarrollo de ACV, su severidad y alteraciones en el perfil lipídico (Mattu et al., 1994; Munshi et al., 2012). En Brasil el alelo T mostró una asociación significativa con el infarto al miocardio, el genotipo GG mostró una tendencia de asociación con altos niveles de HDL (Sepetiba et al., 2007). En Túnez el alelo T, considerado uno de los marcadores de predisposición para estenosis coronaria, se encontró asociación entre los genotipos TT y TG con la estenosis, sin embargo no se encontró asociación significativa con los niveles lipídicos. Los hallazgos hechos proponen que HindIII podría estar relacionado con una mutación funcional que cambia la actividad de LPL (Rebhi et al., 2012). El análisis de asociación de HindIII y el perfil lipídico de individuos sanos alemanes evidenció que solo en mujeres el alelo mutado estuvo asociado con altas concentraciones de colesterol total y LDL, sin embargo no demostró una asociación significativa entre el genotipo HindIII con el Colesterol HDL o TG, por tanto plantean que no se encuentra asociación entre el polimorfismo y la actividad de la LPL. Además proponen que los portadores del alelo

(GG) tendría un marcador de protección debido a que este se encontró asociado con bajos niveles de colesterol en sujetos portadores (Larson et al., 1999). Estudios realizados en Japón y China encontraron que la mutación puede ser un marcador protector contra el desarrollo de aterosclerosis (Shimo-Nakanishi et al., 2001; Xu et al., 2008). En Estados Unidos analizaron mujeres con sobrepeso menopaúsicas y no encontraron que el polimorfismo HindIII esté asociado con la actividad de la LPL, plantean como posible causa la ubicación de dicho polimorfismo (intrón 6) que posiblemente no cause una alteración en la función de LPL y puede estar en LD con otro o más mutaciones funcionales cercanas (Nicklas et al., 2000). En Rusia por su parte no observaron asociación entre HindIII en el grupo en general, sin embargo al agrupar los pacientes de acuerdo al género se encontró asociación solo en las mujeres; destaca el hecho que el tamaño de muestra usado era pequeño por tanto sugieren que se replique el estudio en un grupo más grande de casos y controles (Parfenov et al., 2007).

En un estudio hecho en Pensilvania se encontró que el genotipo mutado de PvuII; está asociado con CAD (Anderson et al., 1999). En la población china se estudió la relación entre el polimorfismo PvuII y el accidente cerebrovascular encontrándose una alta frecuencia del genotipo mutado (TT) en los casos comparado con controles, sugiriendo que dicho genotipo es un marcador de riesgo para el accidente cerebrovascular, también encontraron que dicho genotipo estaba asociado con altos niveles de TG y bajos niveles de HDL (Liu et al., 2004). Hallazgos similares fueron hechos en mujeres embarazadas brasileñas en donde se observó una asociación significativa entre el genotipo mutado y el aumento en el colesterol LDL (Sepetiba et al., 2007). En mujeres posmenopáusicas obesas estadounidenses se encontró que las pacientes con el alelo mutado tienen un perfil lipídico aterogénico y altos niveles de glucosa plasmática (Nicklas et al., 2000). En la población francesa, encontraron asociación entre el polimorfismo y la severidad de las lesiones coronarias (Jemaa R, 1995), hallazgos similares fueron hechos en la población australiana en donde se observó una fuerte asociación entre dicho polimorfismo y el número de vasos afectados, un hallazgo importante fue que los pacientes australianos que tenían genotipo mutado eran más propensos a tener diabetes (Wang et al., 1996). De esta forma dichos estudios proponen que PvuII es un posible marcador para una mutación funcional que altera la actividad de LPL e interfiere con el metabolismo de los ácidos grasos. Por otra parte, en Macedonia no se encontró asociación con PvuII, los autores proponen que la etiología de CAD tiene muchos factores de riesgo involucrados y es el resultado de una compleja interacción entre marcadores genéticos e influencias ambientales. Ellos usaron 109 casos y 32 controles, pero sugieren repetir dicho estudio con un tamaño de muestra mayor, adicionar más mutaciones y polimorfismos y no excluir diferencias étnicas (Georgiev et al., 2008). Lo mismo ocurre en China, en donde no hubo asociación significativa de HindIII con CI y tampoco con el perfil lipídico, planteando que posiblemente dicho polimorfismo no afecta la secuencia del producto génico o la función del LPL (Xu et al., 2008). En Arabia Saudita no se encontró asociación entre HindIII y PvuII con el

ACV, atribuyendo la causa a factores epigenéticos o que otros SNP o haplotipos en el LPL podrían estar involucrados (Abu-Amero et al., 2003).

Los polimorfismos Ser447X, HindIII y PvuII en el gen de la lipoproteína lipasa fueron seleccionados debido a que han sido ampliamente descritos y estudiados, encontrándose involucrados en alteraciones en los perfiles lipídicos de las poblaciones estudiadas (Chen et al., 1996; Gambino R, 1999; Georgiev et al., 2008; Gotoda et al., 1989; Guan et al., 2006; Herbeth et al., 2007; Kuivenhoven et al., 1997; Larson et al., 1999; Liu et al., 2004; Myllykangas et al., 2001; Sepetiba et al., 2007; Socquard et al., 2006; Wang et al., 2011; Yin et al., 2006; Zhao et al., 2003). Inicialmente se justificó el estudio de los polimorfismos HindIII y PvuII, los cuales se encuentran en regiones intrónicas del gen de la lipoproteína lipasa, debido a que estudios realizados demuestran que pueden llegar a comportarse como marcadores de riesgo. La importancia de estudiar dichas regiones se produce porque se ha mostrado que ciertas secuencias intrónicas contienen elementos que regulan la transcripción y traducción de genes, además actúan como marcadores de mutaciones funcionales y alteración de la secuencia de aminoácidos (Chen et al., 2008). La no asociación encontrada en el presente estudio al analizar HindIII y PvuII, posiblemente se debe a que dichas mutaciones se producen en un sitio del gen de la LPL en donde es poco probable que las mutaciones sean funcionalmente relevantes. Por otra parte, Ser447X puede estar involucrada en la homeostasis cardiovascular, la cual puede estar sujeto a cambios por otros factores, genéticos, ambientales o ambos. Además, el ACV es una enfermedad multifactorial, por lo tanto es posible que varios genes puedan estar influyendo en la presentación de la enfermedad o sea producto de interacciones complejas entre la predisposición genética y el ambiente.

El presente análisis mostró que la diferencia en la distribución de los polimorfismos en el gen de la lipoproteína lipasa HindIII, PvuII y Ser447X, entre los pacientes con ACV y sujetos sanos, no actúa como un factor de riesgo estadísticamente significativo para el desarrollo de la enfermedad cerebrovascular en la muestra poblacional colombiana utilizada. Sin embargo, el análisis de marcadores genéticos para la enfermedad cerebrovascular permite clasificar a los pacientes de acuerdo a su genotipo, siendo una herramienta de predicción de riesgo simple y precisa que aporta datos que pueden ser usados para mejorar la asignación de recursos de salud, identificar personas con alto riesgo y captación de estas a través de los sistemas de salud, identificar los factores de riesgo asociados, vigilar las tendencias con el transcurso del tiempo, proporcionar la base para diseñar y ejecutar intervenciones, vigilar y evaluar la eficacia de las intervenciones, creación de redes de investigación, determinación de las prioridades propias de cada país para la prevención y el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares en el contexto de planes nacionales integrados para la prevención y el control de las enfermedades

crónicas y comparaciones de datos obtenidos entre poblaciones y dentro de cada población (Sagoo et al., 2008).

9. CONCLUSIONES

El análisis de genética de poblaciones realizado en el presente estudio demostró que la muestra poblacional examinada tiene muy baja diferenciación genética, además que en la población no hay selección, migración, consanguinidad y los apareamientos son aleatorios. Por otra parte, los polimorfismos analizados se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Adicionalmente, se observó que el genotipo de mayor frecuencia para HindIII y Ser447X fue el tipo ancestral, y el polimorfismo más diverso fue Pvull.

Los datos obtenidos demuestran la no asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos HindIII, Pvull y Ser447X en el gen de la lipoproteína lipasa y el accidente cerebrovascular en la muestra poblacional colombiana analizada. Sugiriendo que los polimorfismos analizados en el presente estudio no se pueden usar como marcadores genéticos para predecir el desarrollo de ACV en la muestra poblacional colombiana estudiada.

Dada la importancia de la LPL en el metabolismo de lípidos y la prevalencia de los polimorfismos, es necesario realizar más investigaciones con el objetivo de asegurar que la genotipificación se vuelva una herramienta de tamizaje útil para medir el riesgo individual para el desarrollo del accidente cerebrovascular

10.RECOMENDACIONES

Actualmente con las técnicas de biología molecular es posible realizar estudios para identificar la funcionalidad y efectos que puede tener la presencia de un polimorfismo, de esta forma al momento de elegir un polimorfismo como posible marcador para una enfermedad se deben tener en cuenta la severidad del efecto que puede tener. Teóricamente los genes como marcadores de exposición para el desarrollo del accidente cerebrovascular son inmodificables, sin embargo la rama de la epigenética ha demostrado que el ambiente tiene una influencia sobre los genes. De esta forma, los estudios de asociación para enfermedades multifactoriales deben tener en cuenta factores epigenéticos que puedan estar influyendo en la manifestación de la enfermedad.

Con el fin de garantizar un correcto manejo de la información, al usar de base de datos secundarias es necesario estar en permanente contacto con quienes realizan la recolección de la información y construcción de la base de datos.

Las investigaciones son susceptibles a diferentes sesgos, por eso es necesario ser cuidadosos en cada una de las fases que la conforman; planteamiento de la propuesta de investigación, cálculo del tamaño de la muestra, establecer poder del estudio y significancia estadística de los resultados, recolección de la muestra, criterios de inclusión y exclusión, procesamiento de las muestras y al momento de analizar la información usar las herramientas estadísticas disponibles.

Para el polimorfismo Ser447X el tamaño de muestra usado en el presente estudio tiene un poder de 86%, por tanto futuros estudios se deben considerar un mayor tamaño de muestra.

Es necesario continuar estudios de asociación genética y estos deben evaluar otras regiones genéticas ya sea en el gen de la lipoproteína lipasa u otras proteínas, que permitan determinar si pueden usarse como marcadores de exposición para el ACV.

11.DIVULGACIÓN

Los resultados producto de esta investigación fueron presentados en eventos académicos en modalidad de presentación tipo poster en el “European Stroke conference”, Niza (Francia) y en modalidad de presentación tipo oral en el “XIII congreso Colombiano y VII congreso internacional de genética humana”, Cali (Colombia).

Además, se envió un artículo original a la revista Colombia médica y este fue aceptado para su publicación.

BIBLIOGRAFÍA

ABU-AMERO, K. K., WYNGAARD, C. A., AL-BOUDARI, O. M., KAMBOURIS, M., y DZIMIRI, N. Lack of association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease in the Saudi Arab population. En: Archives of Pathology & Laboratory Medicine. Mayo, 2003, vol. 127, no. 5, p. 597-600.

ALBERTS, M. J. Genetic aspects of cerebrovascular disease. En: Stroke. Febrero, 1991, vol. 22, no. 2, p. 276-280.

ALRAJEH, S. M., y ALKALI, N. H. Genetics of ischemic stroke. En: Neurosciences (Riyadh). Octubre, 2008, vol. 13, no. 4, p. 343-349.

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart and Stroke fact statistical supplement. Dallas. 2000.

ANAND SS, Yusuf S, Vukson V, Devanesen S, Teo KK, Montague P. Ethnicity is an independent risk factor for CVD. En: Lancet. 2000, vol. 356, p. 279-284.

ANDERSON, J. L., KING, G. J., BAIR, T. L., ELMER, S. P., MUHLESTEIN, J. B., HABASHI, J., MIXSON, L., y CARLQUIST, J. F. Association of lipoprotein lipase gene polymorphisms with coronary artery disease. En: Journal of the American College of Cardiology. Marzo 15, 1999, vol. 33, no. 4, p. 1013-1020.

BUSHNELL. Hormone therapy and stroke: is it all about timing? En: Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine. 2009, vol. 11, p. 241-250.

BUSHNELL, C. D., SAMSA, G. P., y GOLDSTEIN, L. B. Hormone replacement therapy and ischemic stroke severity in women: a case-control study. En: Neurology. Mayo 22, 2001, vol. 56, no. 10, p. 1304-1307.

CASTAGNOLI, A., MAESTRI, I., BERNARDI, F., y DEL SENNO, L. PvuII RFLP inside the human estrogen receptor gene. En: Nucleic Acids Research. Junio 26, 1987, vol. 15, no. 2, p. 866.

CATTO, A. J. Genetic aspects of the hemostatic system in cerebrovascular disease. En: Neurology. 2001, vol. 57, no. 5 Suppl 2, p. S24-30.

CLEE, S. M., LOUBSER, O., COLLINS, J., KASTELEIN, J. J., y HAYDEN, M. R. The LPL S447X cSNP is associated with decreased blood pressure and plasma triglycerides, and reduced risk of coronary artery disease. En: Clinical Genetics. Octubre, 2001, vol. 60, no. 4, p. 293-300.

COOPER, Geogrey., HAUSMAN, Robert. The cell : a molecular approach. Sinauer Associates, Inc. Washington, D.C. 2 ed. 2007.

CORP, IBM. IBM SPSS Statistics for windows (Version 19). En: Armonk, NY. 2010.

CHEN, L., PATSCH, W., y BOERWINKLE, E. HindIII DNA polymorphism in the lipoprotein lipase gene and plasma lipid phenotypes and carotid artery atherosclerosis. En: Human Genetics. Noviembre, 1996, vol. 98, no. 5, p. 551-556.

CHEN, Q., RAZZAGHI, H., DEMIRCI, F. Y., y KAMBOH, M. I. Functional significance of lipoprotein lipase HindIII polymorphism associated with the risk of coronary artery disease. En: Atherosclerosis. Septiembre, 2008, vol. 200, no. 1, p. 102-108.

DANIELS, T. F., KILLINGER, K. M., MICHAL, J. J., WRIGHT, R. W., Jr., y JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. En: International Journal of Biological Sciences. 2009, vol. 5, no. 5, p. 474-488.

DOMINGUES-MONTANARI, S., MENDIOROZ, M., DEL RIO-ESPINOLA, A., FERNANDEZ-CADENAS, I., y MONTANER, J. Genetics of stroke: a review of recent advances. En: Expert Review of Molecular Diagnostics. Julio, 2008, vol. 8, no. 4, p. 495-513.

DU PLESSIS, L., y KOTZE, M. J. Detection of the PvuII RFLP in intron 15 of the LDL receptor gene by long-distance PCR. En: Clinical Genetics. Mayo, 1996, vol. 49, no. 5, p. 277-278.

DUMAN, B. S., TURKOGLU, C., AKPINAR, B., GUDEN, M., VERTII, A., DAK, E., CAGATAY, P., GUNAY, D., y BUYUKDEVIRIM, A. S. Lipoprotein lipase gene polymorphism and lipid profile in coronary artery disease. En: Archives of Pathology & Laboratory Medicine. Agosto, 2004, vol. 128, no. 8, p. 869-874.

E, Lazcano-Ponce, E, Salazar-Martinez, y M, Hernande-Avila. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. En: Salud pública de México. 2001, vol. 43, no. 3.

ECKEL, R. H. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. En: The New England Journal of Medicine. Abril 20, 1989, vol. 320, no. 16, p. 1060-1068.

EVANS, A., PEREZ, I., YU, G., y KALRA, L. Secondary stroke prevention in atrial fibrillation: lessons from clinical practice. En: Stroke. Septiembre, 2000, vol. 31, no. 9, p. 2106-2111.

EXCOFFIER, L. y H. E. L Lischer. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resource. 2010.

FANG, J., MADHAVAN, S., y ALDERMAN, M. H. Dietary potassium intake and stroke mortality. En: Stroke. Julio, 2000, vol. 31, no. 7, p. 1532-1537.

FAUSTINELLA, F., CHANG, A., VAN BIERVLIET, J. P., ROSSENEU, M., VINAIMONT, N., SMITH, L. C., CHEN, S. H., y CHAN, L. Catalytic triad residue mutation (Asp156---Gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency. Co-inheritance with a nonsense mutation (Ser447---Ter) in a Turkish family. En: The Journal of Biological Chemistry. Agosto 5, 1991, vol. 266, no. 22, p. 14418-14424.

FIDANI, L., HATZITOLIOS, A. I., GOULAS, A., SAVOPOULOS, C., BASAYANNIS, C., y KOTSIS, A. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B and lipoprotein lipase Ser447Ter gene polymorphisms are not associated with ischaemic stroke in Greek patients. En: Neuroscience Letters. Agosto 12-19, 2005, vol. 384, no. 1-2, p. 102-105.

FLEGAL, K. M., CARROLL, M. D., OGDEN, C. L., y JOHNSON, C. L. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. En: JAMA. Octubre 9, 2002, vol. 288, no. 14, p. 1723-1727.

FLYNN, R. W., MACWALTER, R. S., y DONEY, A. S. The cost of cerebral ischaemia. En: Neuropharmacology. Septiembre, 2008, vol. 55, no. 3, p. 250-256.

FORSTER, A., GASS, A., KERN, R., WOLF, M. E., OTTOMEYER, C., ZOHSEL, K., HENNERICI, M., y SZABO, K. Gender differences in acute ischemic stroke: etiology, stroke patterns and response to thrombolysis. En: Stroke. Julio, 2009, vol. 40, no. 7, p. 2428-2432.

FREEMAN, Scott, MENSUA, Jose, FITO, Santiago. Análisis evolutivo. Prentice Hall. Ed. 2. 2002.

FROMM, Herbert., HARGROVE, Mark. Essentials of Biochemistry. Springer. 2 ed. 2012.

GAMBINO R, Scaglione L, Alemanno N, Pagano G, Cassader M. Human Lipoprotein Lipase HindIII Polymorphism in Young Patients With Myocardial Infarction. En: Metabolism. 1999, vol. 48, no. 9, p. 1157-1161.

GEORGIEV, A., PANOV, S., y SADIKARIO, S. Association of PvuII polymorphism in the lipoprotein lipase gene with the coronary artery disease in Macedonian population. En: Prilozi. Diciembre, 2008, vol. 29, no. 2, p. 213-225.

GIGEK CDE, O., CHEN, E. S., CENDOROGLO, M. S., RAMOS, L. R., ARAUJO, L. M., PAYAO, S. L., y SMITH MDE, A. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with myocardial infarction and lipid levels. En: Clinical Chemical Laboratory Medicine. 2007, vol. 45, no. 5, p. 599-604.

GIGEK CDE, O., CHEN, E. S., CENDOROGLO, M. S., RAMOS, L. R., ARAUJO, L. M., PAYAO, S. L., y SMITH MDE, A. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with myocardial infarction and lipid levels. En: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2007, vol. 45, no. 5, p. 599-604.

GLOBAL HEALTH ESTIMATES TECHNICAL PAPER WHO/HIS/HSI/GHE/. WHO methods and data sources for global causes of death 2000-2011. Geneva. 2013.

GOTODA, T., SENDA, M., MURASE, T., YAMADA, N., TAKAKU, F., y FURUICHI, Y. Detection of familial LPL deficiency by Pvull RFLP. En: Nucleic Acids Research. Mayo 11, 1989, vol. 17, no. 9, p. 3607.

GOTODA, T., SENDA, M., MURASE, T., YAMADA, N., TAKAKU, F., y FURUICHI, Y. Gene polymorphism identified by Pvull in familial lipoprotein lipase deficiency. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. Noviembre 15, 1989, vol. 164, no. 3, p. 1391-1396.

GROENEMEIJER, B. E., HALLMAN, M. D., REYMER, P. W., GAGNE, E., KUIVENHOVEN, J. A., BRUIN, T., JANSEN, H., LIE, K. I., BRUSCHKE, A. V., BOERWINKLE, E., HAYDEN, M. R., y KASTELEIN, J. J. Genetic variant showing a positive interaction with beta-blocking agents with a beneficial influence on lipoprotein lipase activity, HDL cholesterol, and triglyceride levels in coronary artery disease patients. The Ser447-stop substitution in the lipoprotein lipase gene. REGRESS Study Group. En: Circulation. Junio 17, 1997, vol. 95, no. 12, p. 2628-2635.

GUAN, G. D., XU, E., WANG, X. J., XU, Y. H., y QIU, S. D. [Associations between Ser447Ter gene polymorphism of lipoprotein lipase and atherosclerotic cerebral infarction]. En: Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. Octubre, 2006, vol. 23, no. 5, p. 519-522.

HANDA, N., MATSUMOTO, M., MAEDA, H., HOUGAKU, H., y KAMADA, T. Ischemic stroke events and carotid atherosclerosis. Results of the Osaka Follow-up Study for Ultrasonographic Assessment of Carotid Atherosclerosis (the OSACA Study). En: Stroke. Octubre, 1995, vol. 26, no. 10, p. 1781-1786.

HARMSSEN, P., WILHELMSSEN, L., y JACOBSSON, A. Stroke incidence and mortality rates 1987 to 2006 related to secular trends of cardiovascular risk factors in Gothenburg, Sweden. En: Stroke. Agosto, 2009, vol. 40, no. 8, p. 2691-2697.

HARTL, Daniel. Principles of population genetics. Sinauer associates, Inc. 3 ed. 1997.

HASSAN, A., y MARKUS, H. S. Genetics and ischaemic stroke. En: Brain. Septiembre, 2000, vol. 123 (Pt 9), no., p. 1784-1812.

HATA, A., ROBERTSON, M., EMI, M., y LALOUEL, J. M. Direct detection and automated sequencing of individual alleles after electrophoretic strand separation: identification of a common nonsense mutation in exon 9 of the human lipoprotein lipase gene. En: Nucleic Acids Resource. Septiembre 25, 1990, vol. 18, no. 18, p. 5407-5411.

HEDRICK, Philip., Genetics of populations. Jones & Bartlett learning. 3 ed. 2005.

HERBETH, B., GUEGUEN, S., LEROY, P., SIEST, G., y VISVIKIS-SIEST, S. The lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism is associated with altered serum carotenoid concentrations in the Stanislas Family Study. En: The Journal of the American College of Nutrition. Diciembre, 2007, vol. 26, no. 6, p. 655-662.

HOKANSON, J. E. Functional variants in the lipoprotein lipase gene and risk cardiovascular disease. En: Current Opinion Lipidolosis. Octubre, 1999, vol. 10, no. 5, p. 393-399.

HORTON, J. R., BONVENTRE, J., y CHENG, X. How is modification of the DNA substrate recognized by the PvuII restriction endonuclease? En: The Journal of Biological Chemistry. Abril-Mayo, 1998, vol. 379, no. 4-5, p. 451-458.

HUANG, A. Q., HU, Y. H., ZHAN, S. Y., XU, B., PANG, Z. C., CAO, W. H., LU, J., QIN, Y., y LEE, L. M. Lipoprotein lipase gene S447X polymorphism modulates the relation between central obesity and serum lipids, a twin study. En: International Journal of Obesity. Diciembre, 2006, vol. 30, no. 12, p. 1693-1701.

HUMPHRIES, S. E., y MORGAN, L. Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. En: Lancet Neurology. Abril, 2004, vol. 3, no. 4, p. 227-235.

HUNT, S. C., HASSTEDT, S. J., KUIDA, H., STULTS, B. M., HOPKINS, P. N., y WILLIAMS, R. R. Genetic heritability and common environmental components of resting and stressed blood pressures, lipids, and body mass index in Utah pedigrees and twins. En: American Journal of Epidemiology. Marzo, 1989, vol. 129, no. 3, p. 625-638.

IBARRA, Adriana, RESTREPO, Tomás, ROJAS, Winston, CASTILLO, Adriana, AMORIM, António, MARTÍNEZ, Beatriz, BURGOS, German, OSTOS, Henry, ÁLVAREZ, Karen, CAMACHO, Mauricio, SUAREZ, Zuleyma, PEREIRA, Rui, y

GUSMÃO, Leonor. Evaluating the X Chromosome-Specific Diversity of Colombian Populations Using Insertion/Deletion Polymorphisms. En: PLoS ONE. 2014. vol. 9, no 1, p. e87202

IKEDA, A., ISO, H., YAMAGISHI, K., INOUE, M., y TSUGANE, S. Blood pressure and the risk of stroke, cardiovascular disease, and all-cause mortality among Japanese: the JPHC Study. En: American Journal of Hypertension. Marzo, 2009, vol. 22, no. 3, p. 273-280.

JAVORSKY, M., GASPERIKOVA, D., UKROPEC, J., SEDLAKOVA, B., RIECANSKY, I., KRIZANOVA, O., SEBOKOVA, E., DOBRIKOVA, M., KLIMES, I., y TKAC, I. Lipoprotein lipase HindIII polymorphism influences HDL-cholesterol levels in statin-treated patients with coronary artery disease. En: Wien Klin Wochenschr. 2007, vol. 119, no. 15-16, p. 476-482.

JEMAA R, Fumeron F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Bard JM, Fruchart JC, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels, the ECTIM study. Etude Cas Témoin sur l'Infarctus du Myocarde. En: Journal of Lipid Research. 1995, vol. 36, no. 10, p. 2141-2146.

JOBLING, Mark., HURLES, Matthew. Human Evolutionary Genetics: Origins, People and Diseases. Garland science. 2005.

JOHANSEN, C. T., KATHIRESAN, S., y HEGELE, R. A. Genetic determinants of plasma triglycerides. En: Journal of Lipid Research. Febrero, 2011, vol. 52, no. 2, p. 189-206.

JOHNSON, J. P., NISHINA, P. M., y NAGGERT, J. K. PCR assay for a polymorphic PvuII site in the LPL gene. En: Nucleic Acids Research. Diciembre 25, 1990, vol. 18, no. 24, p. 7469.

KAY, A., MARZ, W., HOFFMANN, M. M., ZHANG, Q., MASANA, LI, CAVANNA, J., BARONI, M. G., SHINE, B., y GALTON, D. J. Coronary artery disease and dyslipidemia within Europe: genetic variants in lipid transport gene loci in German subjects with premature coronary artery disease. En: Atherosclerosis Supplement. Mayo, 2002, vol. 3, no. 1, p. 27-33.

KIRCHGESSNER, T. G., CHUAT, J. C., HEINZMANN, C., ETIENNE, J., GUILHOT, S., SVENSON, K., AMEIS, D., PILON, C., D'AURIOL, L., ANDALIBI, A., y ET AL. Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. Diciembre, 1989, vol. 86, no. 24, p. 9647-9651.

KISSELA, B. M., KHOURY, J., KLEINDORFER, D., WOO, D., SCHNEIDER, A., ALWELL, K., MILLER, R., EWING, I., MOOMAW, C. J., SZAFIARSKI, J. P., GEBEL, J., SHUKLA, R., y BRODERICK, J. P. Epidemiology of ischemic stroke in patients with diabetes: the greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study. En: Diabetes Care. Febrero, 2005, vol. 28, no. 2, p. 355-359.

KOZAKI, K., GOTODA, T., KAWAMURA, M., SHIMANO, H., YAZAKI, Y., OUCHI, Y., ORIMO, H., y YAMADA, N. Mutational analysis of human lipoprotein lipase by carboxy-terminal truncation. En: Journal of Lipid Research. Octubre, 1993, vol. 34, no. 10, p. 1765-1772.

KUIVENHOVEN, J. A., GROENEMEYER, B. E., BOER, J. M., REYMER, P. W., BERGHUIS, R., BRUIN, T., JANSEN, H., SEIDELL, J. C., y KASTELEIN, J. J. Ser447stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. En: Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. Marzo, 1997, vol. 17, no. 3, p. 595-599.

LARSON, I., HOFFMANN, M. M., ORDOVAS, J. M., SCHAEFER, E. J., MARZ, W., y KREUZER, J. The lipoprotein lipase HindIII polymorphism: association with total cholesterol and LDL-cholesterol, but not with HDL and triglycerides in 342 females. En: Clinical Chemistry. Julio, 1999, vol. 45, no. 7, p. 963-968.

LAZCANO-PONCE, Eduardo, SALAZAR-MARTÍNEZ, Eduardo, y HERNÁNDEZ-AVILA, Mauricio. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. En: Salud Pública de México. 2001, vol. 43, no., p. 135-150.

LEE, E. J., KIM, H. J., BAE, J. M., KIM, J. C., HAN, H. J., PARK, C. S., PARK, N. H., KIM, M. S., y RYU, J. A. Relevance of common carotid intima-media thickness and carotid plaque as risk factors for ischemic stroke in patients with type 2 diabetes mellitus. En: American Journal of Neuroradiology. Mayo, 2007, vol. 28, no. 5, p. 916-919.

LEVINE, S. R. Hypercoagulable states and stroke: a selective review. En: CNS Spectrums. Julio, 2005, vol. 10, no. 7, p. 567-578.

LEWIS, C. M. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. En: Brief Bioinformatics. Junio, 2002, vol. 3, no. 2, p. 146-153.

LEWIS, C. M., y KNIGHT, J. Introduction to genetic association studies. En: Cold Spring Harbor Protocol. Marzo, 2012, vol. 2012, no. 3, p. 297-306.

LIU, A., LEE, L., ZHAN, S., CAO, W., LV, J., GUO, X., y HU, Y. The S447X polymorphism of the lipoprotein lipase gene is associated with lipoprotein lipid and

blood pressure levels in Chinese patients with essential hypertension. En: Journal of Hypertension. Agosto, 2004, vol. 22, no. 8, p. 1503-1509.

LONG, S., TIAN, Y., ZHANG, R., YANG, L., XU, Y., JIA, L., y FU, M. Relationship between plasma HDL subclasses distribution and lipoprotein lipase gene HindIII polymorphism in hyperlipidemia. En: Clinical Chemical Acta. Abril, 2006, vol. 366, no. 1-2, p. 316-321.

LÓPEZ-JARAMILLO P, Casas JC, Cubillos LA. Role of abdominal obesity in development of endothelial dysfunction: relevance in the pathogenesis of cardiovascular disease. En: Cardiología al día. 2001, vol. 4, no., p. 46-49.

LOPEZ-JARAMILLO, P., CASAS, J. P., BAUTISTA, L., SERRANO, N. C., y MORILLO, C. A. An integrated proposal to explain the epidemic of cardiovascular disease in a developing country. From socioeconomic factors to free radicals. En: Cardiology. 2001, vol. 96, no. 1, p. 1-6.

MANT, J., PAINTER, R., y VESSEY, M. Risk of myocardial infarction, angina and stroke in users of oral contraceptives: an updated analysis of a cohort study. En: British Journal of Obstetrics and Gynaecology. Agosto, 1998, vol. 105, no. 8, p. 890-896.

MATTU, R. K., NEEDHAM, E. W., MORGAN, R., REES, A., HACKSHAW, A. K., STOCKS, J., ELWOOD, P. C., y GALTON, D. J. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. En: Arteriosclerosis Thrombosis. Julio, 1994, vol. 14, no. 7, p. 1090-1097.

MCKAY, Judith; Organization, World Health; Mensah, George A; Mendis, Shanthi; Greenlund, Kurt; McKay, Judith; Mensah, George A; Mendis, Shanthi; Greenlund, Kurt. The atlas of heart disease and stroke. En: World Health Organization. 2004.

MEAD, J. R., IRVINE, S. A., y RAMJI, D. P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. En: Journal Molecular Medicine. Diciembre, 2002, vol. 80, no. 12, p. 753-769.

MESCHIA, J. F., WORRALL, B. B., y RICH, S. S. Genetic susceptibility to ischemic stroke. En: Nature Reviews Neurology. Julio, 2011, vol. 7, no. 7, p. 369-378.

MORABIA, Alfredo. Association between lipoprotein lipase (LPL) gene and blood lipids: a common variant for a common trait? En: Genetic Epidemiology. 2003, vol. 24.

MORRISON, A. C., BALLANTYNE, C. M., BRAY, M., CHAMBLESS, L. E., SHARRETT, A. R., y BOERWINKLE, E. LPL polymorphism predicts stroke risk in men. En: Genetic Epidemiology. Marzo, 2002, vol. 22, no. 3, p. 233-242.

MUNSHI, A., BABU, M. S., KAUL, S., RAJESHWAR, K., BALAKRISHNA, N., y JYOTHY, A. Association of LPL gene variant and LDL, HDL, VLDL cholesterol and triglyceride levels with ischemic stroke and its subtypes. En: Journal of Neurological Sciences. Julio 15, 2012, vol. 318, no. 1-2, p. 51-54.

MUNSHI, A., y KAUL, S. Genetic basis of stroke: an overview. En: Neurology India. Marzo-Abril, 2010, vol. 58, no. 2, p. 185-190.

MURRAY, Robert., BENDER David., BOTHAM, Kathleen., KENNELLY, Peter., RODWELL, Victor., WEIL, Anthony. Harper's Illustrated Biochemistry. Professional, McGraw Hill Ed. 28th ed.2009.

MURTHY, V., JULIEN, P., y GAGNE, C. Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. En: Pharmacology Therapy. 1996, vol. 70, no. 2, p. 101-135.

MYLLYKANGAS, L., POLVIKOSKI, T., SULKAVA, R., NOTKOLA, I. L., RASTAS, S., VERKKONIEMI, A., TIENARI, P. J., NIINISTO, L., HARDY, J., PEREZ-TUR, J., KONTULA, K., y HALTIA, M. Association of lipoprotein lipase Ser447Ter polymorphism with brain infarction: a population-based neuropathological study. En: Annual Medicine. Octubre, 2001, vol. 33, no. 7, p. 486-492.

NASRI, M., y THOMAS, D. Alteration of the specificity of PvuII restriction endonuclease. En: Nucleic Acids Resourse. Octubre 12, 1987, vol. 15, no. 19, p. 7677-7687.

NATIONAL STROKE FOUNDATION. The economic impact of stroke in Australia. Deloitte Access Economics. Australia. 2013.

NICKLAS, B. J., FERRELL, R. E., ROGUS, E. M., BERMAN, D. M., RYAN, A. S., DENNIS, K. E., y GOLDBERG, A. P. Lipoprotein lipase gene variation is associated with adipose tissue lipoprotein lipase activity, and lipoprotein lipid and glucose concentrations in overweight postmenopausal women. En: Human Genetics. Abril, 2000, vol. 106, no. 4, p. 420-424.

OKA, K., TKALCEVIC, G. T., NAKANO, T., TUCKER, H., ISHIMURA-OKA, K., y BROWN, W. V. Structure and polymorphic map of human lipoprotein lipase gene. En: Biochimical Biophysics Acta. Mayo 24, 1990, vol. 1049, no. 1, p. 21-26.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Estrategia paso a paso de la OMS para la vigilancia de accidentes cerebrovasculares. 2005.

PARFENOV, M. G., NIKOLAEVA, T. Y., SUDOMOINA, M. A., FEDOROVA, S. A., GUEKHT, A. B., GUSEV, E. I., y FAVOROVA, O. O. Polymorphism of apolipoprotein E (APOE) and lipoprotein lipase (LPL) genes and ischaemic stroke in individuals of Yakut ethnicity. En: Journal Neurology Sciences. Abril 15, 2007, vol. 255, no. 1-2, p. 42-49.

PASALIC, D., SERTIC, J., KUNOVIC, B., MILICEVIC, Z., PASIC, A., ZRINSKI-TOPIC, R., FERENCAK, G., y STAVLJENIC-RUKAVINA, A. Lipoprotein lipase gene polymorphism and lipid profile in patients with hypertriglyceridemia. En: Croatian Medical Journal. Octubre, 2001, vol. 42, no. 5, p. 517-522.

MATHEWS, Christopher. Bioquímica. Pearson. 4 ed. 2012.

PÉREZ, Germán Enrique. . Enfermedad cerebrovascular en Cali. . En: Acta Neurológica Colombiana. 2004, vol. Vol. 20.

PIGOTT, Therese D. A Review of Methods for Missing Data. En: Educational Research and Evaluation. 2001, vol. 7, no. 4, p. 353-383.

PRADILLA G, Puentes F, Pardo CA. Estudio Neuroepidemiológico Piloto. En: Neurología Colombiana. 1984, vol. 8, p. 133-139.

PRATI P, Tosetto A, Vanuzzo D, Bader G, Casaroli M, Canciani L, Castellani S, Touboul PJ Carotid intima media thickness and plaques can predict the occurrence of ischemic cerebrovascular events. En: Stroke. 2008, vol. 39, no. 9, p. 2470-2476.

PRUISSEN, D. M., KAPPELLE, L. J., ROSENDAAL, F. R., y ALGRA, A. Genetic association studies in ischaemic stroke: replication failure and prospects. En: Cerebrovascular Disease. 2009, vol. 27, no. 3, p. 290-294.

R, Iniesta, E, Guinó, y V, Moreno. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. En: Gaceta sanitaria. 2005, vol. 4, no. 19, p. 9.

RACHEL E. PEACOCK, Anders Hamsten, Peter Nilsson-Ehle, Steve E. Humphries Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlations of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarction survivors and age-matched healthy individuals from Sweden. En: Atherosclerosis. Diciembre, 1992 vol. 97, no. 2, p. 171-185.

RASTENYTE, D., TUOMILEHTO, J., y SARTI, C. Genetics of stroke--a review. En: Journal of Neurological Sciences. Enero 8, 1998, vol. 153, no. 2, p. 132-145.

REBHI, L., KCHOK, K., OMEZZINE, A., KACEM, S., REJEB, J., BEN HADJMBAREK, I., BELKAHLA, R., BOUMAIZA, I., MOUSSA, A., BEN REJEB, N.,

NABLI, N., BOUGHZALA, E., BEN ABDELAZIZ, A., y BOUSLAMA, A. Six lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid profile and coronary stenosis in a Tunisian population. En: Molecular Biology Reports. Junio 24, 2012.

REINER, A. P., KUMAR, P. N., SCHWARTZ, S. M., LONGSTRETH, W. T., Jr., PEARCE, R. M., ROSENDAAL, F. R., PSATY, B. M., y SISCOVICK, D. S. Genetic variants of platelet glycoprotein receptors and risk of stroke in young women. En: Stroke. Julio, 2000, vol. 31, no. 7, p. 1628-1633.

RIP, J., NIERMAN, M. C., ROSS, C. J., JUKEMA, J. W., HAYDEN, M. R., KASTELEIN, J. J., STROES, E. S., y KUIVENHOVEN, J. A. Lipoprotein lipase S447X: a naturally occurring gain-of-function mutation. En: Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology. Junio, 2006, vol. 26, no. 6, p. 1236-1245.

ROJAS, W., PARRA, M. V., CAMPO, O., CARO, M. A., LOPERA, J. G., ARIAS, W., DUQUE, C., NARANJO, A., GARCIA, J., VERGARA, C., LOPERA, J., HERNANDEZ, E., VALENCIA, A., CAICEDO, Y., CUARTAS, M., GUTIERREZ, J., LOPEZ, S., RUIZ-LINARES, A., y BEDOYA, G. Genetic make up and structure of Colombian populations by means of uniparental and biparental DNA markers. En: American Journal Physichs Anthropology. Septiembre, 2010, vol. 143, no. 1, p. 13-20.

ROSAMOND W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K et al. Heart disease and stroke statics 2007?update: a report from the America heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. En: Circulation. 2007, vol. 115, p. e69- 171.

SADAVA, David, HILLIS, David, HELLER, H Craig, BERENBAUM, May. Life: the science of biology. W. H. Freeman. 10 ed. 2012.

SACCO, R. L., BLANTON, S. H., SLIFER, S., BEECHAM, A., GLOVER, K., GARDENER, H., WANG, L., SABALA, E., JUO, S. H., y RUNDEK, T. Heritability and linkage analysis for carotid intima-media thickness: the family study of stroke risk and carotid atherosclerosis. En: Stroke. Julio, 2009, vol. 40, no. 7, p. 2307-2312.

SAGOO, G. S., TATT, I., SALANTI, G., BUTTERWORTH, A. S., SARWAR, N., VAN MAARLE, M., JUKEMA, J. W., WIMAN, B., KASTELEIN, J. J., BENNET, A. M., DE FAIRE, U., DANESH, J., y HIGGINS, J. P. Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. En: American Journal Epidemiology. Diciembre 1, 2008, vol. 168, no. 11, p. 1233-1246.

SAKA, O., MCGUIRE, A., y WOLFE, C. Cost of stroke in the United Kingdom. En: Age Ageing. Enero, 2009, vol. 38, no. 1, p. 27-32.

SALAH, A., KHAN, M., ESMAIL, N., HABIBULLAH, S., y AL LAHHAM, Y. Genetic polymorphism of S447X lipoprotein lipase (LPL) and the susceptibility to hypertension. En: Journal of Critical Care. Septiembre, 2009, vol. 24, no. 3, p. e11-14.

SALAZAR, L. A., HIRATA, M. H., GIANNINI, S. D., FORTI, N., DIAMENT, J., LIMA, T. M., y HIRATA, R. D. Seven DNA polymorphisms at the candidate genes of atherosclerosis in Brazilian women with angiographically documented coronary artery disease. En: Clinical Chimical Acta. Octubre, 2000, vol. 300, no. 1-2, p. 139-149.

SAPOSNIK, G. Ethnicity in stroke: practical implications. En: Stroke. Noviembre, 2000, vol. 31, no. 11, p. 2732-2733.

SEN, S., y OPPENHEIMER, S. M. Cardiac disorders and stroke. En: Current Opinion Neurology. Febrero, 1998, vol. 11, no. 1, p. 51-56.

SEPETIBA, R. J., ANDRADE, J., HIRATA, R. D., HIRATA, M. H., SEPETIBA, C. R., NAKAMURA, Y., MATSUMOTO, L. O., CAVALLI, S. A., y BERTOLAMI, M. C. Lipoprotein lipase PvuII polymorphism is associated with variations in serum lipid levels in non-diabetic pregnant women. En: Brazil Journal Medical Biology Research. Julio, 2007, vol. 40, no. 7, p. 919-926.

SHIMO-NAKANISHI, Y., URABE, T., HATTORI, N., WATANABE, Y., NAGAO, T., YOKOCHI, M., HAMAMOTO, M., y MIZUNO, Y. Polymorphism of the lipoprotein lipase gene and risk of atherothrombotic cerebral infarction in the Japanese. En: Stroke. Julio, 2001, vol. 32, no. 7, p. 1481-1486.

SHINTON, R., SAGAR, G., y BEEVERS, G. Body fat and stroke: unmasking the hazards of overweight and obesity. En: Journal Epidemiology Community Health. Junio, 1995, vol. 49, no. 3, p. 259-264.

SILVA FA, Silva SY, Zarruck HG, Rueda-Clausen CF, Camacho PA, Pradilla G. . Classical Risk Factors for Isquemic Stroke in a Colombian Population. En: Neurology. 2006, vol. 66, no. Suppl 2 p. A220.

SILVA FA, Zarruk JG, Quintero C, Arenas W, Rueda-Clausen CF. Enfermedad cerebrovascular en Colombia. En: Revista Colombiana de Cardiología. 2006, vol. 13. p. 85-89.

SING, K., BALLANTYNE, C. M., FERLIC, L., BRUGADA, R., CUSHMAN, I., DUNN, J. K., HERD, J. A., POWNALL, H. J., GOTTO, A. M., y MARIAN, A. J. Lipoprotein lipase gene mutations, plasma lipid levels, progression/regression of coronary atherosclerosis, response to therapy, and future clinical events. Lipoproteins and

Coronary Atherosclerosis Study. En: Atherosclerosis. Junio, 1999, vol. 144, no. 2, p. 435-442.

SOCQUARD, E., DURLACH, A., CLAVEL, C., NAZEYROLLAS, P., y DURLACH, V. Association of HindIII and PvuII genetic polymorphisms of lipoprotein lipase with lipid metabolism and macrovascular events in type 2 diabetic patients. En: Diabetes Metabolism. Junio, 2006, vol. 32, no. 3, p. 262-269.

SOLE, X., GUINO, E., VALLS, J., INIESTA, R., y MORENO, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. En: Bioinformatics. Agosto 1, 2006, vol. 22, no. 15, p. 1928-1929.

StataCorp. Stata Statistical Software. College Station. Texas. version 12. 2011.

STEPANOV, V. A., LEMZA, S. V., y PUZYREV, V. P. [PvuII restriction fragment length polymorphism at the lipoprotein lipase gene]. En: Genetika. Junio, 1993, vol. 29, no. 6, p. 1050-1052.

STEPANOV, V. A., PUZYREV, V. P., KARPOV, R. S., y KUTMIN, A. I. Genetic markers in coronary artery disease in a Russian population. En: Human Biology. Febrero, 1998, vol. 70, no. 1, p. 47-57.

STOCKS, J., THORN, J. A., y GALTON, D. J. Lipoprotein lipase genotypes for a common premature termination codon mutation detected by PCR-mediated site-directed mutagenesis and restriction digestion. En: Journal Lipid Research. Junio, 1992, vol. 33, no. 6, p. 853-857.

SUGIYAMA, T., LEE, J. D., SHIMIZU, H., ABE, S., y UEDA, T. Influence of treated blood pressure on progression of silent cerebral infarction. En: Journal of Hypertension. Mayo, 1999, vol. 17, no. 5, p. 679-684.

SUK, S. H., SACCO, R. L., BODEN-ALBALA, B., CHEUN, J. F., PITTMAN, J. G., ELKIND, M. S., y PAIK, M. C. Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. En: Stroke. Julio, 2003, vol. 34, no. 7, p. 1586-1592.

TANIZAKI Y, Kiyohara Y, Iwamoto H y Col. . Incidence and risk factors for subtypes of cerebral infarction in a general population. The Hisayama study. Stroke. Secondary stroke prevention in atrial fibrillation. En: Lessons from clinical practice. 2000, vol. 31, p. 2216-2622.

TANNE D, D'Oolhaberriage L, Schultz LR. Anticardiolipin antibodies and their associations with cerebrovascular risk factors. En: Neurology. 1999, vol. 52, no., p. 1368-1374.

THORN, J. A., NEEDHAM, E. W., MATTU, R. K., STOCKS, J., y GALTON, D. J. The Ser447-Ter mutation of the lipoprotein lipase gene relates to variability of serum lipid and lipoprotein levels in monozygotic twins. En: Journal Lipid Research. Febrero, 1998, vol. 39, no. 2, p. 437-441.

TONK, M., y HAAN, J. A review of genetic causes of ischemic and hemorrhagic stroke. En: Journal of the Neurological Sciences. Junio 15, 2007, vol. 257, no. 1-2, p. 273-279.

TRUELSEN, T., PIECHOWSKI-JOZWIAK, B., BONITA, R., MATHERS, C., BOGOUSSLAVSKY, J., y BOYSEN, G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. En: European Journal of Neurology. Junio, 2006, vol. 13, no. 6, p. 581-598.

WANG, C., SUN, T., LI, H., BAI, J., y LI, Y. Lipoprotein lipase Ser447Ter polymorphism associated with the risk of ischemic stroke: a meta-analysis. En: Thrombosis Research. Noviembre, 2011, vol. 128, no. 5, p. e107-112.

WANG, H., y ECKEL, R. H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. En: American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism. Agosto, 2009, vol. 297, no. 2, p. E271-288.

WANG, L. N., YU, Q., XIONG, Y., LIU, L. F., ZHANG, Z., ZHANG, X. N., CHENG, H., y WANG, B. Lipoprotein lipase gene polymorphisms and risks of childhood obesity in Chinese preschool children. En: Euroepan Journal of Pediatrics. Oct, 2011, vol. 170, no. 10, p. 1309-1316.

WANG, X. L., MCCREDIE, R. M., y WILCKEN, D. E. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene. Association with severity of coronary artery disease and diabetes. En: Circulation. Abril 1, 1996, vol. 93, no. 7, p. 1339-1345.

WANG XL, McCRedie RM, Wilcken DE. Common DNA polymorphisms at the lipoprotein lipase gene. Association with severity of coronary artery disease and diabetes. En: Circulation. 1996, vol. 93, no. 7, p. 1339-1345.

WARLOW. Epidemiology of stroke. En: Lancet. 1998, p. SIII1-SIII4.

WEIR, Bruce. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sinauer associates. 2 ed. 1996.

WONG, H., DAVIS, R. C., THUREN, T., GOERS, J. W., NIKAZY, J., WAITE, M., y SCHOTZ, M. C. Lipoprotein lipase domain function. En: Jouranl Biology Chemical. Abril 8, 1994, vol. 269, no. 14, p. 10319-10323.

WONG, H., y SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. En: Journal of Lipid Research. Julio, 2002, vol. 43, no. 7, p. 993-999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Italy. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global burden of disease: 2004 update. Switzerland 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic (2005/05/21 ed. Vol. 58) 2004.

XIE, C., WANG, Z. C., LIU, X. F., y YANG, M. S. The common biological basis for common complex diseases: evidence from lipoprotein lipase gene. En: European Journal of Human Genetics. Enero, 2010, vol. 18, no. 1, p. 3-7.

XU, E., LI, W., ZHAN, L., GUAN, G., WANG, X., CHEN, S., y SHI, Y. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene are associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese. En: Neuroscience. Aug 13, 2008, vol. 155, no. 2, p. 403-408.

YIN, R., WANG, Y., CHEN, G., LIN, W., YANG, D., y PAN, S. Lipoprotein lipase gene polymorphism at the PvuII locus and serum lipid levels in Guangxi Hei Yi Zhuang and Han populations. En: Clinical Chemical Laboratory Medicine. 2006, vol. 44, no. 12, p. 1416-1421.

ZHAO, S. P., TONG, Q. G., XIAO, Z. J., CHENG, Y. C., ZHOU, H. N., y NIE, S. The lipoprotein lipase Ser447Ter mutation and risk of stroke in the Chinese. En: Clinical Chimichal Acta. Abril, 2003, vol. 330, no. 1-2, p. 161-164.