



ORIGINAL

## Análisis de epistasia de polimorfismos de genes metabólicos asociados a cardiopatía isquémica en Yucatán



Igrid García-González<sup>a,\*</sup>, Roger Iván López-Díaz<sup>a</sup>, José Reyes Canché-Pech<sup>a</sup>, Alberto de Jesús Solís-Cárdenas<sup>b</sup>, Jorge A. Flores-Ocampo<sup>b</sup>, Renán Mendoza-Alcocer<sup>c</sup>, Luis Fernando Herrera-Sánchez<sup>d</sup>, Marco Antonio Jiménez-Rico<sup>a</sup>, Adrián Alejandro Ceballos-López<sup>a</sup> y María E. López-Novelo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Molecular, Laboratorios Biomédicos de Mérida, Mérida, Yucatán, México

<sup>b</sup> Hospital Regional Mérida del ISSSTE, Mérida, Yucatán, México

<sup>c</sup> Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, Mérida, Yucatán, México

<sup>d</sup> Unidad Cardiometabólica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

Recibido el 22 de septiembre de 2017; aceptado el 29 de noviembre de 2017

Disponible en Internet el 1 de febrero de 2018

### PALABRAS CLAVE

Epistasia;  
Polimorfismos;  
Cardiopatía  
isquémica;  
México

### Resumen

**Objetivo:** La epistasia es un tipo de interacción genética que podría explicar gran parte de la variabilidad fenotípica que muestran las enfermedades complejas. En este trabajo se determinó el efecto de la epistasia de genes metabólicos y los factores de riesgo cardiovascular en la susceptibilidad al desarrollo de cardiopatía isquémica en Yucatán.

**Métodos:** Estudio de casos y controles en 79 pacientes yucatecos con cardiopatía isquémica y 101 controles sanos pareados por edad y origen con los casos. Se genotificaron los polimorfismos -108CT, Q192R, L55M (paraoxonasa 1, *PON1*), C677T, A1298C (5,10 metilentetrahidrofolato reductasa, *MTHFR*) y la presencia/ausencia del gen glutatión S-transferasa T1 (*GSTT1*). El análisis de epistasia se realizó con el método de reducción dimensional multifactorial (MDR). El mejor modelo de predicción de riesgo se seleccionó con base en la precisión (%), la significación estadística ( $p < 0,05$ ) y la consistencia de la validación cruzada.

**Resultados:** Se encontró asociación independiente del genotipo nulo *GSTT1*\*0/0 (OR = 3,39; IC: 1,29-8,87;  $p = 0,017$ ) y el alelo nulo (OR = 1,86; IC: 1,19-2,91;  $p = 0,007$ ) con la cardiopatía isquémica. La delección *GSTT1*\*0 y el genotipo 677TT (*MTHFR*) se identificaron de alto riesgo cardiovascular, mientras que el genotipo silvestre *GSTT1*\*1 y la variante CC677 se clasificaron de bajo riesgo. La interacción gen-ambiente identificó al gen *GSTT1*, al polimorfismo C677T (*MTHFR*) y a la hipertensión arterial como los factores que mejor explican la cardiopatía isquémica en la población estudiada.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [igrig.garciaglez@hotmail.com](mailto:igrig.garciaglez@hotmail.com) (I. García-González).

**Conclusiones:** La interacción de los genes *GSTT1* y *MTHFR* conjuntamente con la hipertensión arterial puede constituir un modelo de predicción de riesgo para el inicio temprano de cardiopatía isquémica en la población de Yucatán.

© 2017 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Arteriosclerosis.

## KEYWORDS

Epistasia;  
Polimorfismos;  
Ischemic heart  
disease;  
Mexico

## Epistasia analysis of metabolic genes polymorphisms associated with ischemic heart disease in Yucatan

### Abstract

**Objective:** Epistasia is a type of genetic interaction that could explain much of the phenotypic variability of complex diseases. In this work, the effect of epistasia of metabolic genes and cardiovascular risk on the susceptibility to the development of ischemic heart disease in Yucatan was determined.

**Methods:** Case-control study in 79 Yucatecan patients with ischemic heart disease and 101 healthy controls matched by age and origin with cases. The polymorphisms -108CT, Q192R, L55M (paraoxonase 1; *PON1*), C677T, A1298C (methylenetetrahydrofolate reductase; *MTHFR*), and the presence/absence of the glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) gene were genotyped. Epistasia analysis was performed using the multifactorial dimensional reduction method. The best risk prediction model was selected based on precision (%), statistical significance ( $P < 0.05$ ), and cross-validation consistency.

**Results:** We found an independent association of the null genotype *GSTT1\*0/0* (OR=3.39, CI: 1.29-8.87,  $P=0.017$ ) and the null allele (OR=1.86, CI: 1.19-2.91,  $P=0.007$ ) with ischemic heart disease. The *GSTT1\*0* deletion and the 677TT genotype (*MTHFR*) were identified as being at a high cardiovascular risk, whereas the *GSTT1\*1* wild type genotype and the CC677 variant were at low risk. The gene-environment interaction identified the *GSTT1* gene, C677T polymorphism (*MTHFR*), and hypertension as the factors that best explain ischemic heart disease in the study population.

**Conclusions:** The interaction of the *MTHFR*, *GSTT1* and hypertension may constitute a predictive model of risk for early onset ischemic heart disease in the population of Yucatan.

© 2017 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Arteriosclerosis.

## Introducción

La cardiopatía isquémica (CI) es una enfermedad compleja con patrones de herencia formados por combinaciones de genes pertenecientes a múltiples loci en interacción con factores de riesgo ambientales. Tradicionalmente, los estudios de asociación genéticos se han centrado en polimorfismos aislados de un solo nucleótido o SNP (del inglés *simple nucleotide polymorphisms*), y es difícil establecer una asociación real con la enfermedad, al ser de naturaleza poligénica<sup>1,2</sup>. Para la CI, una de las estrategias actuales consiste en identificar grupos de polimorfismos funcionales en genes candidatos involucrados en la homeostasia cardiovascular que puedan definir con mayor precisión la propensión a un determinado fenotipo aterotrombótico<sup>3</sup>.

La epistasia es un tipo de interacción genética que podría explicar gran parte de la variabilidad fenotípica que muestra la enfermedad coronaria. El método de reducción dimensional multifactorial (MDR), diseñado para estudios de asociación de casos y controles con pequeños tamaños de muestra, es una estrategia novedosa para la identificación de efectos epistáticos predictores de una situación clínica determinada<sup>4,5</sup>. El MDR es un método no paramétrico que

reduce la dimensión multifactorial agrupando los diferentes genotipos en 2 grupos: alto y bajo riesgo. El MDR no asume un modelo de herencia específico sino que, una vez que selecciona los polimorfismos de mayor relevancia, examina la proporción de casos y controles de cada una de las combinaciones genotípicas entre 2 o más loci para obtener un modelo de clasificación final para alto y bajo riesgo. Estas interacciones se representan en una tabla de contingencia donde para cada casilla se estima la proporción casos/controles. Las casillas con una proporción casos/controles igual o mayor que la proporción caso/control global de la población se clasifican como de alto riesgo y aquellas con una proporción menor que la global, como de bajo riesgo. De esa forma, se obtiene un modelo de clasificación en el que los sujetos de riesgo alto se clasifican como casos y los de riesgo bajo, como controles. El programa genera diferentes modelos de interacción entre los loci evaluados, identificando el mejor de ellos con relación a la sensibilidad y especificidad, denominado precisión equilibrada. Una validación cruzada cuenta el número de veces que una determinada interacción es elegida como sobresaliente e identifica así el mejor modelo. Una prueba de permutación evalúa si dicho modelo es estadísticamente significativo<sup>6,7</sup>. El mejor

modelo será el de mayor precisión y valor de significación ( $p < 0,05$ ).

Para este estudio se seleccionaron 6 polimorfismos de un solo nucleótido de los genes candidatos glutatión S-transferasa T1 (*GSTT1*), paraoxonasa 1 (*PON1*) y 5,10 metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*), relacionados con el metabolismo antioxidante y de folatos, procesos implicados en la fisiopatología de la enfermedad coronaria de causa aterosclerótica.

El gen *GSTT1* codifica para enzimas que intervienen en la detoxificación celular. La variante silvestre *GSTT1\*1* es funcional mientras que la variante nula *GSTT1\*0* implica la delección del gen<sup>8</sup>. Los sujetos portadores de la delección homocigota *GSTT1\*0/\*0* carecen de la enzima mientras que los heterocigotos *GSTT1\*1/\*0* poseen actividad intermedia por el efecto del alelo funcional<sup>9,10</sup>.

El gen *PON1* codifica para una glicoproteína con actividad antioxidante que se asocia con las moléculas HDL (lipoproteínas de alta densidad) y cuya concentración aumenta en respuesta al estrés oxidativo<sup>11</sup>. Las variantes objeto de este estudio se localizan en la región promotora (-108CT [rs705379]) y en la codificante (T260A [rs854560] y A672G [rs662]), estas últimas conocidas en la literatura como L55M y Q192R, respectivamente. Estas isoformas poseen diferente capacidad para proteger las LDL de la oxidación lipídica: los genotipos 192QQ y 55MM confieren a las HDL mayor actividad antioxidante, con un efecto ateroprotector, a diferencia de los genotipos aterogénicos 192RR y 55LL<sup>12,13</sup>. Mientras, la isoforma codificada por el alelo -108C se ha asociado con mayor concentración enzimática en comparación con la variante -108T<sup>14</sup>.

Por su parte, la homocisteína (Hcy) es un producto intermedio del metabolismo de la metionina, cuyo aumento se relaciona inversamente con los niveles plasmáticos de folato y se considera un factor de riesgo aterogénico por propiciar la disfunción endotelial<sup>15,16</sup>. Los polimorfismos más estudiados del gen *MTHFR* son C677T y A1298C. Los homocigotos para el alelo T (C677T) poseen una menor actividad enzimática, asociada con bajos niveles de folato y altos niveles de Hcy<sup>17,18</sup>, mientras que la variante A1298C se ha relacionado con baja actividad enzimática *in vitro* e *in vivo*<sup>19</sup>.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de epistasia de 6 polimorfismos de genes metabólicos y su interacción con factores de riesgo cardiovascular, e identificar un modelo de predicción de riesgo para CI en pacientes yucatecos.

## Métodos

### Tipo de estudio y muestras

Se diseñó un estudio de asociación de casos y controles con pareamiento por edad y lugar de nacimiento. Se reclutaron 79 pacientes, hombres y mujeres, de ascendencia yucateca y con diagnóstico de CI, procedentes de los servicios de cardiología del Hospital Regional del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y del Hospital General Dr. Agustín O'Horan en Mérida (Yucatán). Los criterios diagnósticos de CI (ACCF/AHA)<sup>20,21</sup> fueron dolor precordial en reposo o al ejercicio mayor de 20 min, con o sin cambios en el electrocardiograma basal en reposo,

con o sin alteraciones de marcadores enzimáticos y cuyo diagnóstico fuese confirmado por cateterismo cardiaco. Los controles fueron 101 donantes aparentemente sanos, no relacionados, sin manifestaciones clínicas de CI, con prueba de esfuerzo negativa para isquemia miocárdica y sin historia familiar de enfermedad coronaria prematura (evento coronario en familiares de primer o segundo grado antes de los 55 años en varones y antes de los 65 en mujeres), procedentes del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea y del Hospital Regional Mérida del ISSSTE.

Se registraron datos demográficos e historia personal de los factores de riesgo cardiovascular obesidad, hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus (DM), colesterol HDL (lipoproteínas de baja densidad), colesterol LDL y dislipidemia mixta, así como la presencia de arco corneal y xantelasmas. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como peso en kilogramos dividido por la estatura en metros cuadrados y se categorizó en bajo peso (<18,5), normopeso (de 18,5 a 24,9), sobrepeso (de 25,0 a <30,0) y obesidad (>30,0). La HTA se definió de acuerdo con las recomendaciones de la *American Heart Association* con cifras de presión arterial sistólica/diastólica  $\geq 140/90$  mmHg<sup>22</sup>. Se consideró dislipidemia mixta cuando el valor del colesterol total plasmático y los triglicéridos fueron superiores a 200 mg/dl<sup>23</sup>. El colesterol LDL se calculó utilizando la fórmula de Friedewald. La DM se definió según la *American Diabetes Association* como glucemia plasmática en ayunas  $\geq$  a 126 mg/dl, más síntomas clásicos de diabetes o glucemia  $\geq$  a 200 mg/dl a las 2 h de la prueba de tolerancia oral a la glucosa<sup>24</sup>. El tabaquismo se definió como fumador y no fumador. Se consideró fumador cuando el sujeto dijo que consumía al menos un cigarrillo diario durante el último año o más, o que convivía diariamente con fumadores. No fumador cuando no había fumado nunca ni había convivido con fumadores. En los casos, cada categoría se definió a partir del diagnóstico de CI.

Todos los individuos se definieron étnicamente como mestizos y declararon haber nacido en Yucatán y ser descendientes de padres y abuelos yucatecos. Previamente, se determinó la ausencia de subestructura genética o estratificación entre los grupos de estudio, utilizando 4 polimorfismos ancestrales que caracterizan al locus sanguíneo *ABO\*O*. El estudio fue aprobado por los Comité de Ética de la Investigación de las instituciones participantes. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos.

### Obtención de ADN y genotipificación

El ADN genómico se obtuvo a partir de 2 ml de sangre periférica por un método de precipitación salina descrito por Bunce<sup>25</sup> y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Los polimorfismos C677T y A1298C (*MTHFR*) se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa con análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Para C677T (rs1801133) se utilizaron los oligonucleótidos 5'CGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTG3(sentido) y 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3(antisentido). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido de 35 ciclos, 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 s a  $62^{\circ}\text{C}$  y 30 s a  $72^{\circ}\text{C}$ , con extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min. El amplificado de 233 pb se trató con la enzima de restricción TaqI (Thermo Scientific) durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Los productos de la restricción se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con nitrato de plata. La enzima produce un único sitio de corte y genera un fragmento de 171 pb correspondiente al alelo T. Para A1298C (rs1801131) se utilizaron los oligonucleótidos (sentido) 5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA3' y (antisentido) 5'CACTTTGTG ACCATCCGGTTTG3'. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial por 10 min a 95 °C seguida por 35 ciclos de un minuto a 95 °C, 30 s de alineación a 62 °C, 72 °C por un minuto y una extensión final a 72 °C, 7 min. El amplificado de 163 pb se sometió a digestión con la enzima de restricción MbolI (Thermo Scientific). Los productos obtenidos se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con nitrato de plata. La enzima MbolI genera fragmentos de 56 pb y 30/31 pb para el alelo A, y de 84 pb y 30/31 pb para el alelo C.

La genotipificación del gen *GSTT1* se realizó por PCR múltiple según el protocolo descrito por Buchard et al.<sup>26</sup>. Se utilizaron 2 pares de cebadores: uno reconoce una secuencia dentro del gen de 969 pb y el segundo se encuentra flanqueando sus extremos. Si hay delección se obtendrá un fragmento de 3.106 pb. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos, 30 s a 94 °C, 7 min a 68 °C y extensión a 69 °C por 10 min. Los amplificadores se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% con *SYBR safe DNA* (Invitrogen) por electroforesis.

La genotipificación de los polimorfismos de *PON1* se realizó por PCR en tiempo real mediante ensayo de discriminación alélica con sondas TaqMan (Applied Biosystems) -108CT (C.11708905.10), Q192R (C.2548962.20) y L55M (C.2259750.20).

## Análisis estadístico

Las variables continuas se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar y las discretas en porcentajes. Para cada polimorfismo se estimaron las frecuencias genotípicas por conteo directo y las alélicas a partir de los genotipos, expresadas en porcentajes. Se utilizó la prueba de Chi cuadrada para comparar las variables categóricas y para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg. Se estimaron los *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza (IC) del 95% para determinar la asociación de cada polimorfismo independiente con la enfermedad, tomando como referencia el genotipo y el alelo silvestre (modelo de herencia codominante) de cada variante, utilizando Stata/SE 12.0. El desequilibrio de ligamiento (LD) entre pares de SNP y el coeficiente de correlación de Pearson ( $r^2$ ) se evaluaron con el programa SNPstat (<https://www.snpstats.net/snpstats/start.htm>). El análisis de epistasia se realizó con el programa MDR 3.0.2 (<http://epistasis.org>), analizando los 6 polimorfismos juntos. De igual forma, se aplicó MDR para determinar la interacción gen-ambiente e identificar el peso de cada una de las variables independientes (polimorfismos, HTA, dislipidemia mixta, colesterol LDL, colesterol HDL, obesidad [IMC > 30] y tabaquismo) en relación con la enfermedad. Para todos los análisis se consideró un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

## Resultados

Las características demográficas y clínicas en pacientes y controles se resumen en la [tabla 1](#). La proporción de hombres y mujeres y el promedio de edad global y por sexos (hombres casos  $49,9 \pm 6,5$  vs. controles  $46,2 \pm 7,3$ ;  $p = 0,29$ ; mujeres casos  $50,5 \pm 6,5$  vs. controles  $46,0 \pm 8,4$ ;  $p = 0,29$ ) fueron similares en ambos grupos. Los factores de riesgo cardiovascular HTA ( $p < 0,001$ ) y dislipidemia mixta ( $p = 0,01$ ) fueron significativamente más prevalentes en el grupo de pacientes. Al estratificar el IMC, se observó un mayor porcentaje de controles con peso normal (30,7 vs. 12,7%;  $p = 0,004$ ) y de pacientes con obesidad (48,1 vs. 19,8%;  $p = 0,0001$ ). El sobrepeso fue el factor de mayor prevalencia en la población general, con un ligero aumento en los sujetos controles (casos 39,2% y controles 47,5%;  $p = 0,07$ ). La presencia de arco corneal y xantelasmas fue similar en ambos grupos ( $p > 0,05$ ).

La [tabla 2](#) muestra la comparación de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados en casos y controles, el equilibrio de Hardy-Weinberg y la asociación con la CI de acuerdo con el modelo de herencia codominante. Con excepción de *GSTT1*, para el cual se detectó mayor prevalencia de enfermos con la delección homocigota del gen (*GSTT1\*0/0*), el resto de los polimorfismos no mostraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos ( $p > 0,05$ ). Para todas las variantes, las frecuencias observadas en los sujetos controles se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ). El desequilibrio observado para el polimorfismo

**Tabla 1** Características antropométricas y clínicas

Variables	Casos n = 79	Controles n = 101	p*
Sexo (hombres/mujeres)	67/12	87/14	0,40
Edad (media $\pm$ DE)	49,6 $\pm$ 6,1	50,2 $\pm$ 7,2	0,05
Promedio IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30,2 $\pm$ 5,1	26,9 $\pm$ 3,8	0,05
Bajo peso (%)	1 (1,3)	2 (1,98)	0,35
Peso normal (%)	10 (12,7)	29 (30,7)	0,004
Sobrepeso (%)	31 (39,2)	50 (47,5)	0,08
Obesidad (%)	38 (48,1)	20 (19,8)	0,0001
Hipertensión arterial (%)	71 (88,8)	62 (61,5)	<0,001
Diabetes mellitus (%)	27 (34,2)	23 (23,7)	0,05
Colesterol LDL <sup>a</sup> (%)	67 (84,8)	75 (74,3)	0,03
Colesterol HDL <sup>b</sup> (%)	21 (26,6)	38 (37,6)	0,06
Dislipidemia mixta (%)	72 (91,1)	80 (79,2)	0,03
Tabaquismo (%)	9 (11,4)	18 (17,8)	0,11
Arco corneal	13 (16,5)	24 (23,8)	0,11
Xantelasmas	9 (11,3)	14 (13,9)	0,30

\* Valor de p para Chi cuadrado.

<sup>a</sup> Cifras de colesterol LDL > 160 mg/dL.

<sup>b</sup> Cifras de colesterol HDL < 40 mg/dL.

**Tabla 2** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados, equilibrio de Hardy-Weinberg y estimación de riesgo (OR) en casos y controles

Gen	SNP	Genotipo Alelo	Casos n= 79 (%)	Controles n= 101 (%)	OR (95% CI) p
<i>PON1</i>	-108CT	CC	26 (33,0)	27 (26,7)	Referencia
		CT	40 (51,0)	49 (48,5)	0,85 (0,43-1,68) 0,73
		TT	13 (16,0)	25 (24,8)	0,54 (0,23-1,28) 0,20
		Alelo C	92 (58,0)	103 (51,0)	Referencia
		Alelo T	66 (42,0)	99 (49,0)	0,75 (0,49-1,14) 0,20
		$\chi^2$ HWE	0,72**	0,77**	
	Q192R	QQ	23 (28,6)	20 (19,8)	Referencia
		QR	41 (52,0)	56 (55,4)	0,82 (0,38-1,75) 0,70
		RR	15 (19,0)	25 (24,8)	0,52 (0,22-1,25) 0,19
		Alelo Q	87 (55,0)	96 (48,0)	Referencia
		Alelo R	71 (45,0)	106 (52,0)	0,74 (0,49-1,12) 0,17
		$\chi^2$ EHW	0,66**	0,26**	
	L55M	LL	55 (70,0)	67 (66,3)	Referencia
		LM	17 (22,0)	31 (30,7)	4,25 (0,97-18,6) 0,08
		MM	7 (9,0)	3 (3,0)	2,84 (0,70-11,5) 0,19
		Alelo L	127 (81,0)	165 (82,0)	Referencia
		Alelo M	31 (19,0)	37 (18,0)	1,09 (0,64-1,85) 0,79
		$\chi^2$ EHW	0,005**	0,80**	
	<i>GSTT1</i>	1/1	31 (39,0)	56 (55,4)	Referencia
1/0		33 (42,0)	37 (36,6)	2,10 (0,79-5,59) 0,15	
0/0		15 (19,0)	8 (7,9)	3,39 (1,29-8,87)	
Presencia		95 (60,0)	149 (74,0)	0,017	
Nulo		63 (40,0)	53 (26,0)	Referencia	
$\chi^2$ EHW		0,25 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	1,86 (1,19-2,91) 0,007	
<i>MTHFR</i>	C677T	C/C	18 (23,0)	25 (25,0)	Referencia
		C/T	42 (53,0)	41 (41,0)	0,53 (0,26-1,07) 0,08
		T/T	19 (24,0)	35 (35,0)	0,75 (0,33-1,72) 0,53
		Alelo C	78 (49,0)	92 (46,0)	Referencia
		Alelo T	80 (51,0)	110 (54,0)	0,86 (0,57-1,30) 0,52
		$\chi^2$ EHW	0,57 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	
	A1298C	A/A	56 (71,0)	77 (55,4)	Referencia
		A/C	22 (28,0)	21 (36,6)	0,32 (0,31-3,31) 0,60
		C/C	1 (10,0)	3 (7,9)	0,46 (0,05-4,52) 0,64
		Alelo A	134 (85,0)	175 (87,0)	Referencia
		Alelo C	24 (15,0)	27 (13,0)	1,16 (0,64-2,10) 0,65
		$\chi^2$ EHW	0,47 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	

EHW: equilibrio de Hardy-Weinberg.

<sup>a</sup> Valor de p para equilibrio de Hardy-Weinberg.

L55M ( $p=0,005$ ) en el grupo de pacientes no se consideró relevante, porque este sesgo pudiera ser indicativo de una relación causal con la enfermedad.

El análisis de asociación para cada polimorfismo independiente detectó que tanto el genotipo como el alelo nulo del gen *GSTT1* confieren a sus portadores 3,39 y 1,86 veces, respectivamente, mayor susceptibilidad a CI que los sujetos portadores del genotipo y el alelo silvestre. El resto de los polimorfismos no mostraron asociación de riesgo.

Se detectó un alto desequilibrio de ligamiento entre los nucleótidos 677 y 1298 del gen *MTHFR* ( $LD' = 0,858$ ;  $r^2 = 0,369$ ;  $p \leq 0,0001$ ) y en menor medida entre Q192R y L55M ( $LD' = 0,394$ ;  $r^2 = 0,207$ ;  $p \leq 0,0001$ ), entre -108CT y Q192R ( $LD' = 0,312$ ;  $r^2 = 0,282$ ;  $p \leq 0,0001$ ) y entre -108CT

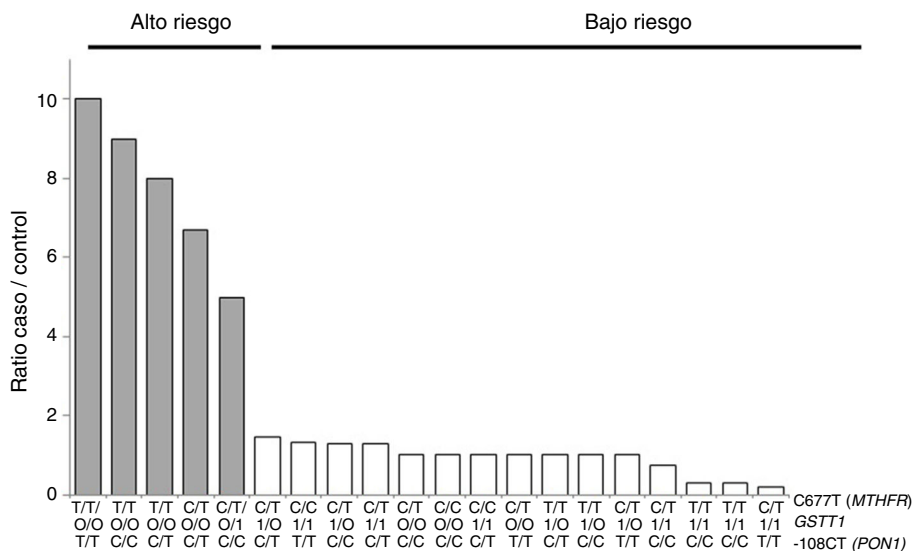
y L55M ( $LD' = 0,394$ ;  $r^2 = 0,207$ ;  $p \leq 0,0001$ ) del gen *PON1*. El gen *GSTT1* y la variante C677T mostraron un moderado desequilibrio de ligamiento ( $LD' = 0,133$ ;  $r^2 = 0,087$ ). Sin embargo, con base en los valores de los coeficientes de correlación y para los efectos de asociación, ninguno de los polimorfismos puede sustituirse entre sí. No se encontró asociación de riesgo con la CI con base en la estimación de haplotipos (datos no mostrados).

Para el análisis multilocus (MDR) se evaluaron los 3 genotipos por separado para cada polimorfismo (modelo de herencia codominante). El MDR identificó como mejor modelo de predicción la interacción entre el gen *GSTT1* y los polimorfismos C677T del gen *MTHFR*, y -108CT de *PON1* con una precisión del 69,7%, una significación de  $p = 0,027$

**Tabla 3** Resumen de las mejores combinaciones de interacción gen-gen obtenidas con el análisis MDR

Mejores interacciones	Precisión	Validación cruzada	p
<i>GSTT1</i>	0,483	6/10	0,887
<i>GSTT1</i> , L55M	0,514	8/10	0,477
C677T, <i>GSTT1</i> , -108CT	0,697	8/10	0,027*
C677T, <i>GSTT1</i> , -108CT, Q192R	0,540	9/10	0,734
C67T, <i>GSTT1</i> , -108CT, Q192R, L55M	0,523	10/10	0,808

\* Valor significativo para p < 0,05.



**Figura 1** Distribución de combinaciones genotípicas de alto (barras grises) y bajo (barras blancas) riesgo estadísticamente significativas (p < 0,005), correspondiente a los 3 polimorfismos identificados en el análisis MDR como el mejor modelo de interacción (*GSTT1*/C677T/-108CT). Las barras grises representan los casos y las blancas los controles.

**Tabla 4** Mejores modelos de interacción gen-ambiente estimados con el análisis MDR

Interacciones	Precisión	p	Validación cruzada
<i>GSTT1</i> , L55 M	0,652	0,673	3/10
<i>GSTT1</i> , C677T, HTA, L55 M	0,704	0,017*	8/10
<i>GSTT1</i> , C677T, Q192R, -108CT, L55 M	0,622	0,311	8/10
<i>GSTT1</i> , C677T, -108CT, HTA, estado nutricional*	0,629	0,236	5/10

El IMC se consideró variable categórica del estado nutricional.  
\* Valor significativo para p < 0,05.

modelo consideró alto riesgo cuando el cociente del porcentaje de casos vs. controles fue superior a 1,25 (fig. 1).

Al incluir en el análisis el MDR (interacción gen-ambiente) de los factores de riesgo obesidad, HTA, dislipidemia mixta, colesterol HDL, colesterol LDL, DM, arco corneal y xantelasmas, el mejor modelo de predicción (p = 0,017) mantuvo la interacción entre el gen *GSTT1* y el polimorfismo C677T (MTHFR), e identificó a la hipertensión arterial como el factor de riesgo que más contribuye al riesgo cardiovascular en esta población (tabla 4).

### Discusión

Para establecer modelos de predicción de riesgo para enfermedades complejas se requieren instrumentos estadísticos avanzados que consideren tanto el efecto de las múltiples interacciones genéticas como del ambiente. El análisis MDR ya ha sido utilizado en estudios de asociación de enfermedades complejas como cáncer<sup>27</sup>, diabetes de tipo 2<sup>28</sup>, hipertensión esencial<sup>29</sup>, enfermedad coronaria<sup>30</sup> y polineuropatía amiloide<sup>31</sup>, entre otras.

En este estudio, la asociación independiente entre el genotipo nulo *GSTT1* y la CI (tabla 2) se confirmó en el análisis de epistasia multilocus, lo que puede indicar que, al menos en esta población, la ausencia del gen *GSTT1*

y una validación cruzada de 8/10. Los modelos con 2, 4 y 5 interacciones mostraron una disminución en la precisión, sin significación estadística (tabla 3). De las 24 combinaciones genotípicas estimadas, los individuos con delección del gen *GSTT1* (genotipo nulo) y los homocigotos para el alelo T (C677T), con independencia del genotipo -108CT, fueron identificados en el grupo de alto riesgo cardiovascular. El

podría constituir un marcador de riesgo genético para el desarrollo temprano de CI. Estudios previos han evaluado la asociación entre el genotipo nulo *GSTT1\*0* y la susceptibilidad a la enfermedad coronaria, pero los resultados no son concluyentes: algunos trabajos han encontrado asociación significativa y otros no<sup>32-36</sup>. Estas inconsistencias pueden atribuirse a las diferentes magnitudes de riesgo obtenidas en los diferentes estudios, al pequeño efecto del polimorfismo en la enfermedad, a reducidos tamaños de muestras y a las metodologías utilizadas. Desde el punto de vista fisiopatológico, la relación entre *GSTT1* y la aterosclerosis se establece por vía enzimática, a través de la cual *GSTT1* elimina metabolitos tóxicos y productos del estrés oxidativo<sup>37,38</sup>. En los sujetos carentes de la enzima, los compuestos generados por el metabolismo celular que son eliminados por la vía *GSTT1* se acumulan en el endotelio, propiciando la disfunción endotelial<sup>39-41</sup>. La segunda vía, definida recientemente, se refiere al papel de *GSTT1* como modulador y regulador de proteínas que intervienen en los mecanismos de señalización celular<sup>42,43</sup>. Se ha propuesto que *GSTT1* envía señales inhibitorias a proteínas cinasas responsables de regular la proliferación de las células musculares lisas en la íntima arterial<sup>43</sup>. En los individuos que carecen de la enzima, la proliferación de las células musculares pudiera estar exacerbada, lo que contribuiría a un mayor crecimiento de las placas de ateroma en comparación con los sujetos portadores de la enzima funcional.

Con respecto al gen *MTHFR*, también existen discrepancias sobre su asociación con el riesgo cardiovascular. La mayoría de los estudios proceden de grupos caucásicos y asiáticos, con escasos reportes en poblaciones latinas. Un metaanálisis que incluyó 22 estudios de casos y controles pareados por edad, encontró una diferencia en el valor promedio de Hcy entre el genotipo silvestre CC y el mutado TT (C677T) de 2,7 mmol/L<sup>44</sup>. El polimorfismo C677T y la alteración en los niveles de folato se ha relacionado también con la hipometilación del ADN y, en consecuencia, con un mayor riesgo de aterosclerosis<sup>45,46</sup>. Existen pruebas de que los portadores del genotipo TT poseen valores de metilación de ADN genómico más bajos que los sujetos con genotipo silvestre CC<sup>47</sup>. Sin embargo, también se ha reportado que no todos los individuos portadores de la variante termolábil (677TT) poseen niveles aumentados de Hcy, y que, entre aquellos que lo tienen, sus valores se han normalizado después de la suplementación con folato<sup>48,49</sup>, por lo que podría tratarse de una mutación neutral para los niveles de Hcy cuando el estatus de folato es adecuado<sup>50</sup>. Por otra parte, existen pocos datos sobre el papel de la Hcy en pacientes con CI prematura. Se ha reportado que la hiperhomocitemia es un factor de riesgo independiente para trombosis coronaria en sujetos menores de 50 años, más que para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria<sup>51,52</sup>. En México, poco se ha explorado sobre la relación del gen *MTHFR* con la enfermedad isquémica de causa aterosclerótica. Isordia et al., al evaluar a 167 pacientes de la Ciudad de México, no encontraron asociación independiente entre los portadores del genotipo TT (C677T) y el riesgo de infarto de miocardio prematuro ( $\leq 45$  años)<sup>53</sup>. En nuestro estudio, ninguno de los polimorfismos *MTHFR* mostraron asociación de riesgo independiente con la CI temprana (tabla 2). Sin embargo, con base en los resultados del análisis multilocus, pudiéramos

considerar que el gen *MTHFR* no es suficiente pero sí necesario para el desarrollo de enfermedad isquémica, al menos en esta población. En este sentido, el análisis MDR puede ser útil como estrategia analítica para indagar el efecto simultáneo de diferentes loci y detectar así relaciones de riesgo con enfermedades complejas.

Con respecto al análisis de epistasia, el MDR identificó como mejor modelo la interacción entre el gen *GSTT1* y el polimorfismo C677T (*MTHFR*) con independencia de la variante -108CT (*PON1*), que pudiera actuar como un modificador de efecto en la interacción (fig. 1). Con base en los genotipos de alto y bajo riesgo obtenidos, podemos señalar que *GSTT1* y C677T pueden actuar sinérgicamente: los sujetos portadores del genotipo 677TT (*MTHFR*) con ausencia del gen *GSTT1* tendrán mayor susceptibilidad a desarrollar eventos isquémicos, mientras que aquellos con el gen *GSTT1* funcional y la variante CC677 estarán más protegidos. Varios estudios han reportado interacción de genes *GST* con *MTHFR*<sup>54-56</sup>, pero solo unos pocos han realizado análisis de epistasia<sup>57,58</sup>. Además de los mecanismos epistáticos en los que un gen puede modificar su expresión por acción de otro u otros genes, el efecto de interacción *GSTT1-MTHFR* también podría darse a través de mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica, específicamente la metilación, cuyas alteraciones se producen en diversas enfermedades. En la aterosclerosis, modelos *in vitro* han evidenciado que la metilación del ADN es un proceso de inicio temprano, en el que existe tanto metilación excesiva como deficiente en distintos genes, mientras que, en las etapas avanzadas de la enfermedad, la hiperproliferación de las células del músculo liso vascular induce la hipometilación del ADN<sup>45,47,59,60</sup>.

Otra posible explicación del efecto combinado *GSTT1-MTHFR* podría estar en la relación que las enzimas codificadas por estos genes tienen en las vías metabólicas involucradas en la protección contra el estrés oxidativo. La Hcy sirve como precursor de las enzimas S-adenosilmetionina (SAM)/S-adenosilmetionina (SAH), vinculadas con la metilación y desmetilación de ADN, ARN y proteínas; y también como precursor del glutatión (GSH), necesario en los procesos de desintoxicación mediados por *GST*<sup>61,62</sup>. Por tanto, se podría decir que los cambios en los patrones de metilación y la alteración en los niveles de ciertas enzimas del metabolismo de oxidación-reducción podrían ser parte de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis.

Finalmente, el análisis de interacción gen-ambiente identificó a los genes *GSTT1* y *MTHFR* conjuntamente con la HTA como los factores que mejor pronostican la CI en la población estudiada. Respecto al polimorfismo L55M, su presencia en el modelo gen-ambiente pudiera deberse al desequilibrio de ligamiento con la variante -108CT ( $LD' = 0,394$ ;  $r^2=0,207$ ;  $p \leq 0,0001$ ) (tabla 4). Estudios previos han mostrado que la patogénesis de la HTA se asocia con alteraciones en el metabolismo del glutatión<sup>63,64</sup>. Hay pruebas de que las células mononucleares de sujetos hipertensos tienen niveles significativamente más bajos de *GST* que en los sujetos sanos, y que la actividad de las enzimas en esta vía metabólica también disminuye, incluyendo las *GST*<sup>65,66</sup>. Estos bajos niveles de enzimas antioxidantes en la hipertensión se deben a las condiciones de estrés oxidativo imperantes

en el entorno vascular, las cuales se revierten con el tratamiento antihipertensivo<sup>67</sup>. También se ha reportado a los genotipos nulos *GSTM1* y *GSTT1* como potenciales factores de riesgo para la predicción de hipertensión esencial<sup>67,68</sup>.

## Conclusiones

En este estudio, el análisis de epistasia señala que la combinación de diferentes variantes alélicas de genes antioxidantes como *GSTT1* y *MTHFR* conjuntamente con la HTA puede influir en la variabilidad genética para la predisposición al desarrollo de eventos isquémicos tempranos en la población de Yucatán. El análisis MDR puede ser útil para evidenciar el papel de las interacciones epistáticas en la etiopatogenia de enfermedades complejas como la cardiopatía isquémica.

## Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio Biomédicos de Mérida (Yucatán, México).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Lusis A, Fogelman A, Fonarow G. Genetic basis of atherosclerosis: Part I: New genes and pathways. *Circulation*. 2004;110:1868–73.
- Ioannidis J, Trikalinos A, Khoury M. Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases. *Am J Epidemiol*. 2006;163:609–14.
- Companioni O, Rodríguez E, Medina-Fernández A, Rodríguez-Pérez J. Variantes genéticas, riesgo cardiovascular y estudios de asociación de genoma completo. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:509–14.
- Marcus MW, Raji OY, Duffy SW, Young RP, Hopkins RJ, Field JK. Incorporating epistasis interaction of genetic susceptibility single nucleotide polymorphisms in a lung cancer risk prediction model. *Int J Oncol*. 2016;49:361–70, 25.
- Cattaert T, Calle ML, Dudek SM, Mahachie John JM, van Lishout F, Urrea V, et al. Model-based multifactor dimensionality reduction for detecting epistasis in case-control data in the presence of noise. *Ann Hum Genet*. 2011;75:78–89.
- Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol*. 2006;241:252–61.
- Moore JH. Detecting characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Adv Genet*. 2010;72:101–16.
- Hayes J, Strange R. Glutathione S-Transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*. 2000;61:154–66.
- Tang JJ, Wang M, Jia EJ, Yan JJ. The common variant in the *GSTM1* and *GSTT1* genes is related to markers of oxidative and inflammation in patients with coronary artery disease: A case-only study. *Mol Biol Rep*. 2010;47:405–10.
- Graham A, Hassall D, Rafique S, Owen J. Evidence for a paraoxonase-independent inhibition of low-density lipoprotein oxidation by high-density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1997;135:193–204.
- Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res*. 2009;130:361–8.
- Humbert R, Adler D, Disteche C. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 1993;3:73–6.
- Mackness B. Polymorphisms of the paraoxonase genes and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Lancet*. 1999;353:468–9.
- Mackness B, Turkie W, Mackness M. Paraoxonase-1 (PON1) promoter region polymorphisms, serum PON1 status and coronary heart disease. *Arch Med Sci*. 2013;21:8–13, 9.
- Nikfardjam M, Graf S, Hornykewycz S, Zorn G, Huber-Beckmann R, Wojta J. Homocysteine plasma levels in young patients with coronary artery disease. Relation to history of acute myocardial infarction and anatomical extent of disease. *Thromb.Res*. 2001;103:S35–9.
- Chao CL, Tsai HH, Lee CM, Hsu SM, Kao JT, Chien KL. The graded effect of hyperhomocysteinemia on the severity and extent of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999;147:379–86.
- Ince FD, Atay A, Koseoglu MH, Ellidag HY, Yesil M, Devenci E. The severity of coronary artery disease and methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) enzyme gene polymorphism. *Int J Cardiovasc Res*. 2016;10:172–8.
- Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rosen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998;64:169–72.
- Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Ellison C, et al. The 1298A3C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*): In vitro expression and association with homocysteine. *Atheroscler*. 2001;156:409–15.
- 2013 ACCF/AHA/ASE/ASNC/HFSA/HRS/SCAI/SCCT/SCMR/STS Multimodality appropriate use criteria for the detection and risk assessment of stable ischemic heart disease.
- 2013 ACCF/AHA. Guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61.
- National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) 2011. Clinical guideline for hypertension.
- The Expert Panel. Third Report of National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel of detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adults treatment panel III). Final report. *Circulation*. 2002;106:3143–3421.
- 2014 Clinical Practice Recommendation. American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl: S5–S13. <https://doi.org/10.2337/dc14-S005>
- Bunce M. PCR-SSP typing. En: Lidwell JL, Navarrete C, eds.;1; *Histocompatibility testing*. London: Imperial College Press; 2000. p. 167–76.
- Buchard A, Sánchez JJ, Dalhoff Morling N. Multiplex PCR detection of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* gen variants. *Mol Diagn*. 2007;9:612–7.
- Ritchie M, Halm L, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet*. 2001;69:138–47.
- Cho YM, Ritchie MD, Moore JH, Park JY, Lee KU. Multifactor-dimensionality reduction shows a two locus interaction associated with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology*. 2004;47:549–54.
- Moore H, Williams SM. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. *Ann Med*. 2002;34:88–95.



30. Asselbergs FW, Moore JH, van den Berg M, Rim EB, Boer RA, Dullaart RP, et al. A role for CETP TaqIB polymorphism in determining susceptibility to auricular fibrillation: A nested case control study. *BMC Med Genet.* 2006;7:39–48.
31. Soares MI, Coelho T, Sousa A, Batalov S, Conceicao I. Susceptibility and modifier genes in Portuguese transthyretin V30M amyloid polyneuropathy: Complexity in a single-gene disease. *Human Mol Genet.* 2005;14:543–53.
32. Du Y, Wang H, Fu X, Sun R, Liu Y. GSTT1 null genotype contributes to coronary heart disease risk: A meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39:8571–9.
33. Wilson M, Grant PJ, Kain K, Warner DP, Wild CP. Association between the risk of coronary artery disease in South Asians and a deletion polymorphism in glutathione S-transferase M1. *Biomarkers.* 2003;8:43–50.
34. Abu-Amero K, Al-Boudari OM, Mohamed GH, Dzimiri N. T null and M null genotypes of the glutathione S-transferase gene are risk factor for CAD independent of smoking. *BMC Med Genet.* 2006;7:38–43.
35. Bhat MA, Gandhi G. Association of GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms with coronary artery disease in North Indian Punjabi population a case-control study. *Postgrad Med J.* 2016;92:701–6.
36. Yeh HL, Kuo LT, Sung FC, Chiang CW, Yeh CC. GSTM1, GSTT1, GSTP1, and GSTA1 genetic variants are not associated with coronary artery disease in Taiwan. *Gene.* 2013;523:64–9.
37. Ginsberg G, Smolenski S, Hattis D, Guyton K, Johns D, Sonawane B. Genetic polymorphism in glutathione transferase (GST): Population distribution of GSTM1, T1, and P1 conjugating activity. *J Toxicol Envir Health, Part B.* 2009;12:389–439.
38. Ranganna K, Mathew O, Yatsu F. Involvement of glutathione/glutathione S-transferase antioxidant system in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *FEBS J.* 2007;274:5962–78.
39. Lin T, Yang MS. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GST level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. *Toxicology.* 2007;235:1–10.
40. Tang J, Wang M, Jia EJ, Yan JJ. The common variant in the GSTM1 and GSTT1 genes is related to markers of oxidative and inflammation in patients with coronary artery disease: A case-only study. *Mol Biol Rep.* 2010;47:405–10.
41. Binkova B. DNA adduct and atherosclerosis: A study of accidental and sudden death males in the Czech Republic. *Mutat Res.* 2002;501:115–28.
42. Gong X, Ming X, Deng P, Jiang Y. Mechanisms regulating the nuclear of p38 MAP kinase. *J Cell Biochem.* 2010;110:1420–9.
43. Ito M, Imai M, Muraki M, Miyado K, Qin J, Kyuwa S, et al. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-MK2 signaling pathway in human granulosa cells: Possible association with mitochondrial activity. *Aging.* 2011;3, 1213-23-29.
44. Wald D, Law M, Morris J. The dose–response relation between serum homocysteine and cardiovascular disease: Implications for treatment and screening. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009;11:250–3.
45. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→T and 1298A→C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet.* 2004:454–8.
46. Castro R, Rivera I, Struys E, Jansen E, Ravasco P. Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clin Chem.* 2003;49:1292–6.
47. Friso S, Choi S, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski G, Bagley PJ, et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:5606–11.
48. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: A thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet.* 1988;43:414.
49. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora H, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet.* 1991;48:536.
50. Girelli D, Friso S, Trabetta E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine and folate in subjects from northern Italy or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: Evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood.* 1998;91:4158–63.
51. Ogawa M, Abe S, Saigo M. Homocysteine and hemostatic disorder as a risk factor for myocardial infarction at a young age. *Thromb Res.* 2003;109:253–8.
52. Sadeghian S, Fallahi F, Salarifar M. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in premature coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006;6:38.
53. Isordia-Salas I, Trejo-Aguilar A, Valadés-Mejía MG, Santiago-Germán D, Leños-Miranda A, Mendoza-Valdéz L, et al. C677T polymorphism of the 5,10 MTHFR gene in young subjects with ST-elevation myocardial infarction. *Arch Med Res.* 2010;41:246–50.
54. Dhilon VS, Shahid M, Husain SA. Associations of MTHFR DNMT3b 4977bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpC island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Mol Hum Reprod.* 2007;13:213–22.
55. Gutiérrez-Amavizca BE, Orozco-Castellanos R, Ortíz-Orozco R, Padilla-Gutiérrez J, Valle Y, Gutiérrez-Gutiérrez N, et al. Contribution of GSTM1 GSTT1, and MTHFR polymorphisms to end-stage renal disease of unknown etiology in Mexicans. *Indian J Nephrol.* 2013;23:438–43.
56. Ding H, Liu W, Yu X, Wang L, Shao L, Wei Yi. Risk association of meningiomas with MTHFR C677T and GSTs polymorphisms: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:3904–14.
57. Dordevic V, Nolic L, Ljubic M, Nestorovic A, Ristanovic M, Tulic C, et al. Combined effect of GSTM1 gene deletion, GSTT1 gene deletion and MTHFR C677T mutation in male infertility. *Arch Biol Sci, Belgrade.* 2010;62:530–1.
58. Paracchini V, Garte S, Taioli E. MTHFR C677T polymorphism GSTM1 deletion and male infertility: A possible suggestion of a gene-gene interaction? *Biomarkers.* 2006;11:53–60.
59. Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga M, Villar-Garea A, et al. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem.* 2004;279:29147–54.
60. Kim J, Kim J, Song K, Lee Y, Seo J, Jelinek J, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:72–80.
61. Jamaluddin MD, Chen I, Yang F, Jiang X, Jan M, Liu X, et al. Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. *Blood.* 2007;110:3648–55.
62. Schnabel R, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C, Torzewski M, Lubos E, et al. Glutathione peroxidase-1 and homocysteine for cardiovascular risk prediction: Results from the AtheroGene study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1631–7.
63. Bessa SS, Ali EM, Hamdy SM. The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. *Eur J Inter Med.* 2009;2:625–30.
64. Chaves FJ, Mansego ML, Blesa S, Gonzalez-Albert V, Jimenez J, Tormos MC. Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension. *Am J Hyperten.* 2007;20:62–9.

65. Da Silva AP, Marinho C, Goncalves MC, Monteiro C, Laires MJ, Falcao L, et al. Decreased erythrocyte activity of methemoglobin and glutathione reductases may explain age-related high blood pressure. *Rev Port Cardiol.* 2010;29:403–12.
66. Grossman E. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S185–9.
67. Oniki K, Hori M, Takata K, Yokoyama T, Mihara S, Marubayashi T, et al. Association between glutathione S-transferase A1 M1 and T1 polymorphisms and hypertension. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18:275–7.
68. Wang J, Zou L, Huang S, Lu F, Lang X, Han L, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1 GSTT1 and risk of coronary heart disease. *Mutagenesis.* 2010;25:365–9.