

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ANÁLISIS DE LA FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO GLU298ASP
DE LA ENZIMA SINTASA ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO EN
POBLACIONES INDÍGENAS Y MESTIZA MEXICANAS”

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A

ADRIÁN FLORES SEGURA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***Gobierna tu casa y sabrás cuanto cuesta la leña y el arroz;
cría a tus hijos y sabrás cuanto debes a tus padres.***

Proverbio Oriental.

La fortuna juega a favor de una mente preparada.

Louis Pasteur.

DEDICATORIA

Por su amor hacia mí sin que haya importado lo que hiciera, por estar conmigo cuando más lo he necesitado y por todo aquello que hicieron por mí para que aprendiera de ustedes quizá no a ser el mejor, pero si a hacer bien las cosas; Sé que mis hermanos comprenderán que sólo a ustedes podía dedicarles mi trabajo.

Efrén Flores & Soledad Segura los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Haydeé Rosas. *Haydeé* gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis y compartir conmigo tus conocimientos y experiencia, por contagiarme del gusto, la entrega y perfección que tienes por el trabajo, que tal vez sea difícil de conseguir, pero creo que es más difícil de transmitir. Gracias por tu amistad sobre todo.

Al Dr. Ramón Coral. Gracias *Ramón* por tu amistad y el apoyo que siempre me has brindado, eres una excelente persona y eso es algo que se cultiva y se comparte, otra vez gracias Ramón.

A mis hermanos: *Adela, Arturo, Verónica, Rafael, Alma Gloria, Mauricio, Ismael & Dulce Jahel*, porque ustedes han sido un ejemplo para mí y han compartido experiencias que convergen en el cariño que cada uno tiene hacia mí y que es recíproco de parte mía.

Al Dr. Diego Arenas. *Diego* gracias por todas las atenciones que recibí de tu parte, es increíble ese gusto manifiesto que tienes por compartir todo tu acervo de conocimiento, por tu amistad sinceramente: Gracias!

A mis revisores M. en C. Ramón Moreno, M. en C. Irma Dueñas & M. en C. Ma. Eugenia Heres, porque además de los comentarios y sugerencias que emitieron para mejorar este trabajo, también tuve la oportunidad de cursar asignaturas con ustedes (*Ramón e Irma*) y aunque no fue así con la maestra Heres, sé que habría sido provechoso

A la Bióloga *Ma. Elena* Dávila Castillo, gracias por ser un gran ejemplo para mí, por el apoyo y la amistad que siempre me has prodigado. No he sido como tú, pero algo tengo de ti.

A *Lulú* Mendoza, porque me enseñaste a vivir la vida de la manera en que la vives tú, a seguir de frente y lograr lo que cada uno deseaba. Gracias por tu cariño y todo lo indescriptible que pasamos juntos.

A *Ana Laura* Gutiérrez. Gracias *Dra.* Por devolverme la ilusión y la fuerza de iniciar nuevos proyectos y permitirme estar a tu lado para compartir todo lo que nos suceda. Te amo!

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular de la U.I.M. en Genética Humana del Hospital de Pediatría en el Centro Médico Nacional SXXI. IMSS: M. en C. *Javier* Estrada, Biól. *Pedro* Meza, Biól. *Valentina* Islas, M. en C. *Israel* Ramírez, Biól. *Irene* Sánchez & Biól. *Paúl* Delgado, gracias a ustedes mi estancia en el laboratorio ha sido más amena y se ha visto enriquecida de sus conocimientos y sugerencias. Nuevamente gracias!

A mis amigos de toda la vida: *José Luis* Ortiz, *Carmen* Álvarez, *Erik* Figueroa, *Sandra* Guzmán, *Raúl* Morales & *Alberto* Gutiérrez, porque a pesar del tiempo y de nuestras diferentes profesiones no hemos dejado de lado nuestra amistad. Gracias por siempre, porque estuvieron conmigo en los momentos que los necesité y por considerarme siempre que ustedes quisieron compartirme algo suyo.

A mis compañeros y amigos durante toda la carrera: *Roberto* Cortés, *Ana Ma.* Quiroz, *Omar* González, *Elizabeth* Álvarez, Luis *Chiquillo*, *Claudia* Montiel, & *Marcos* Aldana. Por todo lo que compartimos durante este tiempo -incluye prácticas de campo-, pero sobre todo por la amistad que establecimos entre nosotros y que sigue tal cual fue la primera vez que coincidimos en Iztacala.

A *Sari* Hurtado & *Horacio* Cortés, gracias por permitirme estar con ustedes durante este tiempo, gracias por su apoyo y su amistad. Cada uno de ustedes es muy especial para mí.

A *Pablo* Reyes, *Carmen* Silva, *Iván* Sáyago, *Myrna* Martínez & *Víctor* Dávila: Gracias a todos ustedes, pues cada uno compartió conmigo de acuerdo a su personalidad y se mostró tal cual es, gracias por su amistad.

A *Martha* Lucas por su valiosa amistad. Gracias *Martha* por todo el tiempo que hemos disfrutado juntos, gracias siempre porque te preocupaste de mí para que mejorara y cometiera menos errores y por darme la posibilidad de conocerte como hasta ahora.

A *Cecilia* González & *Brenda* Alatorre por ser un dúo maravilloso y hacer de mi recursamiento algo notable, Gracias por su amistad.

A mis compañeros: *Lian* Romo, *Julia* Torres, *Prisciliana* Velásquez, *Oscar* Pineda, *Karina* Guardado, *Alina* Uribe, *Manuel* Ayala, *Edgar* Oaxaca y a todos aquellos que por ahora pudiera olvidar. Gracias!!!

A los integrantes de las familias *Navarro Quezada* & *Villanueva Sánchez* porque siempre que pudieron se preocuparon por mi como persona y por considerarme un amigo suyo. Infinitas gracias.

A mi universidad, la UNAM, y mi facultad, *Iztacala*, por la oportunidad de una formación de calidad, la cual espero seguir aprovechando.

ÍNDICE

ABREVIATURAS USADAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 ÓXIDO NÍTRICO	9
1.1.1 SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO	10
1.1.2 SINTASA ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO	14
1.2 EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL ENDOTELIO	16
1.3 POLIMORFISMOS EN EL GEN NOS3 Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES	17
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL Y MÉTODOS	23
4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	23
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN	25
4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	26
4.4 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN POR ENDONUCLEASAS	27
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	34
9. ANEXOS	35
9.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO	35
9.2 TABLA DE FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS	36
9.3 PUBLICACIÓN	38
10. REFERENCIAS	44

Abreviaturas Usadas :

ADN	Acido desoxirribonucleico
Asp	Aspartato
Atm	Atmósfera
BH ₄	Tetra-hidrobiopterina
Ca ⁺⁺	Calcio
CaM	Calmodulina
cGMP	Guanosin Monofosfato cíclico
eNOS	Sintasa de Óxido Nítrico Endotelial
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FMN	Flavina Mononucleótido
G	Guanina
Glu	Glutamato
iNOS	Sintasa de Óxido Nítrico Inducible
Kb	Kilobases
mM	Milimolar
NADPH	Nicotinamida Dinucleótido Fosfato reducido
ng	Nanogramos
NHA	N ^G -Hidroxi-L-arginina
nNOS	Sintasa de Óxido Nítrico Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomoles
Pro	Prolina
RCLB	Amortiguador de lisis de células rojas (eritrocitos)
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
T	Timina
Thr	Treonina
VNTR	Repetidos en tándem de longitud variable

RESUMEN

El óxido nítrico derivado de endotelio es una molécula importante en la fisiología cardiovascular, particularmente en la vasodilatación, esta molécula es sintetizada por la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS). El polimorfismo Glu298Asp (894 G→T) en el exón 7 causa la conversión de Glutamato a Aspartato en el codón 298. Este polimorfismo ha sido asociado a enfermedades cardiovasculares en diversas poblaciones. En este trabajo se determinó a través del método de restricción por endonucleasas la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp en personas sanas de poblaciones mexicanas de Huastecos, Mayas, Mayos y Mestizos. Las frecuencias alélicas fueron similares en las poblaciones mexicanas, pero se observan diferencias significativas cuando se comparan con poblaciones caucásicas. Sin embargo, al hacer la comparación con poblaciones asiáticas, las poblaciones de Huastecos y mestizos difieren significativamente. Genotípicamente sólo la población mestiza presentó homocigotos para el alelo Asp298. La ausencia de homocigotos para el alelo Asp298 en las poblaciones indígenas es similar a los datos registrados en poblaciones japonesas, así como en la población coreana y china, lo cual aunado a la baja frecuencia del polimorfismo Glu298Asp en las poblaciones mestiza e indígenas mexicanas puede estar relacionado con el origen asiático de las poblaciones amerindias.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de relativa estabilidad debido a que posee un electrón desapareado en el orbital 2p. Cuando el óxido nítrico se encuentra a temperatura ambiente es un gas incoloro (Lozano y Vigata, 1989) cuya solubilidad es de 1.9 mM/atm en solución acuosa, similar a la del oxígeno molecular. Debido a su naturaleza no polar y relativa estabilidad el NO puede difundir a una tasa de 50 $\mu\text{m/s}$ en solución acuosa (Loscalzo, 2000). Su vida media *in vivo* es de aproximadamente 10s debido a su rápida oxidación en nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) como resultado de la reacción con el oxígeno y el anión superóxido O_2^- (Datillo, 1997), además del agua (Snyder y Bredt, 1992).

El NO es una molécula mensajera ubicua, que se encuentra involucrada en diversas funciones tales como el proceso de angiogénesis y permeabilidad vascular (Fukumura *et al.*, 2001), también participa en el control de la agregación plaquetaria y la agregación leucocitaria a endotelio, así como en la regulación de la actividad mitótica de células de músculo liso, el tono vascular, la quimiotaxis monocítica, etc., que representan funciones de importancia fundamental en la fisiología cardiovascular.

El NO sintetizado biológicamente se libera a partir de L-arginina y oxígeno molecular en la reacción catalizada por una familia de isoenzimas llamadas sintasas de óxido nítrico (NOS, por sus siglas en inglés: Nitric Oxide Synthase). Estas enzimas presentan diferentes propiedades entre sí, dependiendo del tejido en donde se encuentran, lo que sugiere algún tipo de metabolismo particular, de acuerdo a la función en cada tipo de tejido. El NO se origina a partir de la oxidación de uno de los átomos de nitrógeno terminales del aminoácido L-arginina por las NOS, teniendo a N^G -Hidroxi-L-arginina (NHA) como intermediario (Hemmens y Mayer, 1997) (Fig.1). El principal regulador de la actividad del NO es el anión superóxido, que es producido bajo condiciones fisiológicas como parte normal del metabolismo y puede reaccionar con otras especies reactivas de oxígeno o ser degradado por la enzima superóxido dismutasa a peróxido de hidrógeno y oxígeno.

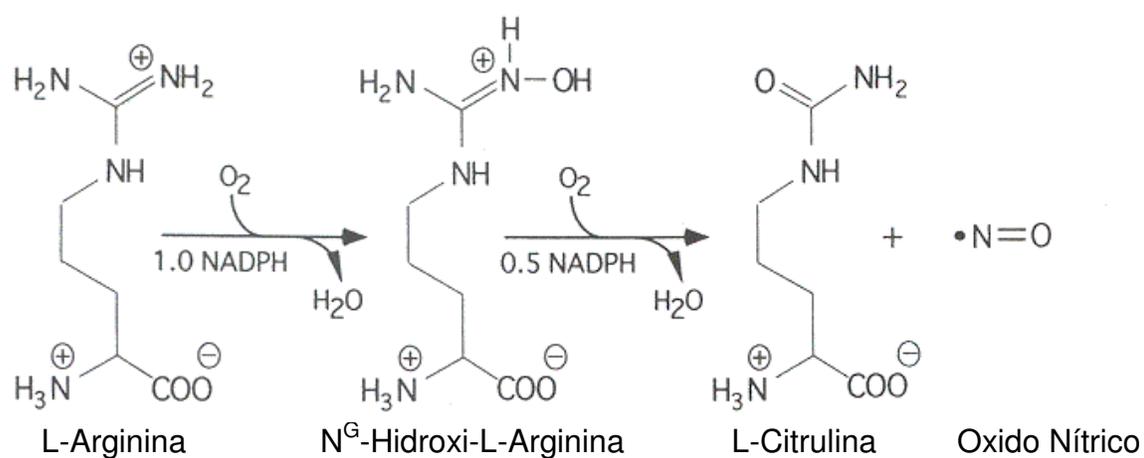


Figura 1. Reacción de las enzimas sintasas de óxido nítrico (NOS). Las NOS catalizan la conversión de L-Arginina en L-Citrulina en presencia de Nicotinamida Dinucleótido Fosfato reducido (NADPH) y oxígeno molecular, todas las NOS utilizan L-Arginina como sustrato.

1.1.1 SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO

De las enzimas sintasas de óxido nítrico se han identificado tres isoformas principales: dos constitutivas, la neuronal (nNOS; tipo I) y la endotelial (eNOS, tipo III); así como una forma inducible (iNOS; tipo II). La nNOS está presente principalmente en músculo y tejido nervioso, mientras que la eNOS se encuentra en endotelio (Alderton *et al.*, 2001). La iNOS fue identificada inicialmente en macrófagos, tiene la característica de unirse a calmodulina (CaM) a bajas concentraciones de calcio, por lo que es considerada independiente de calcio; esta isoforma es de expresión más generalizada, incluye células endoteliales, músculo liso vascular, miocitos y neutrófilos, además de los ya mencionados macrófagos. Usualmente iNOS no se encuentra presente en las células bajo condiciones fisiológicas, sin embargo se expresa después de la estimulación de las células con citocinas y endotoxinas (Dattilo y Makhoul, 1997).

Las NOS tienen una estructura formada por dos dominios principales: el dominio oxigenasa en el extremo amino terminal que contiene sitios de unión a tetra-hidrobiopterina (BH₄) y a L-arginina, mientras que el dominio reductasa contiene sitios para Flavina Mononucleótido (FMN), Dinucleótido Flavina Adenina (FAD) y Dinucleótido Nicotinamida Fosfato reducido (NADPH) (Alderton *et al.*, 2001). Las NOS muestran una homología entre sí, de 50-60% aproximadamente, particularmente en el extremo carboxilo terminal (Datillo, 1997).

Las NOS han sido caracterizadas como hemoproteínas tipo citocromo P450, que requieren BH₄, FMN y FAD como cofactores, y catalizan la oxidación dependiente de NADPH de L-arginina para formar L-citrulina y NO. BH₄ es esencial para realizar el transporte de electrones hacia el grupo hemo de las NOS (Landmesser y Harrison, 2001).

Las NOS están reguladas mediante la interacción con CaM, lo cual resulta necesario para la actividad enzimática en las tres isoformas. La dependencia de Ca⁺⁺ en la síntesis de NO es notable en las enzimas nNOS y eNOS ya que, a diferencia de iNOS, requieren altas concentraciones de Ca⁺⁺. La unión de CaM incrementa la tasa de transferencia de electrones a partir de NADPH a las flavinas del dominio reductasa. La fosforilación de las NOS endotelial y neuronal también tiene un efecto regulatorio sobre la actividad enzimática, así lo reportan Fulton *et al.* (2001) en la fosforilación de la Serina

1179 (Ser¹¹⁷⁹) de eNOS, la cual incrementa el flujo de electrones a través del dominio reductasa y un incremento en la producción de NO, mientras que la fosforilación de la Ser⁸⁴⁷ de nNOS, por una cinasa dependiente de CaM, lleva a una disminución de la actividad de nNOS.

Los genes de las sintasas de óxido nítrico muestran una estructura genómica similar, lo que sugiere la existencia de un gen ancestral común en humanos. El gen *NOS1* que codifica la nNOS se ubica en el locus 12q24.2 – 24.3 y está constituido por 29 exones. Para la nNOS se han identificado 4 variantes por “splicing”, nNOS β , nNOS γ , nNOS μ y nNOS-2. El gen *NOS2* que codifica la iNOS, se encuentra localizado en 17cen – q11.2 en el cromosoma 17, constituido por 26 exones y con un tamaño aproximado de 37 kilobases (Kb). (Alderton *et al.*, 2001). El gen *NOS3* que codifica la eNOS se localiza en el locus 7q35 a 36, cuya secuencia se encuentra comprendida por 21 kb distribuidas en 26 exones, (Feron *et al.*, 1996). Para esta isoforma no se han identificado variantes alternativas por “splicing” (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las isoformas de sintasas de óxido nítrico humanas.
(Modificado de: Hemmens y Mayer, 1997)

Isoforma	Abreviatura	Locus	Expresión	Tejido
NEURONAL	nNOS	12q24.2-12q24.3	Constitutiva	Células neuronales y de músculo esquelético
	Tipo I		Ca ⁺⁺ dependiente	
INDUCIBLE	iNOS	17cen-17q11.2	Inducible mediante proceso inflamatorio	Músculo Liso, macrófagos, miocitos, neutrófilos.
	Tipo II		Ca ⁺⁺ independiente	
ENDOTELIAL	eNOS	7q35-7q36	Constitutiva	Células endoteliales, epiteliales y de músculo liso
	Tipo III		Ca ⁺⁺ dependiente	

1.1.2 SINTASA ENDOTELIAL DE ÓXIDO NÍTRICO

La eNOS es la isoforma responsable de la homeostasis cardiovascular, regulación de la presión sanguínea y angiogénesis (Fulton *et al.*, 1999). El gen *NOS3* que codifica para la eNOS, se encuentra en el locus 7q35 a 36, tiene una secuencia de 21 Kb y una secuencia codificante distribuída en 26 exones (Marsden *et al.*, 1993), los cuales dan origen a una proteína de 1205 aminoácidos, con una masa molecular aproximada de 135 kDa (Feron *et al.*, 1996). El promotor del gen *NOS3* no tiene caja TATA y muestra sitios de unión a factores de transcripción, como el receptor de estrógeno y miembros de las familia Ets, Sp3, MAZ y YY1 (German *et al.*, 2000), ya que es un gen de expresión constitutiva.

La enzima eNOS es una NADPH-oxidasa dependiente de calcio, el NO producido por esta isoforma regula el tono vascular mediante una vía de señalización dependiente de guanosin monofosfato cíclico (cGMP), además el NO tiene efectos independientes de cGMP dentro de la vasculatura, como es la inhibición de la adhesión leucocitaria (Wang *et al.*, 2000).

La eNOS es una proteína periférica de la membrana celular, que aunque no tiene alguna fracción hidrofóbica transmembranal, se encuentra localizada principalmente en microdominios especializados, denominados caveolas, que se caracterizan por la presencia de la proteína caveolina. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática (Karantzoulis-Fegaras *et al.*, 1999), que en algunos casos tiene presentes algunos receptores e inclusive proteínas G (Arnal *et al.*, 1999), la presencia de la eNOS en estos microdominios hace suponer que la enzima desempeña alguna interacción en la transducción de señales.

De las tres isoformas principales de las NOS, la eNOS es la única que está sujeta a N-miristoilación co-traducciona, y palmitoilación de cisteínas post-traducciona, ambos procesos son necesarios para la localización subcelular de la enzima en la periferia del aparato de Golgi (Sessa *et al.*, 1995) y en las caveolas (Fulton *et al.*, 1999), mientras la miristoilación del residuo de glicina en la posición 2 es irreversible, la palmitoilación de las cisteínas 16 y 26 (Hemmens y Mayer, 1997) es reversible. Probablemente la despalmiloilación contribuye a la disociación de la enzima de la caveola

(Arnal *et al.*, 1999). La eNOS localizada dentro de las caveolas de la membrana plasmática se encuentra unida a caveolina, de esta manera la enzima se encuentra inactiva, pero un incremento en el calcio intracelular ocasiona un aumento de calmodulina, la cual desplaza a la caveolina activándose así la eNOS (Kharbanda y Deanfield, 2001).

La fosforilación es un mecanismo importante como regulación post-traducciona en algunas proteínas, en el caso de la eNOS la fosforilación puede ocurrir en residuos de serina, treonina y tirosina. Algunos sitios potenciales de fosforilación en la eNOS son la serina 1117 (Ser¹¹¹⁷) que se encuentra en el dominio reductasa, y la treonina 495 (Thr⁴⁹⁵) dentro del dominio de unión a CaM, y la treonina se ha encontrado fosforilada en todas las eNOS de células endoteliales. Los cambios en la fosforilación de la Thr⁴⁹⁵ están asociados a estímulos que elevan el calcio endotelial y un aumento en la actividad de la eNOS entre 10 y 20 veces sobre el nivel basal (Fleming y Busse, 2003).

1.2 EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL ENDOTELIO

El endotelio es una capa de células que cubre la superficie de los vasos sanguíneos y está presente en todo el sistema circulatorio, actúa como una interfase entre los componentes de la sangre circulante a través de estos vasos y el tejido adyacente. Es una capa semipermeable que regula la función de las células mediante la liberación de moléculas localmente activas o la expresión de moléculas en la superficie del endotelio que actúan como receptores de moléculas complementarias de las células circulantes, regula el tono vascular, adhesión celular, coagulación inflamación y permeabilidad (Kharbanda y Deanfield, 2001). Es capaz de producir y reaccionar a varios mediadores activos, entre los que se encuentran las endotelinas, la angiotensina II, las prostaciclina y el óxido nítrico (Kharbanda y Deanfield, 2001), entre otros. Esos factores actúan de manera coordinada, permiten que la vasodilatación o vasoconstricción sean balanceadas localmente y regulan la resistencia de la capa vascular, manteniendo un nivel estable de perfusión del tejido, además tienen efecto sobre funciones endoteliales como la adhesión celular, trombosis y fibrinólisis.

Al ser un gas que difunde libremente (Huang, 1999) el NO derivado de endotelio tiene efecto dentro del lumen de los vasos y también en las células y tejido que rodean al músculo liso (Kharbanda y Deanfield, 2001). Al difundir hacia músculo liso el NO estimula la guanilato ciclasa soluble, que una vez activada produce cGMP. El cGMP reduce la cantidad de calcio intracelular dentro de las células, permitiendo el desplazamiento de las uniones actina-miosina, provocando la relajación del músculo liso (Kharbanda y Deanfield, 2001). El NO derivado de endotelio inhibe la adhesión leucocitaria a endotelio inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión, por lo que la alteración en la liberación de NO por el endotelio puede favorecer la adhesión de monocitos al endotelio, provocando acumulación e infiltración a la íntima, lo que ocasiona depósitos grasos. También inhibe la proliferación de células de músculo liso, mediante la inhibición de la síntesis de ADN (Dattilo y Makhoul, 1997).

1.3 POLIMORFISMOS EN EL GEN NOS3 Y SU ASOCIACIÓN CON PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

En la genética de poblaciones resulta importante el estudio sobre la presencia de cambios en la secuencia de ADN, sean éstos de un solo nucleótido o de un fragmento, ya sea por sustitución, delección, inserción o duplicación, ya que estos cambios pueden representar un factor genético de predisposición o padecimiento de alguna enfermedad. Algunos de éstos cambios pueden tener utilidad como marcadores genéticos debido a que la frecuencia con que se presentan dentro de una población puede ofrecernos datos importantes sobre el flujo genético al que se haya visto sujeta.

Los últimos adelantos en la investigación clínica molecular han permitido visualizar un panorama más completo con respecto a la etiología de las enfermedades. La medicina genómica nos demuestra reiteradamente cómo la mayoría de las patologías son de carácter multifactorial e incluyen un componente genético como factor determinante o de susceptibilidad. En este ámbito, es importante considerar la existencia de variantes polimórficas o polimorfismos en la secuencia genómica. Estos polimorfismos consisten en cambios de una o más bases que se presentan en >1% de la población.

Específicamente los polimorfismos de un sólo nucleótido o SNP ocurren en el genoma humano con una frecuencia de uno cada 1.9 Kb. El estudio de estas variantes en la secuencia codificante de las proteínas se inició en la década de 1980, principalmente en enzimas metabólicas (Knudsen *et al.*, 2001). Estos cambios en la secuencia de ADN contribuyen en las características individuales, la variación fenotípica, predisposición a alguna enfermedad y la respuesta al ambiente. Esta diversidad no se encuentra limitada al nivel de los polimorfismos individualmente, sino a combinaciones de estos (haplotipos), todo esto en conjunto es responsable de la variabilidad entre las diferentes poblaciones y es importante saber el efecto que éstos tienen sobre la variación de los rasgos fenotípicos (The International SNP Map Working Group, 2001).

La participación del óxido nítrico en la homeostasis de la presión sanguínea ha dado origen a numerosas investigaciones concernientes a la asociación de polimorfismos en alguno de los tres genes de las NOS o anomalías en su regulación celular con

problemas de hipertensión.

Como resultado de esos estudios se han identificado diversos polimorfismos dentro del promotor y la región codificadora del gen *NOS3* con potencial para alterar la expresión de la proteína eNOS o su función, entre los que se encuentran los localizados en la posición -786 en la región que flanquea el extremo 5' del gen, en el exón 7 (894 G/T), en el intrón 4 hay un VNTR (repetidos en tandem de longitud variable, por sus siglas en inglés), en el intrón 11 (30 A/G), el intrón 18 (27 A/C) y en el intrón 23 (10 G/T) (Hingorani *et al.*, 1999) (Fig. 2). Algunos de estos han sido asociados a cierta susceptibilidad a enfermedades pulmonares y cardiovasculares. La sustitución de T por C, en la posición -786 en la región 5' del gen *NOS3* fue asociada con espasmo coronario en una población japonesa (Nakayama *et al.*, 1999) y este mismo cambio fue relacionado con enfermedad de arteria coronaria, en población española (Álvarez *et al.*, 2001). Por otra parte el repetido de 27 pares de bases en el extremo 5' del intrón 4 fue relacionado con el riesgo de enfermedad coronaria en una población australiana (Cai *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996), también se demostró que es un factor de riesgo de aborto idiopático (Tempfer *et al.*, 2001). La sustitución de G por T en la posición 894 (Glu298Asp), que ocasiona el cambio de Glutamato a Aspartato en el codón 298, también fue asociada con un incremento en el riesgo de espasmo coronario, infarto al miocardio e hipertensión (Fairchild *et al.*, 2001; Hingorani *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1998; Jáchymová *et al.*, 2001). Shoji *et al.*, (2000) lo asocian con hipertensión en una población del norte de Japón y Novoradovsky *et al.*, (1999) encuentran que los polimorfismos C774T y G894T en este gen predisponen potencialmente a enfisema pulmonar a pacientes con deficiencia en α -antitripsina.

Se cree que los polimorfismos dentro de los exones del gen *NOS3* en pacientes con enfermedades coronarias o hipertensión pueden afectar la función de la eNOS (Tesauro *et al.*, 2000); tal como ocurre en la secuencia codificadora del gen *NOS3* con el cambio Glu298Asp. Este variante parece aumentar el rompimiento intracelular de la eNOS en condiciones de acidez debido a la creación de una unión lábil entre el Asp²⁹⁸ y la Pro²⁹⁹, particularmente en el extremo carboxilo terminal del Asp²⁹⁸ (Fairchild *et al.*, 2001), por lo que la sustitución de glutamato por aspartato podría afectar en la función catalítica de la eNOS (Fairchild *et al.*, 2001) y por lo tanto podría también influir en la sobrevivencia de los no portadores, ya que la selección natural actúa contra alelos deletéreos.

Hingorani *et al.*, (1999) observaron una proporción de 0.359 de homocigotos para la variante Asp298 en 298 pacientes con enfermedad en arteria coronaria en un estudio realizado en una población inglesa, lo cual resulta significativamente más alto que lo calculado a partir de los individuos control, en quienes se determinó una proporción de 0.102 de homocigosidad. Por otra parte, de 249 pacientes con enfermedad de infarto al miocardio 0.181 fueron homocigotos para Asp298, comparado con 0.087 de los controles sanos. Estos resultados muestran una fuerte asociación entre el alelo Asp298 de la enzima eNOS y el riesgo de enfermedad de arteria coronaria, que se incrementa >4 veces. Mientras tanto, el riesgo de infarto al miocardio para los homocigotos Asp298 con respecto a los homocigotos Glu298 se incrementa 2.5 veces. Por otra parte, en el estudio de una población japonesa (Yoshimura *et al.*, 1998) se encontraron resultados semejantes en cuanto a la asociación de la variante Asp298 con la manifestación de enfermedades cardíacas. De esta manera, existe una evidente asociación entre la presencia del alelo Asp298 y el desarrollo de enfermedades cardíacas, si bien no como única causa primaria, sí como un factor de predisposición. Cabe resaltar que aún en poblaciones sanas (sin enfermedades cardíacas) la frecuencia del alelo Asp298 difiere significativamente de acuerdo al origen étnico (Tabla 2). Mientras que los japoneses (4.5% y 8%), coreanos (11%) y chinos (5%) expresan la variante alélica Asp298 en baja frecuencia (Yoshimura *et al.*, 1998; Shoji *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002), las poblaciones inglesa australiana e italiana presentan una frecuencia del 31% 33% y 32% respectivamente (Hingorani *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2002). Debido a estas evidencias, queda claro que es sumamente importante el estudio de este polimorfismo en más poblaciones tanto de manera abierta, así como en grupos seleccionados con alguna patología cardiovascular.

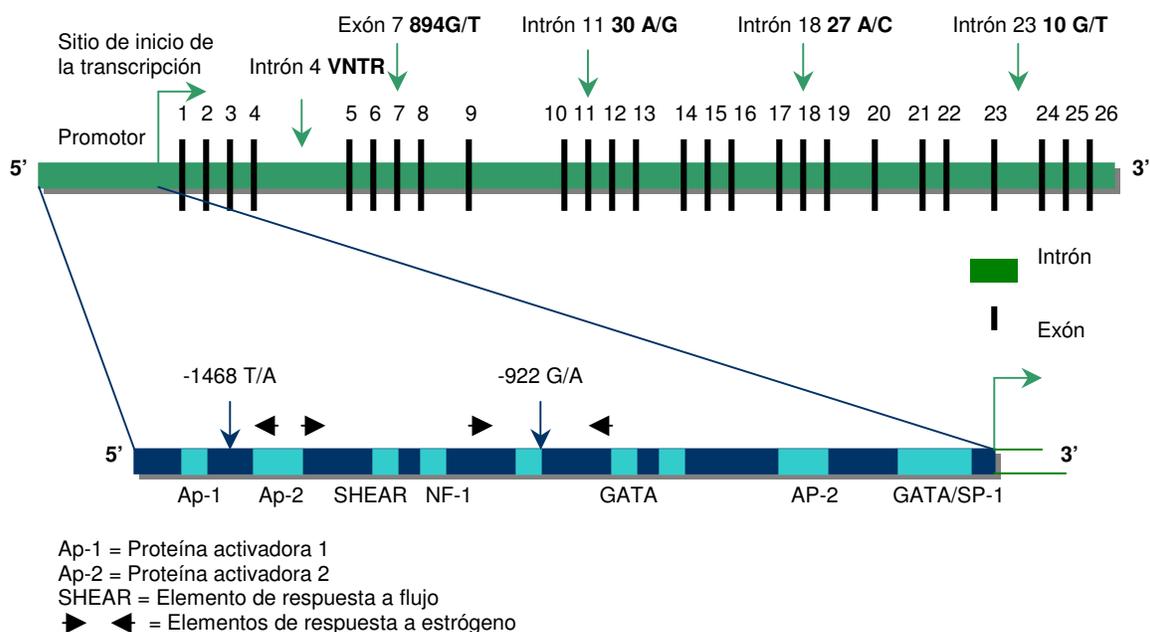


Figura 2. Estructura y polimorfismos del gen NOS3 humano. En la figura se muestra la posición del polimorfismo Glu298Asp en el exón 7 del gen NOS3.

Tabla 2. Frecuencias alélicas del polimorfismo Glu298Asp del gen NOS3 en diversas poblaciones sanas, en el mundo

Población	N	Glu298	Asp298	Referencia
Caucásicos Inglaterra	138	0.69	0.31	Hingorani <i>et al.</i> , 1999
Caucásicos Australia	763	0.67	0.33	Cai <i>et al.</i> , 1999
Italia	114	0.68	0.32	Colombo <i>et al.</i> , 2002
Japón	100	0.96	0.04	Yoshimura <i>et al.</i> , 1998
Japón –Norte-	203	0.92	0.08	Shoji <i>et al.</i> , 2000
Corea	411	0.89	0.11	Moon <i>et al.</i> , 2002
China	108	0.95	0.05	Wei <i>et al.</i> , 2002

2. JUSTIFICACIÓN

La participación del NO en la regulación de la homeostasis vascular hace que los cambios presentes en el gen *NOS3* puedan representar un factor de riesgo hacia el padecimiento de enfermedades cardiovasculares. El padecimiento de enfermedades cardiovasculares en nuestro país representa la primer causa de muerte a nivel nacional (INEGI, 2001). Bajo estas circunstancias, el estudio de los polimorfismos presentes en la secuencia de esta enzima se ha convertido en una activa área de estudio, sin embargo a la fecha no se han desarrollado estudios de este tipo en nuestro país. La mayoría de los estudios realizados en otras partes del mundo se han realizado en zonas urbanas, seguramente debido a la accesibilidad hacia los sujetos de investigación, por lo que son pocos los estudios que se han realizado en poblaciones que se encuentran sujetas a menor mestizaje, como lo son las poblaciones indígenas. En nuestro país las poblaciones indígenas representan aproximadamente 8% del total de la población (Manrique, 1994).

Por otra parte, las teorías sobre la colonización del continente americano por poblaciones procedentes del continente asiático podrían relacionarse con la distribución de los alelos del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS, por lo que resulta importante realizar la caracterización de la frecuencia de estos alelos en las poblaciones mestiza e indígenas mexicanas.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Iniciar la determinación de la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico en población mestiza y algunas poblaciones indígenas mexicanas.

Objetivos particulares:

- Analizar la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico en las poblaciones indígenas mexicanas de Mayos, Mixes y Huastecos.
- Analizar la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico en la población mestiza del centro.
- Comparar la frecuencia del polimorfismo entre las poblaciones indígenas y la población mestiza.
- Contrastar los resultados de las poblaciones mexicanas con los reportados en las poblaciones asiáticas y caucásicas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se estudiaron un total de 294 individuos sanos, de cuatro poblaciones mexicanas distribuidos de la siguiente manera: 126 Mestizos, 65 Huastecos, 26 Mayas y 77 Mayos. Se les realizó una encuesta sobre su lugar de nacimiento, así como de sus dos generaciones inmediatamente anteriores. La población Huasteca es originaria de San Luis Potosí, en el centro de México, la población Maya corresponde al estado de Oaxaca, en el suroeste de la República Mexicana, mientras que la población de Mayos reside en el estado de Chihuahua, en el norte del país (Fig.3).

Todas las muestras de ADN correspondientes a las poblaciones indígenas fueron proporcionadas por el Dr. Vargas Alarcón, del Departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Las muestras de ADN de la población mestiza fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI. Cada individuo participante firmó la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

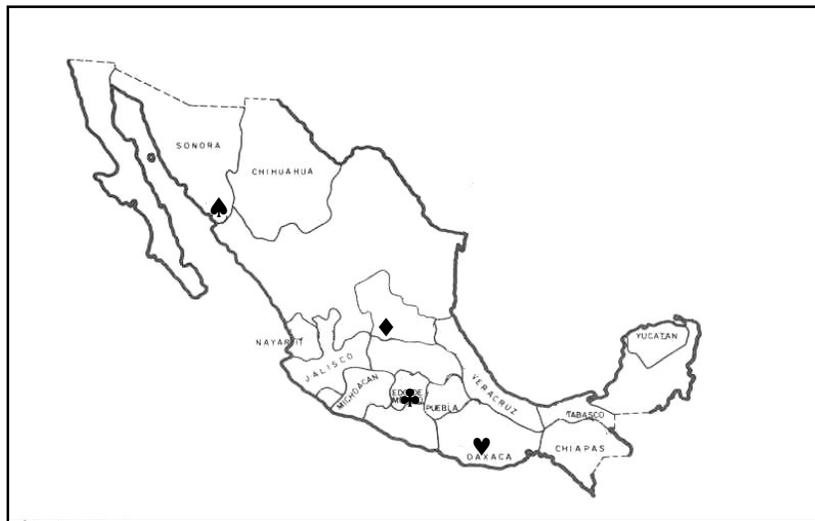


Figura 3. Localización geográfica de las poblaciones indígenas.
Huastecos Teenek ♦, Mayas Mixes ♥, Mayos Capomos ♠ y población Mestiza ♣.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de las muestras de sangre periférica se realizó la extracción de ADN de leucocitos, mediante el método de sales hipertónicas, el cual se describe brevemente a continuación:

La muestra de sangre periférica se centrifugó a 3,500 rpm por 10 minutos, la interfase de leucocitos se separó por aspiración y se colocó en tubos de ensayo limpios, los eritrocitos que aún estaban en la muestra se sometieron a lisis mediante la solución RCLB (del inglés: Red Cell Lysis Buffer; TRIS 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 5 mM y NaCl 10 mM). La pastilla de leucocitos se resuspendió en 60 µl de NaCl 5 mM y se trasvasó a un tubo de 1.5 ml, se añadió además 30.65 µl de SDS al 10% para lisar las células y se agitó vigorosamente con la pipeta, dejándose incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 205.3 µl de NaCl saturado, mezclando mediante pipeteo nuevamente y se incubó por 5 minutos más, a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó por 15 minutos a 15000 rpm, recuperando el sobrenadante y colocándolo en un tubo nuevo de 1.5 ml, se mezcló con 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. Sin centrifugar se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado 3 o 4 veces con etanol al 75% hasta que se liberó de sales, por último se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua estéril.

Para determinar la concentración y pureza del ADN genómico obtenido, se analizaron las muestras por espectrofotometría a 260 nm y 280 nm, la absorbancia a 260 nm multiplicado por la dilución (1/50) y la constante de 1 densidad óptica = 50 ng de ADN (Sambrook *et al.*, 1989) es igual a la concentración de cada muestra, en tanto la relación 260/280 indica la pureza de la muestra, la cual es óptima entre 1.8 y 2.0. Posteriormente una alícuota de cada muestra se corrió en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para observar la integridad del ADN.

4.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

A partir de las muestras de ADN se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el exón 7 del gen *NOS3*, en el cual se encuentra el polimorfismo Glu298Asp, con los *primers*, **5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3'** (de la cadena sentido) y **5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC- 3'** (para la cadena antisentido) (Hingorani *et al.*, 1999), en una reacción bajo las siguientes condiciones:

200 ng de ADN genómico
1.5 U de Taq polimerasa
10 pmol de cada primer
0.2 mM de dinucleótidos trifosfatados (dNTP's)
3 mM de Cloruro de magnesio
50 mM de Cloruro de potasio
20mM de Tris-HCl (pH 8.4)
agua destilada a un volumen final de 25 μ l

Las condiciones de PCR (30 ciclos) fueron:

Desnaturalización inicial	5 min. a 94°C	} 30 ciclos
Desnaturalización	30 seg. a 94°C	
Alineamiento	30 seg. a 60°C	
Extensión	30 seg. a 70°C	

Se analizó una alícuota de los productos de PCR de 206 pares de bases (pb) obtenidos mediante esta reacción en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y digitalizados mediante el programa Digital Imaging System IS1000.

4.5 ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN POR ENDONUCLEASAS

La sustitución de G → T en la posición 894 (Glu298Asp) ocasiona un cambio en el sitio de reconocimiento para enzimas de restricción (Fig. 4A), por lo que se realizó un ensayo de restricción con una alícuota (10µl) del producto de PCR de 206 pb con las enzimas *BanII* y *MboI*. La enzima *BanII* reconoce el alelo silvestre (G en la posición 894), mientras que *MboI* reconoce el alelo mutante (T en la posición 894), de esta manera se obtienen fragmentos de 124 y 82 pares de bases y 119 y 87 pares de bases, respectivamente (Fig. 4B), mismos que se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, teñido con bromuro de etidio.

<i>BanII</i>	<i>MboI</i>
10 µl de producto de PCR	10 µl de producto de PCR
4 U de <i>BanII</i> (New England Biolabs)	4 U de <i>MboI</i> (New England Biolabs)
1x Buffer 4 (New England Biolabs)	1x Buffer 3 (New England Biolabs)
50 mM Acetato de potasio	100 mM NaCl
20 mM Tris Acetato	50 mM Tris HCl
10 mM Acetato de magnesio	10 mM MgCl ₂
1 mM DTT	1 mM DTT
pH 7.9	pH 7.9
Agua a un volumen final de 25 µl	Agua a un volumen final de 25 µl

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de las 4 poblaciones se realizó la prueba de χ^2 (chi-cuadrada). Esta prueba permite saber si las frecuencias observadas difieren significativamente de las frecuencias esperadas a niveles de confianza mayores al 95% (Spiegel, 1987).

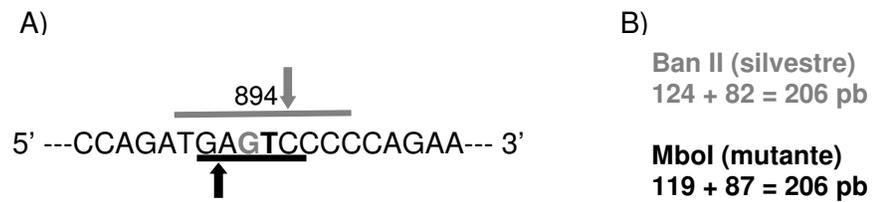


Figura 4. A) Sitios de reconocimiento y corte de las enzimas *BanII* y *Mbol*.
B) Tamaño de los fragmentos generados a partir de la restricción con ambas enzimas.

6. RESULTADOS

Se analizó la frecuencia de los alelos del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS a partir de muestras de ADN de las siguientes poblaciones: 65 individuos de población Huasteca, 77 individuos de la población de Mayos, 26 individuos de la población de Mayas, así como de 126 individuos de la población mestiza mexicana. A partir de estas muestras de ADN se amplificó un fragmento correspondiente al exón 7 del gen *NOS3*, generando un producto de PCR de 206 pb (Fig. 5). En la figura 6 se observa el patrón de restricción de los productos obtenidos de la PCR, digeridos con las enzimas *BanII* y *MboI*, que reconocen G en la posición 894 (Glu298) y T en la posición 894 (Asp298) respectivamente.

La distribución genotípica del codón 298 del gen *NOS3* fue de 0.770 para Glu/Glu, Glu/Asp 0.230 y 0.0 para Asp/Asp en la población Huasteca, con frecuencia alélica de 88.5% para Glu y 13.5% de Asp, en la población de Mayos los resultados muestran una distribución de 0.831 de homocigotos para Glu298, 0.169 para heterocigotos y 0.0 para homocigotos Asp298, y las alélicas de la manera siguiente 91.5% para el alelo Glu y 8.5% para el alelo Asp. La distribución en la población Maya fue de 0.8846 para Glu/Glu, Glu/Asp 0.1154 y 0 para Asp/Asp, mientras que los alelos mostraron una frecuencia de 94.2% para el alelo Glu y 5.8% para el alelo Asp. En tanto, en la población mestiza se observó una distribución genotípica de 0.746 para Glu/Glu, 0.238 para Glu/Asp y 0.016 para Asp/Asp. La frecuencia alélica fue de 86.5% para Glu y 13.5% para Asp (Tabla 3).

La distribución de los genotipos no difiere significativamente (1.07 vs. $\chi^2=5.99$; 2 gl $p<0.05$) entre las poblaciones de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada (Tablas 5, 6, 7 y 8; Anexo 2). Respecto a las frecuencias alélicas las poblaciones tampoco difieren significativamente (0.29 vs. $\chi^2=5.99$; 2 gl $p<0.05$). Las frecuencias observadas y esperadas se encontraron en equilibrio de acuerdo a la ley de Hardy-Wienberg, en las 4 poblaciones analizadas.

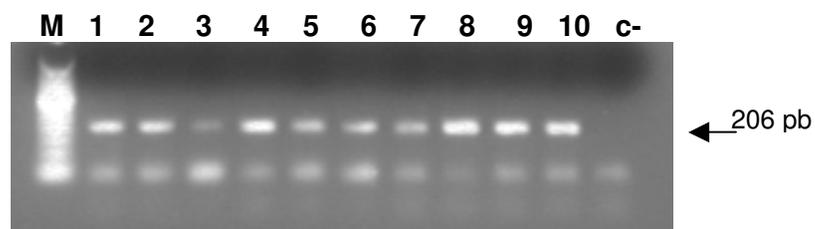


Figura 5. Electroforesis representativa de los productos de PCR en gel de agarosa (2%). M. marcador de peso molecular de 50 pb. 1-10 Amplificación del exón 7 del gen NOS3, con un tamaño de 206 pb. C- control negativo sin ADN.

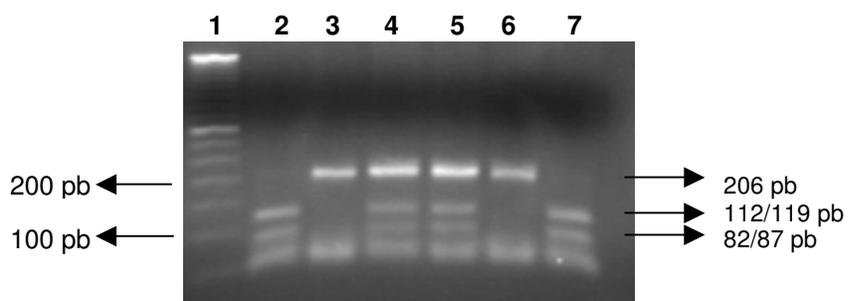


Figura 6. Determinación genotípica del polimorfismo Glu298Asp. Carril 1: marcador de peso molecular de 50 pb; carriles 2, 4, y 6 digestión con *Ban*II; carriles 3, 5 y 7 digestión con *Mbo*I. los carriles 2 y 3 corresponden a un individuo homocigoto para el alelo Glu298, los carriles 4 y 5 a los de un individuo heterocigoto y los carriles 6 y 7 corresponden a un individuo homocigoto para el alelo Asp298.

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Glu298Asp del gen NOS3

	<u>Glu/Glu</u>	<u>Glu/Asp</u>	<u>Asp/Asp</u>	<u>Total</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Total</u>
Huastecos	50 (77.00%)	15 (23.00%)	0 (0.0%)	65	115 (88.50%)	15 (11.50%)	130
Mayos	64 (83.10%)	13 (16.90%)	0 (0.0%)	77	141 (91.50%)	13 (8.50%)	154
Mestizos	94 (74.60%)	30 (23.80%)	2 (1.60%)	126	218 (86.50%)	34 (13.50%)	252
Mayas	23 (88.46%)	3 (11.54%)	0 (0.0%)	26	49 (94.23%)	3 (5.77%)	52

Tabla 4. Frecuencias alélicas del polimorfismo Glu298Asp en diferentes poblaciones

Población	N	Glu298	Asp298	Referencia
Mestizos (México)	126	0.86	0.14	Presente estudio
Huastecos (México)	65	0.88	0.12	Presente estudio
Mayas (México)	26	0.94	0.06	Presente estudio
Mayos (México)	77	0.92	0.08	Presente estudio
Caucásicos (Inglaterra)	138	0.69 ^a	0.31 ^b	Hingorani, <i>et al.</i> 1999
Caucásicos (Australia)	763	0.67 ^a	0.33 ^b	Cai, <i>et al.</i> 1999
Asiáticos (Japón)	100	0.96 ^c	0.04 ^d	Yoshimura et al. 1998

- Frecuencia baja, comparada con las frecuencias de las poblaciones Mestiza, Huasteca, Maya, Mayo y Asiática ($p < 0.05$).
- Frecuencia alta, comparada con las frecuencias de las poblaciones Mestiza, Huasteca, Maya, Mayo y Asiática ($p < 0.05$).
- Frecuencia alta, comparada con las frecuencias de las poblaciones Mestiza, Huasteca, y Caucásicos (Inglaterra y Australia) ($p < 0.05$).
- Frecuencia baja, comparada con las frecuencias de las poblaciones Mestiza, Huasteca, y Caucásicos (Inglaterra y Australia) ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la frecuencia de los alelos del polimorfismo Glu298Asp en diferentes poblaciones mexicanas sanas, asumiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio. Los resultados observados en las poblaciones estudiadas: Huasteca, Maya, Mayo y Mestiza no muestran diferencias significativas entre sí en la distribución genotípica y las frecuencias alélicas del polimorfismo Glu298Asp. Estos resultados indican que posiblemente el mestizaje no influye sobre la frecuencia con que los alelos se presentan. La variante alélica Asp298 se presenta con baja frecuencia en las cuatro poblaciones, lo que sustenta la ausencia de homocigotos Asp/Asp en las muestras de las poblaciones indígenas estudiadas.

En relación con trabajos en que se han reportado estudios similares en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas y la distribución genotípica que se reportan en este estudio tanto en población mestiza como en las poblaciones indígenas son semejantes a lo observado en las poblaciones asiáticas sanas, japonesas, coreana y china (Yoshimura *et al.*, 1998; Shoji *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002), donde la frecuencia alélica que se reporta para Asp298 es de 4%, 8%, 11% y 5% respectivamente y que difieren de los presentados en los estudios realizados en poblaciones caucásicas sanas, inglesa, australiana e italiana, ya que la frecuencia del polimorfismo en personas sanas, se presenta con una frecuencia de 31%, 33% y 32% (Tabla 4) (Hingorani *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 1999; Colombo *et al.*, 2002).

El hecho de que los resultados obtenidos a partir de las poblaciones analizadas en este estudio sean semejantes a los observados en poblaciones asiáticas pone de manifiesto la influencia asiática en los orígenes étnicos de las poblaciones mexicanas, no obstante al mestizaje al que se hayan visto sujetas (Cavalli-Sforza, 1997). Esto al parecer ocurre en la población mestiza, ya que sólo en esta población se encontraron homocigotos para el alelo Asp298. Sin embargo esto puede ser confirmado a través del estudio de otras poblaciones en nuestro país y así observar el comportamiento de la frecuencia de los alelos.

En los estudios realizados en diversas poblaciones se ha encontrado asociación de este polimorfismo con el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, tanto en la población japonesa (Yoshimura *et al.*, 1998;) como en una población inglesa (Hingorani *et*

al., 1999), en las cuales los grupos de pacientes muestran un incremento en las frecuencias alélicas así como en la distribución genotípica, con respecto a los grupos control (personas sanas) en cada población, por lo que además de la presencia del alelo Asp298 la respuesta de las poblaciones depende de otros factores además de la variante en sí.

Los resultados que aquí se presentan aportan información importante sobre la distribución del polimorfismo Glu298Asp del gen *NOS3* en las cuatro poblaciones estudiadas, estos resultados pueden ser útiles para el diseño de investigaciones futuras encaminadas a determinar la asociación de este polimorfismo con enfermedades cardiovasculares en las poblaciones de nuestro país o como referencia de otros estudios en diferentes poblaciones.

8. CONCLUSIONES

Los resultados sobre el análisis de la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp son semejantes en las 3 poblaciones indígenas y éstas a su vez no muestran diferencias significativas con respecto a lo encontrado en la población mestiza. Las frecuencias observadas en las poblaciones indígenas muestran homología con los resultados obtenidos en poblaciones asiáticas, no así con poblaciones caucásicas, lo que pone de manifiesto el origen asiático de los pueblos indígenas americanos.

9. ANEXO

9.1; Consentimiento informado.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente acepto participar en el estudio científico denominado *“Análisis de la frecuencia del polimorfismo Glu298Asp de la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico en poblaciones indígenas y mestiza mexicanas”*, cuya responsable es la Dra. Haydeé Rosas Vargas.

El estudio que se me propone es únicamente científico y sin otro interés, los resultados servirán para obtener conocimiento sobre este polimorfismo.

Acepto donar una muestra de sangre (5 –10 ml) con la cual se realizará el estudio científico, sabiendo que no se mencionara mi nombre en las publicaciones o presentaciones que se hagan de la investigación.

México D.F. a ____ de _____ de _____

Nombre del donante: _____ . Firma: _____ .

Nombre del testigo : _____ . Firma: _____ .

Nombre del testigo : _____ . Firma: _____ .

9.2 Tablas de Frecuencias Alelicas y Genotípicas y Pruebas de Chi-Cuadrada

Tabla 5. Prueba de chi-cuadrada de las frecuencias genotípicas observadas en la población Huasteca Teenek

Genotipo	Observados(O)	Calculados(C)	O – C	$(O - C)^2/c$
GG	50	50.8625	-0.8645	0.0146
GA	15	13.273	1.727	0.2247
AA	0	0.8645	-0.8645	0.8645
	65		0	1.1038

$X^2=3.84$ 2gl $p<0.05$

Tabla 6. Prueba de chi-cuadrada de las frecuencias genotípicas observadas en la población de Mayos Capomos

Genotipo	Observados(C)	Calculados(O)	O – C	$(O - C)^2/c$
GG	64	64.5491	-0.5491	0.0047
GA	13	11.9042	1.0958	0.1009
AA	0	0.5467	-0.5467	0.5467
	77		0	1.1038

$X^2=3.84$ 2gl $p<0.05$

Tabla 7. Prueba de chi-cuadrada de las frecuencias genotípicas observadas en la población Mixe

Genotipo	Observados(O)	Calculados(C)	O - C	$(O - C)^2/c$
GG	23	23.088	-0.088	0.0003
GA	3	2.8262	0.1738	0.0107
AA	0	0.0858	-0.0858	0.00858
	126		0	0.0958

$X^2=3.84$ 2gl $p<0.05$

Tabla 8. Prueba de chi-cuadrada de las frecuencias genotípicas observadas en la población Mestiza

Genotipo	Observados(O)	Calculados(C)	O - C	$(O - C)^2/c$
GG	94	94.2795	-0.2795	0.0008286
GA	30	29.421	0.579	0.0113946
AA	2	2.2995	-0.2995	0.0390085
	126		0	0.0512317

$X^2=3.84$ 2gl $p<0.05$

9. ANEXO

9.3; Publicación.



Brief Communications

Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphism in the Indian and Mestizo Populations of Mexico

HAYDEÉ ROSAS-VARGAS,^{1*} ADRIÁN FLORES-SEGURA,^{1*} BORIS GUIZADA-CLAURE,¹ GILBERTO VARGAS-ALARCÓN,² JULIO GRANADOS,³ FABIO SALAMANCA,¹ AND RAMÓN CORAL-VÁZQUEZ^{1*}

Abstract Endothelium-derived nitric oxide (NO) is an important factor in vasodilation synthesized by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). A polymorphism (894 G to T) in exon 7 of the *eNOS* gene causes the conversion of Glu to Asp in position 298. The Glu298Asp polymorphism has been extensively associated with cardiovascular disease. We determined the Glu298Asp polymorphism frequency in healthy Mexican Mestizo, Huastec, Mayo, and Mayan populations by the endonuclease restriction method. The four populations analyzed were in Hardy-Weinberg equilibrium. Allele frequencies were similar among Mexican populations but different when compared with Caucasians. However, when compared with allele frequencies in Asian populations, Mestizo and Huastec allele frequencies were significantly different. Genotypically, only the Mestizos presented Asp298 homozygosity. The absence of double mutants in Indian populations resembles that in Asians. With these data, we conclude that the low frequency of the *eNOS* Glu298Asp polymorphism in Indian and Mestizo populations of Mexico is related to the Asian origin of Amerindian groups.

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous molecule that functions as a mediator for a number of biological functions (Moncada et al. 1991). NO is generated from the conversion of L-arginine into L-citrulline by nitric oxide synthases (NOS). NOS constitute a family of at least three major isoforms: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), and inducible NOS (iNOS) (Alderton et al. 2001). In endothelium, NO is synthesized by the isoform eNOS coded by a 26-exon gene lo-

¹Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F., México.

²Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F., México.

³Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F., México.

*Equal contribution made by both authors.

*Corresponding author.

Human Biology, February 2003, v. 75, no. 1, pp. 91–96.

Copyright © 2003 Wayne State University Press, Detroit, Michigan 48201-1309

KEY WORDS: NOS POLYMORPHISM, LATIN AMERICA, CARDIOVASCULAR DISEASE, GENETICS

92 / ROSAS-VARGAS ET AL.

cated on chromosome 7q35-36 (Marsden et al. 1993). The main role of endothelium-derived NO (eNO) is the regulation of vascular tone; nevertheless, eNO also displays other functions such as the suppression of smooth muscle cell proliferation, platelet aggregation, and modulation of leukocyte activation and adhesion (Nathan and Xie 1994). It is not surprising that genetic polymorphisms within the *eNOS* gene are associated with cardiovascular diseases as susceptibility factors. Particularly, the polymorphism 894 G/T located in exon 7 has been associated with endothelial dysfunction in coronary artery disease (Yoshimura et al. 1998; Hingorani et al. 1999; Liao et al. 1999), essential hypertension (Shoji et al. 2000; Jachymova et al. 2001), and myocardial infarction (Shimasaki et al. 1998). The presence of the variant 894 G/T causes the replacement of an Asp residue instead of Glu at position 298 of the mature protein (Glu298Asp). This substitution potentially promotes the cleavage of the enzyme at this site, decreasing eNOS function (Tesauro et al. 2000; Fairchild et al. 2001). Previous population studies have shown differences in genotype and allele frequencies; while the Japanese population lacks Asp298 homozygotes (Yoshimura et al. 1998), the frequency for the English population is 10.2% (Hingorani et al. 1999). In order to prove this relationship, it is important to know the distribution of these alleles in different populations. In the present study, we analyzed the allele and genotype frequencies of the Glu298Asp polymorphism in a Mexican Mestizo and three Mexican Indian populations.

Materials and Methods

A total of 294 healthy individuals from four different Mexican regional groups was studied, distributed as 126 Mestizos, 65 Huastecs, 26 Mayan, and 77 Mayos. In all cases the individuals, their parents, and their grandparents were born in the same town and speak their Amerindian language, except for the Mestizo group, which speaks Spanish. The definition of "Mexican Mestizo" was considered as in Gamboa et al. (2000). The Huastec population studied belongs to the Teenek ethnic group from the state of San Luis Potosí in central Mexico; the Mayan Mixe population inhabits the state of Oaxaca in southeastern Mexico; and the Mayo Capomos reside in the state of Chihuahua in northern Mexico.

A sample of peripheral blood was obtained from all individuals, and genomic DNA was purified by standard methods. The genotyping of the *eNOS* Glu298Asp polymorphism of each individual was determined by polymerase chain reaction (PCR) followed by enzyme restriction. The sequence of the flanking intronic primers used for the amplification of exon 7 was 5'-CATGAG-GCTCAGCCCCAGAAC-3' (sense) and 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGGTCA C-3' (antisense) (Hingorani et al. 1999). PCR assays were realized in the presence of 200 ng genomic DNA, 10 pmol each primer, 0.2 mM deoxynucleotide triphosphates, 3 mM magnesium chloride, 50 mM potassium chloride, 20 mM TRIS-hydrochloric acid (pH 8.4), and autoclaved distilled water to 25 μ L. The thermocy-

Endothelial NOS Polymorphism in Mexico 193

cling procedure consisted of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec, repeated for 30 cycles. The PCR product was divided in equal parts for endonuclease digestion with enzymes *Ban*II and *Mbo*I, respectively, during 16 hours at 37°C. The 206-base-pair (bp) PCR product is cleaved into 124-bp and 82-bp fragments with *Ban*II in the presence of a G at nucleotide 894 (which corresponds to Glu298 allele), but not in its absence. As complement, *Mbo*I generates 119-bp and 87-bp fragments in the presence of a T at nucleotide 894 (which corresponds to Asp298 allele), but not in its absence. Restriction products were resolved by electrophoresis on a 2.5% agarose gel stained with ethidium bromide.

Results and Discussion

The frequency of the *eNOS* Glu298Asp polymorphism was evaluated in different healthy Indian and Mestizo Mexican populations. Figure 1 shows a representative agarose gel loaded with three PCR products after digestion with *Ban*II and *Mbo*I, respectively. Distribution of allelic and genotype frequencies is shown in Table 1. The observed and expected frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium in all populations. Glu298 frequency was 0.865, 0.885, 0.942, and 0.920 for Mestizo, Huastec, Mayan, and Mayo, respectively; Asp298 frequency was 0.135, 0.115, 0.058, and 0.08, in the same order. Glu/Glu and Glu/Asp genotypes were detected in all populations; however, Asp/Asp genotype was present only in the Mestizo group with a frequency of 0.160. Glu/Glu frequencies were 0.746, 0.885, and 0.831 for Mestizo, Huastec, Mayan, and Mayo populations, respectively; Glu/Asp frequencies were 0.238, 0.231, 0.115, and 0.169, in the same order.

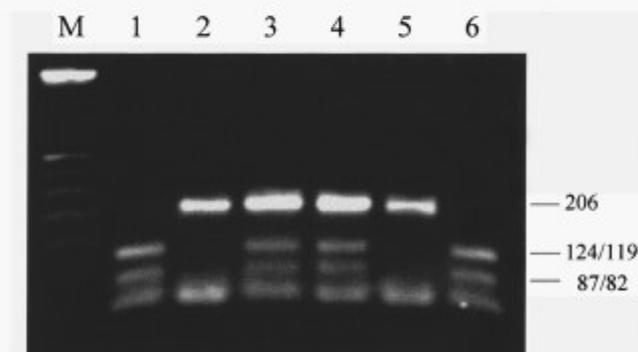


Figure 1. Genotypic determination of the polymorphism at codon 298 of the *eNOS* gene. Agarose electrophoresis of PCR products after endonuclease restriction with enzymes *Ban*II (lanes 1, 3, 5) and *Mbo*I (lanes 2, 4, 6). Lanes 1-2, Glu/Glu homozygote, lanes 3-4, Glu/Asp heterozygote, lanes 5-6, Asp/Asp homozygote. M, 50-bp ladder. DNA fragment sizes, in base pairs, are indicated by numbers on the right.

Table 1. Genotype and Allele Frequencies of the Glu298Asp Polymorphism in the Huastec, Mayan, Mayo and Mexican Mestizo Populations

Population	Glu/Glu	Glu/Asp	Asp/Asp	Total	Glu	Asp	Total
Mestizo	94 (74.6)	30 (23.8)	2 (1.6)	126	218 (86.5)	34 (13.5)	252
Huastec	50 (76.9)	15 (23.1)	0 (0.0)	65	115 (88.5)	15 (11.5)	130
Mayan	23 (88.5)	3 (11.5)	0 (0.0)	26	49 (94.2)	3 (5.8)	52
Mayo	64 (83.1)	13 (16.9)	0 (0.0)	77	141 (92.0)	13 (8.0)	154

Table 2. Allele frequencies of the eNOS Glu298Asp Polymorphism in Various Populations

Population	n	Glu298	Asp298	Reference
Mestizos (Mexico)	126	0.86	0.14	Present study
Huastecs (Mexico)	65	0.88	0.12	Present study
Mayan (Mexico)	26	0.94	0.06	Present study
Mayos (Mexico)	77	0.92	0.08	Present study
Caucasians (England)	138	0.69 ^a	0.31 ^b	Hingorani et al. 1999
Caucasians (Australia)	763	0.67 ^a	0.33 ^b	Cai et al. 1999
Asians (Japan)	100	0.96 ^c	0.04 ^d	Yoshimura et al. 1998

Note: The distributions of allele frequencies obtained in our populations (Indian and Mexican Mestizos) were compared to those previously described in other populations (Caucasian and Asians) using the chi-square test.

- a. Decreased frequency when compared to Mestizo, Huastec, Mayan, Mayo, and Asian populations ($p < 0.05$).
- b. Increased frequency when compared to Mestizo, Huastec, Mayan, Mayo, and Asian populations ($p < 0.05$).
- c. Increased frequency when compared to Mestizo, Huastec, and Caucasian (English and Australian) populations ($p < 0.05$).
- d. Decreased frequency when compared to Mestizo, Huastec, and Caucasian (English and Australian) populations ($p < 0.05$).

As shown in Table 2, allele frequencies are not different among Mexican populations, but some differences are detected when compared to those reported in other populations. Statistical analysis showed a decreased frequency of allele Asp298 in all Indian and Mestizo Mexican populations when compared to English Caucasians ($p < 0.05$). On the other hand, allele Asp298 showed an increased frequency in Mestizos and Huastecs when compared to Asians ($p < 0.05$); interestingly, this difference is not extensive in Maya and Mayo populations. Thus, the frequency distributions for Mexican Mestizos seems to be the result of the genetic admixture between Indian and Caucasian genes (Lisker et al. 1990).

Endothelial NOS Polymorphism in Mexico 195

Meanwhile, Mayo and Mayan allelic distributions resemble those of the Japanese population, and seem to be related to the ancient Asian origin of their ancestors (Cavalli-Sforza et al. 1994). In the case of Huastecs, there seems to be some incipient admixture despite the previous evaluation of parental origin (Vargas-Alarcón, unpublished data).

In several populations the Glu298Asp polymorphism has been associated with the risk of cardiovascular disease (Shimasaki et al. 1998; Yoshimura et al. 1998; Cai et al. 1999; Hingorani et al. 1999). The results of the present work contribute to knowledge of the allele distribution of the *eNOS* Glu298Asp polymorphism in the Mexican population, which is important in establishing the relationship between this polymorphism and genetic susceptibility to developing cardiovascular disease. Further studies directed at correlating the *eNOS* Glu298Asp polymorphism with diverse cardiovascular diseases in a large number of individuals would be helpful to elucidate the true clinical implications of this polymorphism in the Mexican population.

Received 13 December 2001; revision received 30 August 2002.

Literature Cited

- Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357:593–615.
- Cai, H., D.E.L. Wilcken, and X.L. Wang. 1999. The Glu298Asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J. Molec. Med.* 77:511–514.
- Cavalli-Sforza, L. 1997. Genes, peoples, and languages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7719–7724.
- Fairchild, T.A., D. Fulton, J.T. Fontana et al. 2001. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp variant of human endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 276:26674–26679.
- Gamboa, R., G. Hernández-Pacheco, R. Hesiquito. 2000. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum. Biol.* 62:975–981.
- Hingorani, A.D., C.F. Liang, J. Fatibene et al. 1999. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100:1515–1520.
- Jachymova, M., K. Horky, J. Bultas et al. 2001. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284:426–430.
- Liao, Y.L., K. Saku, J. Ou. 1999. A missense mutation of the nitric oxide synthase (eNOS) gene (Glu298Asp) in five patients with coronary artery disease: Case reports. *Angiology* 50:671–676.
- Lisker, R., E. Ramirez, R. Perez-Briceno et al. 1990. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.* 62:791–801.
- Marsden, P.A., H.H. Heng, S.W. Scherer et al. 1993. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268:17478–17488.
- Moncada, S., R.N.J. Palmer, and E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43:109–142.

96 / ROSAS-VARGAS ET AL.

- Nathan, C., and Q.W. Xi. 1994. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915–918.
- Shimasaki, Y., H. Yashue, M. Yoshimura et al. 1998. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31:1506–1510.
- Shoji, M., S. Tsutaya, R. Saito et al. 2000. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sciences* 66:2557–2562.
- Tesaro, M., W.C. Thompson, P. Rogliani et al. 2000. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2832–2835.
- Yoshimura, M., H. Yasue, M. Nakayama et al. 1998. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum. Genet.* 103:65–69.

10. REFERENCIAS

1. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **357**. 593- 615
2. Alvarez, R., González, P., Batalla, A., Reguero, J.R., Iglesias-Cubero, G., Hevia, S., Cortina, A., Merino, E., González, I., Coto, E. (2001). Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) genotypes and early coronary artery disease. *Nitric Oxide*. Vol. 5:4 343-348
3. Arnal J.-F., Dinh-Xuan, A.-T., Pueyo, M., Darbladea, B. and J. Rami. (1999) Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**. 1078–1087
4. Cai, H., Wilken, D., Wang, X. (1999) The Glu298Asp (894G→T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J. Molec. Med.* **77**:511-514
5. Cavalli-Sforza, L. 1997. Genes, peoples and languages. *PNAS*. **94**. 7719-7724
6. Colombo, M.G., Andreassi, M. G., Paradossi, U., Botto, N., Manfredi, S., Masett, S., Rossi, G., Clerico, A., Biagini, A. 2002. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298→Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart*. **87**:6 525-8
7. Dattilo, J.B., Makhoul, R.G. (1997) The Role of Nitric Oxide in Vascular Biology and Pathobiology. *Annals of Vascular Surgery*. Vol. 11, No. 3.
8. Fairchild, T., Fulton, D., Fontana, J., Gratton, J., McCabe, T. y Sessa, W. (2001). Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu298Asp-variant of human endothelial nitric oxide synthase. *J Biol. Chem.* **276**(28):26674-9
9. Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T.W., Kelly, R., y Michel, T. (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. *J Biol. Chem.* **271**(37): 22810-4
10. Fleming, I., Busse, R. (2003)Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**: R1–R12.
11. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C., Buerk, D., Huang, P. y Jain, R. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial grown factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *PNAS*. Vol 98. **5**: 2604 - 2609.

12. Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J.P., Lin, M., Li, K.X., Michell, B., Kemp, B.E., Rodman, D., Sessa, W.C. (2001) Localization of endothelial nitric oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane define the existence of two pools of active enzyme. *J. Biol. Chem.* 277(6):4277-84.
13. Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A. y Sessa, W. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399(6736):597-601.
14. German, Z., Chambliss, K.L., Pace, M.C., Arnet, U.A., Lowenstein, C.J. y Shaul, P.W. 2000. Molecular basis of cell-specific endothelial nitric oxide synthase expression in airway epithelium. *J. Biol. Chem.* 275(11):8183-8189.
15. Hemmens, B., Mayer, B. 1997. Enzimology of nitric oxide synthase. En: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 100. Nitric Oxide Protocols. Humana Press. New Jersey, USA.
16. Hingorani, A., Liang, C., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hooper, R., Stephens, N., O'Shaughnessy, K. y Brown M. 1999. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu²⁹⁸→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 100; 1515 -1520.
17. Huang, P.L. (1999) Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32:1353-1359.
18. INEGI. 2001. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social. 8:3 p 15. México
19. Jáchymová, M., Horký, K., Bultas, J., Kozich, V., Jindra, A., Peleska, J., Martásek P. (2001) Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 284. 426-430
20. Karantzoulis-Fegaras, F., Antoniou, H., Sheue-Lim M. L., Kulkarni, G., D'Abreo, C., Wong, G. K. T., Miller, T. L., Chan, Y., Atkins, J., Wang, Y. and Marsden, P. A. (1999) Characterization of the Human Endothelial Nitric-oxide Synthase Promoter. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 5, pp. 3076–3093.
21. Kharbanda, R.K., Deanfield, J.E. (2001) Functions of the healthy endothelium. *Coronary Artery Disease.* 12. 485-491.
22. Knudsen, L. E., Loft, S., y Autrup, H. 2001. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutation research.* 482:83-88.

23. Landmesser, U., Harrison, D. G. (2001) Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coronary Artery Disease*. 12. 455-461.
24. Loscalzo, J. (2000). The biological chemistry of nitric oxide. En: Contemporary Cardiology. Vol. 4. Nitric Oxide and the cardiovascular system. Humana Press. New Jersey, USA.
25. Lozano, J.J. y Vigata, J.L. (1989) Fundamentos de química general. Ed. Alambra. España.
26. Manrique, C.L. 1994. La población indígena mexicana. INEGI. p18. México.
27. Marsden, P.A., Heng, H.H.Q., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X., Tsui, C., Schappert, K.T. (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268:53 17478-17488.
28. Moon, J., Yoon, S., Kim, E., Shin, C., Ahn Jo, S., Jo, I. 2002. Lack of evidence for contribution of Glu298Asp (G894T) polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Thrombosis Research*. 107. 129 - 134
29. Nakayama, M. Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Kugiyama, K., Ogawa, H., Motoyama, T., Saito, Y., Ogawa, Y., Miyamoto, Y. y Nakao, K. (1999) T⁻⁷⁸⁶→C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 99:2864-2870
30. Novoradovsky, A., Brantly, M.L., Waclawiw, M.A., Chaudhary, P.P., Ihara, Qui, L., Elissa, N.T., Barnes, P.M., Gabriele, K.M., Ehrmantraut, M.E. Rogliani, P. and Moss, J. 1999. Endothelial nitric oxide synthase as a potential susceptibility gene in the pathogenesis of emphysema in α 1-antitripsin deficiency. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 20:441-447
31. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
32. Sessa, W., García-Cardena, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I., Desai, K. (1995) The golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270:30 17641-17644
33. Shoji, M., Tsutaya, S., Saito, R., Takamatu, H., Yasujima, M. (2002) Positive association of endothelial nitric oxide gene polymorphism with hypertension in Northern Japan. *Life Sciences*. 66:26 2557-2562

34. Snyder, S., Bredt, D.S. (1992) Funciones biológicas del óxido nítrico. *Investigación y Ciencia*. 12-20.
35. Spiegel, M.R. 1987. Estadística. 2ª ed. McGraw-Hill. México.
36. Tempfer, C., Unfried, G., Zeillinger, R., Hefler, L., Nagele, F., Hubar. J. (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Human Reproduction*. Vol. 16 N.8. 1644-1647
37. Tesauro, M., Thompson, W., Rogliani, P., Chaudhary, P. y Moss, J.(2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *PNAS*. Vol 97. **6**: 2832 – 2835.
38. The International SNP Map Working Group. (2001) A map of human genome sequence variation 1.42 million single nucleotide polymorphism. *Nature*, 409. 928-933.
39. Wang, W., Wang, S., Yan, L., Madara, P., Cintron, A., Wesley, R.A. y Danner, R.L. 2000. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric oxide synthase. *J.Biol.Chem*. 275(22):16899-16903.
40. Wang, X.L., Sim, A.S., Badenhop, R., McCredie, M., Wilcken, E.L. (1996) A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nature Medicine*. Vol. 2:1 41-45.
41. Wei, D., Shan, J., Chen, Z., Shi, Y. 2002. The G894T mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary atherosclerotic heart disease in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 19:6 471-4
42. Yoshimura, M., Yasue, H., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Sumida, H., Sugiyama, S., Kugiyama, K., Ogawa, H., Ogawa, Y., Saito, Y., Miyamoto, Y. and Nakao, K. (1998). A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with the coronary spasm in the Japanese. *Am J Hum Genet*. **103**:65-59.