

**INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL
ESTADO**

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**"DETERMINACION DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL
POLIMORFISMO *eNOS27* (GEN DE LA OXIDO NITRICO
SINTETASA) EN UNA MUESTRA DE POBLACION MESTIZA
MEXICANA"**

**TESIS DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

MÉDICO ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

DRA. MARCELA FRAGOSO BENÍTEZ

México, D.F. 2009. Registro No. 034.2009



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.

**“DETERMINACION DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL
POLIMORFISMO eNOS27 (GEN DE LA OXIDO NITRICO
SINTETASA) EN POBLACION MESTIZA MEXICANA”**

Registro #034.2009

**Dr. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**

**Dra. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
PROFESOR TITULAR DE LA ESPECIALIDAD EN GENÉTICA
MÉDICA**

**Dra. YURITZI SANTILLÁN HERNÁNDEZ
PROFESOR ADJUNTO DE LA ESPECIALIDAD EN GENÉTICA
MÉDICA**

**Dra. LILIANA GARCÍA ORTÍZ
TUTOR DE TESIS**

**Dra. SANDRA ROMERO HIDALGO
ASESOR DE TESIS**

**DRA. MARCELA FRAGOSO BENITEZ
MEDICO RESIDENTE**

CONTENIDO

Antecedentes	4
1. Aspectos genéticos del metabolismo del óxido nítrico	4
2. Ejemplo de las aplicaciones genómicas de las óxido nítrico sintetasas en el sistema nervioso central	8
Justificación	12
Objetivos	14
Diseño	15
Resultados	18
Discusión	20
Conclusiones	22
Referencias	23
Anexos	
1. Consentimiento informado	26
2. Hoja de recolección de datos	27

ANTECEDENTES

El óxido nítrico (NO) es un metabolito que participa en la regulación del tono endotelial y su síntesis, en la cual participa la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), es una de las más estrictamente reguladas en los organismos vivos. Es decir, que la producción de NO depende de muchas constantes fisiológicas y su síntesis se ve afectada por muchos metabolitos secundarios que tienen una regulación independiente. La participación tanto del NO como de su sintetasa en la regulación del tono endotelial han sido motivo de investigaciones exhaustivas en los últimos años, ya que se encuentran relacionadas con enfermedades de todos los aparatos y sistemas del cuerpo humano. Quizá la relación más estudiada sea con enfermedades puramente cardiovasculares, como la presión arterial y, últimamente, con los aneurismas, ya sean o no, intracraneales. Su participación en la fisiopatología de estas enfermedades, se relaciona con su regulación génica y su fisiología.

1. ASPECTOS GENÉTICOS DEL METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO.

En un principio se consideró que la vasodilatación era un efecto producido por la acetilcolina como metabolito único; sin embargo, en 1980 Furchgott demostró que la acetilcolina funcionaba sólo como un intermediario, al estimular receptores endoteliales para la liberación de una sustancia que se difundía y actuaba sobre el músculo liso adyacente ^{1,2}. Esta sustancia fue denominada factor de relajación derivado del endotelio y se le conoce como EDRF por sus siglas en inglés. Dada su labilidad, aislarlo representó un gran

reto, aún cuando se descubrió tempranamente que tenía una función estimuladora de GMP cíclico ^{1,3}.

De manera independiente, las investigaciones acerca del mecanismo de acción de la nitroglicerina sobre la angina de pecho, cuyos efectos terapéuticos eran conocidos desde 1885, ayudaron a que en la década de los 70's, Murad e Ignarro demostraran que el metabolito activo de la nitroglicerina, es el óxido nítrico (NO) que produce relajación vascular ^{1,4,5}. Del mismo modo se demostró que el NO actuaba a través de GMP cíclico ^{1,6,7}.

Bajo estas circunstancias se consideró que el EDRF debía ser una sustancia químicamente parecida al NO ¹. Salvador Moncada demostró, mediante la medición de EDRF y NO en cultivos celulares, que ambas sustancias eran químicamente iguales.^{1,8} Así mismo, encontró que el endotelio sintetiza NO a partir de citrulina, una isoforma de arginina [**Fig.1**] ^{1,9} y que el NO o EDRF no sólo producía disminución del tono del endotelial, sino que también actuaba como antiagregante plaquetario ^{1,10}.

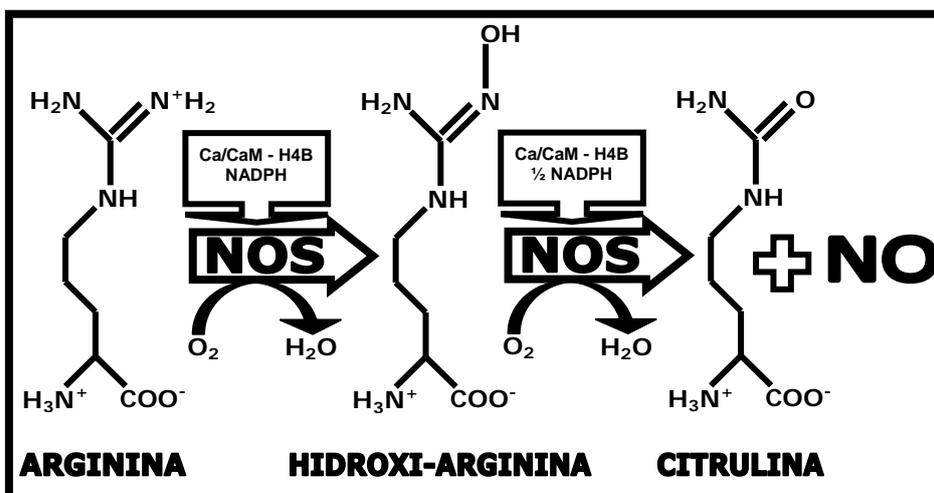


Fig.1. SÍNTESIS DEL OXIDO NÍTRICO. Donde Ca: calcio; CaM: calmodulina; NADPH:; NOS: óxido nítrico sintetasa; NO: óxido nítrico.

A diferencia de otros mediadores del metabolismo endotelial el óxido nítrico, no puede almacenarse, liberarse o inactivarse por métodos reguladores convencionales.

La síntesis de NO se lleva a cabo por diferentes isoformas de NOS, las cuales son tejido-específicas y pueden encontrarse en tipos celulares tan diversos como células endoteliales, músculo liso, hepatocitos, células de Kupffer, plaquetas, células beta del páncreas e inclusive neuronas ^{1,2,3,4}.

A grandes rasgos, existen dos tipos de NOS: la constitutiva y la inducible [Tabla 1] ^{1,2,3,4}. La forma constitutiva (cNOS) se encuentra en el endotelio, neuronas y plaquetas como una isoforma monomérica dependiente de calcio y calmodulina, con un peso molecular de aproximadamente 133kD ^{1,2,3,4}. cNOS se expresa ininterrumpidamente en ausencia de sus inhibidores, produciendo concentraciones picomolares de NO ^{1,2,3,4}. En cambio, la forma inducible (iNOS) se expresa en macrófagos, hepatocitos y músculo liso vascular; pero únicamente bajo la estimulación de endotoxinas y citocinas como interferón-gamma, interleucina 1 (IL1) y factor de necrosis tumoral 1(TNF1)^{1,2,3,4}. Debido a su enlace estrecho con calmodulina, es independiente de calcio y se encuentra como un tetrámero formado por 4 monómeros de 130kD. Después de su inducción, iNOS se encuentra activa por periodos de 4 a 24 hrs; durante las cuales sintetiza NO en concentraciones nanomolares, lo que significa 100 veces más que cNOS. Los glucocorticoides, factores de crecimiento e IL10 y 4 inhiben la actividad de iNOS ^{1,2,3,4}. Existen dos variantes de cNOS, la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS). Las cuales tienen un 60% de homología entre sí ^{5,6,7}. En estas dos variantes se encuentran conservados sitios de unión a FAD (Dinucleótido de adenín-flavina), FMN (Mononucleótido de flavina), NADPH

(Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato) y calmodulina; la especificidad de eNOS radica en la región N-terminal, donde un grupo miristoil vuelve a eNOS soluble; se cree que la inserción de este grupo N-terminal en la membrana plasmática del endotelio permite a eNOS esta localización ^{5,6,7}. Cerca del extremo N-terminal, eNOS posee un pentarepetido glicina-leucina; el cual está flanqueado por residuos de cisteína en ambos lados ^{5,8,9}. La cisteína es un sitio de palmitoización, el cual permite la dirección de la enzima hacia el Golgi ^{5,10,11} y es por sí mismo un proceso que interviene en el reciclaje de la proteína ^{1,12}.

TABLA 1. DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS ISOFORMAS CONSTITUTIVA E INDUCIBLE DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA.

CÉLULA DE ORIGEN	cNOS	iNOS
Plaquetas	+	
Linfocitos		+
Leucocitos	+	+
Macrófagos		+
Endotelio	+	+
Músculo liso endotelial		+
Endomiocradio		+
Hepatocitos		+
Células de Kupffer		+
Células β del páncreas	+	
Neuronas	+	
Células gliales	+	+
Células no adrenérgicas/ no colinérgicas	+	
Células renales en mácula densa	+	
Células carcinomatosas		+
Células epiteliales pulmonares		+

Modificado de: AnnSurg 221(3):220-235, 1995

El gen de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) se encuentra localizado en la región 7q35-36; consta de 21kb repartidas en 25 exones ^{13,14,15}.

2. EJEMPLO DE LAS APLICACIONES GENÓMICAS DE LAS ÓXIDO NÍTRICO SINTETASAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Como ya se ha mencionado, el NO es un radical libre altamente activo que posee una funciones reguladoras órgano específicas en casi todo el organismo. Las alteraciones en su síntesis participan en los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades como la aterosclerosis, hipertensión pulmonar, estenosis pilórica, falla renal, y más recientemente, los aneurismas, entre otros.¹².

El intrón 4 del gen *eNOS* presenta un repetido de 27 pares de bases (*eNOS27*), al cual se le ha adjudicado un efecto *cis* en la transcripción de *eNOS*. Tiene un alelo silvestre en el cual los 27pb se repiten cinco veces, mientras que la variante corta o mutante sólo presenta 4 repeticiones.

Se presume que la unión de este repetido en tándem con proteínas nucleares funciona como regulador de la expresión de *eNOS*, ya sea como activador o represor¹⁶. Las variantes en el número de repetidos ejercen una función directamente proporcional a la actividad de *eNOS*^{16,17}. Esta variación es haplotipo dependiente, cuando se combina con el promotor. Esto es: la variante silvestre (C) del promotor tiene una eficiencia 1.6 veces mayor — en la activación de *eNOS*— que la variante T, aún cuando no exista influencia de *eNOS27*¹⁶. La presencia de 5 repeticiones de 27pb —que es el alelo silvestre— inhibe en 36% la actividad original del promotor cuando este es tipo T; mientras que incrementa la actividad de la variante C en 288%. Cuando el número de repetidos es de 4, suceden eventos parecidos aunque no en tan alto grado¹⁶. (**Tabla 2**).

Tabla 2. CORRELACIÓN FUNCIONAL DE LOS POLIMORFISMOS EN <i>eNOS27</i>			
TIPO ESTUDIO	POLIMORFISMO	EFEECTO	REFERENCIA
In Vitro. Cultivos de endotelio + extracto de cigarro	Promotor T786C	Activación 160% mayor que 786C	Wang, 2002
	Promotor T786C + <i>eNOS27x5</i>	Inhibición 36%	
	Promotor 786C + <i>eNOS27x5</i>	Activación 288%	
	Promotor T786C + <i>eNOS27x4</i>	Inhibición	
	Promotor 786C + <i>eNOS27x4</i>	Activación	

La frecuencia genotípica del polimorfismo de cuatro repetidos es variable; en un estudio de 89 pacientes con enfermedad coronaria se encontró una frecuencia de 43.2% para el alelo largo o silvestre; mientras que se encontró un 42.1% de heterocigotos y 8.4% de homocigotos para el alelo alelo corto.¹⁸ Sohni y cols., realizaron un chip para la genotipificación de microsatélites asociados a complicaciones de diabetes tipo 1 y 2 como son hipertensión y nefropatía, el cual incluye a *eNOS27*; en dicho estudio incluyeron 230 individuos sanos de raza caucásica y se encontró un distribución genotípica de 75% de homocigotos del alelo largo y 25% de heterocigotos; no se encontró ningún individuo homocigoto para el alelo corto.¹⁹ No existen datos respecto a la distribución genotípica en población mexicana.

Aunque la patología del sistema nervioso se ha estudiado más desde el punto de vista del NO y su neurotoxicidad, las devastadoras consecuencias de los aneurismas rotos han hecho de su investigación una actualidad.

En pacientes de raza Caucásica se ha asociado mayor índice de rupturas con variantes alélicas de los polimorfismos T-786C del promotor; el repetido en

tandem de 27pb, y el G894T del exón 7; sin embargo, estos mismos polimorfismos no han demostrado asociación con ruptura de aneurismas intracraneales en población japonesa¹⁶. Los resultados obtenidos son en muestras pequeñas, por lo que se recomienda reproducir el estudio a gran escala¹⁶.

Sin embargo, debe considerarse la evidencia reciente de que *eNOS27* no se encuentra relacionado, aparentemente, con enfermedad coronaria; lo cual fue demostrado por Hwang y cols.²⁰, quienes determinaron la presencia de la variante de cuatro contra la de cinco repetidos en 219 pacientes de Taiwán y no encontraron asociación entre la presencia de uno u otro repetido con enfermedad coronaria, infarto o angina inestable²⁰. Estos resultados se contraponen al estudio realizado por Wang y cols., en población australiana, donde sí se encontró asociación entre la variante de cuatro repetidos y enfermedad coronaria en fumadores²¹. Varios estudios han que la variante de cuatro repetidos de *eNOS27* se asocia con enfermedad coronaria en fumadores²¹; con trombosis venosa y accidentes cerebrales en población turca²², con ruptura de aneurismas abdominales en población japonesa²³ y con tromboembolismo venoso en población española²⁴ e inclusive con ruptura de aneurismas y hemorragia subaracnoidea²⁴; sin embargo, en enfermedad vascular cerebral por aneurismas, no se ha demostrado claramente una relación directa con el polimorfismo de cuatro repetidos. Quizá, el más completo es el estudio de Khurana y cols., el cual evaluó los polimorfismos de *eNOS27* de cuatro versus cinco repetidos, el polimorfismo T786C del promotor y el polimorfismo G894T del exón 7 en grupos de pacientes con aneurismas rotos y con aneurismas sin ruptura; y encontró que los alelos mutantes

eran entre dos y cuatro veces más frecuentes en pacientes con aneurisma roto que en los pacientes con aneurisma no roto.²⁵ Un resumen de estos estudios se encuentra en las **Tabla 3**.

Tabla 3. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN eNOS27 CON DIFERENTES ENFERMEDADES COMPLEJAS

POBLACIÓN	POLIMORFISMO	ASIGNACIÓN		FRECUENCIA ALELICA	RESULTADOS	REFERENCIA
		CASO	CONTROL			
Población australiana + enfermedad coronaria + tabaquismo	Promotor + eNOS27	549 pacientes con enfermedad coronaria y tabaquismo	453 controles	eNOS27x4=0.17 eNOS27x5=0.83	“Exceso de homocigotos para alelo corto en pacientes con estenosis severa, versus leve o moderada o nula”	Wang, 1996
Población turca + accidentes cerebrales + trombosis venosa	eNOS27	ND	ND	eNOS27x4=0.14 eNOS27x5=0.86	Asociación del alelo corto con la enfermedad	Akar, 1999
Población española + trombosis venosa	Promotor + eNOS27	ND	ND	eNOS27x4=0.13 eNOS27x5=0.87	No se encontró asociación entre enfermedad y alelo mutante	González, 2000
Población japonesa + aneurismas abdominales	eNOS27	58 pacientes con aneurismas aórticos abdominales. 34 quirúrgicos, 24 NO quirúrgicos	410 controles sanos pareados por edad	Controles eNOS27x4=0.10 eNOS27x5=0.90	Asociación entre alelo corto y necesidad de cirugía	Kotani, 2000
				Pacientes eNOS27x4=0.13 eNOS27x5=0.87		
Población taiwanesa + enfermedad coronaria	eNOS27	219 pacientes con enfermedad coronaria 420/420= 77.9% 420/393= 21.5% 393/393=0.6%	Controles (no especifica cuántos) 420/420=80% 420/393=20% 393/393=0%	eNOS27x4=0.13 eNOS27x5=0.87	Sin asociación entre enfermedad coronaria y alelo mutante	Hwang, 2002
Población caucásica sana	eNOS27	230 individuos sanos	Se estandarizó chip diagnóstico que permitirá tamizar dos polimorfismos de eNOS asociados a complicaciones vasculares de diabetes tipo 2	eNOS27x4=0.13 eNOS27x5=0.87	No se encontraron homocigotos para el alelo mutante	Sohni, 2003
Población caucásica + aneurismas	Promotor + eNOS27 + exón 7	58 pacientes con aneurisma intracraneal roto 420/420=50% 420/393=48% 393/393=2%	49 pacientes con aneurismas intracraneales no rotos 420/420=80% 420/393=20% 393/393=0%	Aneurisma roto eNOS27x4=0.26 eNOS27x5=0.74	Asociación entre la variante corta y ruptura del aneurisma intracraneal	Khurana, 2005
				Aneurisma no roto eNOS27x4=0.10 eNOS27x5=0.90		

ND= no disponible; en los grupos de asignación donde se indica se muestran frecuencias genotípicas, donde 420/420 equivale a homocigoto para el alelo silvestre; 420/393 representa a un heterocigoto y 393/393 es homocigoto para el alelo mutante.

JUSTIFICACIÓN

Enfermedades de gran importancia epidemiológica como la hipertensión, los accidentes vasculares cerebrales (incluyendo aneurismas rotos), la migraña, la disfunción eréctil, entre otras, tienen una relación fisiopatológica importante con todas las sustancias cuya acción o metabolismo se lleva a cabo en el endotelio. De estas miles de sustancias, el NO ha sido una de las sustancias más estudiadas en las últimas décadas.

Como ya se ha mencionado el NO es un radical libre altamente activo que posee funciones reguladoras órgano específicas en casi todo el organismo. Las alteraciones en su síntesis representan los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades cuya base es la regulación del tono endotelial.

El proyecto del genoma humano ha representado un gran avance en la comprensión de la regulación de muchas de estas sustancias; los estudios en modelos animales, de expresión y la caracterización de los genes involucrados permiten dilucidar tanto la fisiología como la fisiopatología. Y más aún, en algunos casos se han desarrollado medicamentos que ponen en evidencia la importancia de estos conocimientos.

Desafortunadamente, la mayoría de estos proyectos son realizados en Estados Unidos y Europa, haciendo que los resultados sean poco aplicables a nuestra población.

Los aneurismas cerebrales son un problema de salud de gran importancia. La prevalencia es hasta de 6.5%²⁶ y aún cuando la incidencia de ruptura es mucho más baja, la tasa de mortalidad reportada es de hasta 46% a 30 días después de una ruptura²⁶. Así mismo, debe considerarse que los pacientes que sobreviven requieren de servicio médico permanente, ya sea para atender las complicaciones asociadas, como para atender las secuelas

del evento, la mayoría de las cuales son discapacitantes. Ya que la etiología de los aneurismas y su ruptura es multifactorial, se han tratado de encontrar factores de riesgo, de los cuales los polimorfismos en genes relacionados con su fisiopatología son los de mayor interés, ya que pudieran predecir si una persona tiene riesgo de padecer la ruptura de un aneurisma. La presente tesis, es complemento de un trabajo de investigación que actualmente se desarrolla en la División de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE, cuya objetivo es determinar si existe asociación entre diversos polimorfismos con ruptura de aneurismas intracraneales. Lo anterior conlleva la necesidad de determinar la frecuencia del polimorfismo *eNOS27* en nuestra población con el fin poner el cimiento para futuras investigaciones.

OBJETIVOS

Determinar la frecuencia alélica del polimorfismo *eNOS27* de cuatro y cinco repetidos (alelo silvestre) del gen de la óxido nítrico sintetasa en una muestra de población mestiza mexicana derechohabiente del ISSSTE.

DISEÑO

Se reclutaron voluntarios interesados a participar en el tamizaje de una muestra de población mestiza mexicana para el polimorfismo *eNOS27* del gen de la óxido nítrico sintetasa. El tamaño de la muestra se calculó en 384 individuos, considerando un nivel de confianza deseado de 95%; frecuencia esperada de 50% que es la máxima posible y un margen de error mínimo, es decir, del 5%, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}$$

FIGURA 2. FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DEMUESTRA. Donde $z_{1-\alpha}$ e el nivel de confianza a 95%; p corresponde a la frecuencia poblacional, es decir, 0.5 y d^2 el margen de error.

Los voluntarios debían ser mayores de 18 años de edad, no relacionadas, nacidas en México cuyos padres y cuatro abuelos fueran también originarios de este país. Se les pidió contestar un cuestionario (Anexo 1) con datos generales como edad, sexo, tabaquismo, alcoholismo y antecedentes personales y familiares de enfermedades como hipertensión, obesidad, infarto. También firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 2). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE. No se excluyó a ningún participante en caso de enfermedad o medicación; ni tampoco por antecedentes de padecimientos hereditarios. No se eliminó ninguna muestra.

Se planeó utilizar frecuencias relativas y absolutas. Para describir la información puntualmente se estimó la frecuencia alélica poblacional a un intervalo de confianza del 95%. La frecuencia alélica de la muestra se

calcularía dividiendo el número de veces que aparece el correspondiente alelo en la muestra entre $2n$. Así mismo se compararía la frecuencia de la variante de cinco repetidos contra la de cuatros repetidos, evaluando si dichas frecuencias se mantienen en equilibrio de Hardy-Weinberg.

De manera simultánea se evaluó la frecuencia de las variables incluidas en la hoja de recolección de datos y su posible relación con el repetido de cinco versus el repetido de cuatro.

Se obtuvo sangre de vena periférica de cada individuo con un kit BD Vacutainer en tubos de recolección de tapa morada (EDTA) de 6ml. Previo consentimiento informado. Luego, se realizó la extracción de DNA mediante el método salino, posterior a la numeración de las muestras; el DNA obtenido se guardó a 4°C disuelto en agua inyectable estéril.

Se estandarizó la técnica de PCR para los polimorfismos de *eNOS27* a partir de la descrita previamente por Wang y cols. 1996¹⁸, utilizando las siguientes secuencias de primers:

Fwd: 5'-AGGCCCTATGGTAGTGC-CTTT-3' y

Rev: 5'-TCTCTTAGTGCT-GTGGTCAC-3'. Se establecieron las siguientes condiciones: 1 ciclo de activación con dos pasos: a) 4°C/1min y b) 95°C/4min; 35 ciclos de amplificación con temperaturas de a) Denaturalización 94°C/1min; b) Alineamiento 58°C/1min y, c) Elongación 72°C/2min. Ciclo final de 4°C. Conteniendo 12µl de mezcla de reacción con ≈150ng de DNA.

El producto final de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se estableció si era de 393 ó 420pb según el siguiente esquema:

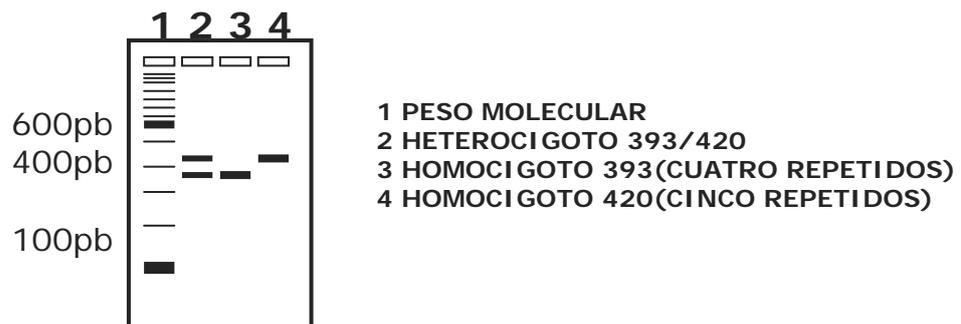


FIGURA 3. ESQUEMA QUE MUESTRA LOS GENOTIPOS POSIBLES

RESULTADOS

Se obtuvo muestra de sangre de 42 individuos, de los cuales 19 eran mujeres y 23 eran hombres con un rango de edades de 19 a 63 años, media 39.89 ± 11.12 , moda 29 y mediana 40 años.

Todos los pacientes resultaron homocigotos para el alelo silvestre de 5 repetidos [Tabla 4]; un ejemplo del producto separado mediante electroforesis se muestra en la Figura 4.

Tabla 4. Frecuencia alélica y genotípica del presente estudio.

GENOTIPO	n	%
420/420	42	100
420/393	0	0
393/393	0	0
TOTAL	42	100

ALELO	n	%
420	84	100
390	0	0
TOTAL	84	100

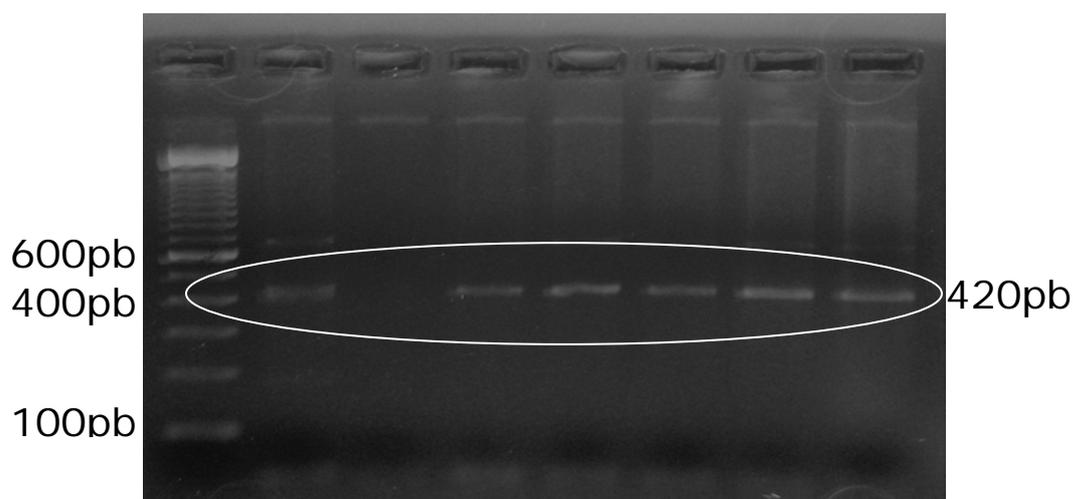
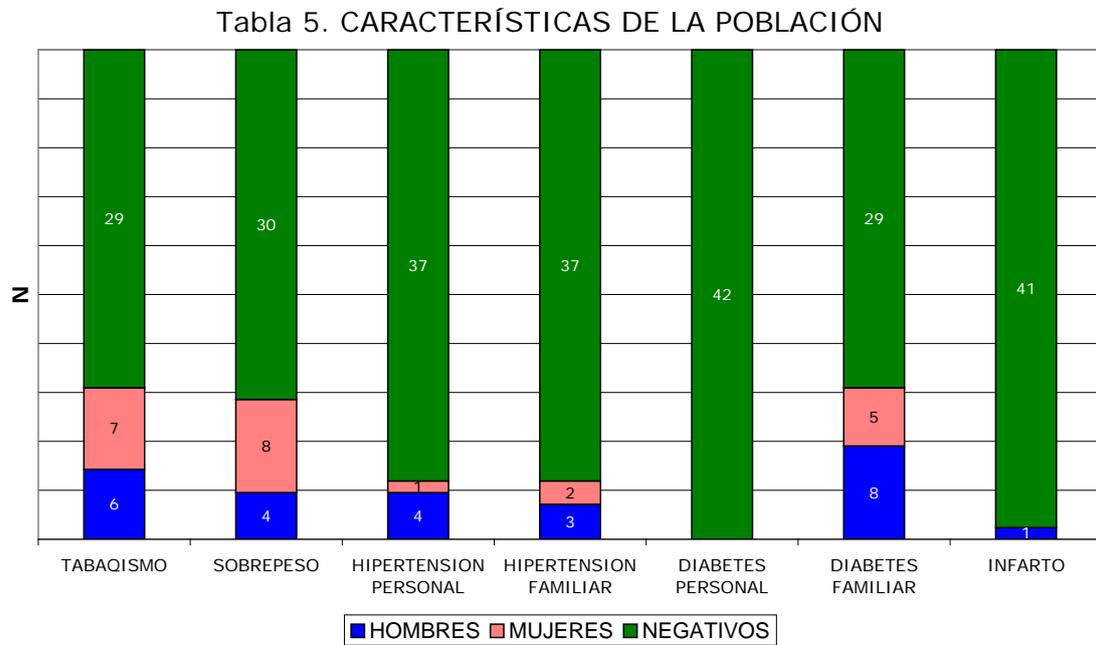


FIGURA 4. GEL DE AGAROSA 2%, CON MUESTRAS QUE RESULTARON CON EL ALELO LARGO DE CINCO REPETIDOS

Se encontraron 13 fumadores, lo que equivale al 30%. Ninguno de los voluntarios incluidos reportó alcoholismo. Doce (28%) de los voluntarios tienen sobrepeso, sólo cinco (11%) reportaron ser hipertensos y otros cinco reportaron antecedentes familiares de hipertensión. No se encontró ningún diabético y 13, es decir, 30% refirieron antecedentes familiares de diabetes. Sólo se encontró un paciente con antecedente personal de infarto al

miocardio (0.2%); ninguno reportó antecedente familiar de dicho padecimiento. Se resumen estos datos en la **Figura 5**. Características de la población.



DISCUSIÓN

El tamaño de muestra fue reconsiderado de 384 a una muestra por conveniencia de 42 pacientes debido a falta de recursos financieros en el Laboratorio de Medicina Genómica. Dado el hecho de que todos los pacientes hayan resultado homocigotos para el alelo largo, de cinco repetidos, que es el más frecuente en otras poblaciones, será necesario estudiar una muestra mucho mayor para establecer la prevalencia del alelo corto. Así mismo, el resultado de 100% de homocigotos para el alelo silvestre impidió realizar los cálculos pertinentes, como son equilibrio de Hardy-Weinberg y chi cuadrada con la muestra estudiada.

Los resultados preliminares de este estudio en 42 sujetos aparentemente sanos mexicanos, parece indicar que la prevalencia del polimorfismo en nuestra población es más baja que en otras poblaciones estudiadas; sin embargo, la muestra estudiada es demasiado pequeña todavía para poder concluir. Nuestros resultados se comparan con los resultados preliminares del estudio realizado por Galaviz y cols. (información no publicada), en el cual se buscaron los mismos polimorfismos de *eNOS27* en 46 pacientes con ruptura de aneurisma intracraneal y donde se encontraron sólo dos heterocigotos. Así mismo, se compara con los resultados obtenidos en población caucásica por Khurana y cols²⁵, en donde el alelo mutante o corto es más frecuente inclusive en población abierta.^{16,17} (**Tablas 5 y 6**). Estos resultados, sugieren que la presencia del alelo corto pudiera asociarse con la ruptura de aneurismas intracraneales. Es importante recalcar que el efecto de este polimorfismo no ha sido estudiado previamente solo, es decir, siempre ha sido estudiado en correlación funcional con otros polimorfismos, ya sea de *eNOS27* o bien, que funcionalmente afectan a la

óxido nítrico sintetasa. Por lo que debe considerarse si este polimorfismo debe seguirse estudiando solo o debe complementarse con los polimorfismos en el promotor y exón 7.

Tabla 5. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS LARGO Y CORTO DE LA eNOS27								
	Aneurisma sin ruptura		Aneurisma con ruptura		Aneurisma con ruptura		Población abierta	
Alelo	Khurana y cols.		Khurana y cols.		Galaviz y cols.		Fragoso y cols.	
420	88	89.8%	86	74.1%	94	97.9%	88	100.0%
390	10	10.2%	30	25.9%	2	2.1%	0	0.0%
Total	98		116		96		88	

Tabla 6. COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS AGENOTÍPICAS EN DIFERENTES ESTUDIOS.

FRECUENCIAS DE LOS GENOTIPOS DE LA ENOS27 (ANEURISMAS)						
	Aneurisma sin ruptura		Aneurisma con ruptura		Aneurisma con ruptura	
Genotipo	(Khurana y cols.)		(Khurana y cols.)		(Galaviz y cols.)	
420/420	39	79.6%	29	50.0%	46	95.8%
420/393	10	20.4%	28	48.3%	2	4.2%
393/393	0	0.0%	1	1.7%	0	0.0%
Total	49		58		48	
FRECUENCIAS DE LOS GENOTIPOS DE LA ENOS27						
Población abierta						
Genotipo	(Kotani y cols.)		(Sohni y cols.)		(Fragoso y cols.)	
420/420	331	80.7%	173	75.0%	44	100.0%
420/393	76	18.5%	57	25.0%	0	0.0%
393/393	3	0.7%	0	0.0%	0	0.0%
Total	410		230		44	

La presencia de dos pacientes heterocigotos en ese estudio, sugiere que el alelo corto (393pb) puede estar relacionado con patología; de hecho, en dicho estudio se sugiere la correlación funcional, lo cual pudiera ser un trabajo posterior.

CONCLUSIONES

Este estudio demostró que la variante silvestre de cinco repetidos (420pb) es la más frecuente en población mestizo mexicana, por lo que la presencia del alelo corto (393pb) o bien, de cuatro repetidos, es posible que se encuentre asociada a patología. Sin embargo, deben completarse estudios para saber si dicha mutación se encuentra en correlación funcional a mutaciones con el promotor de *eNOS27* y/o a mutaciones en *eNOS3* como lo han sugerido trabajos previos. Consideramos que es necesario extender el tamaño de muestra para el presente estudio.

REFERENCIAS

1. Kuo PC, Schroeder RA. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann Surg* 221(3):220-235, 1994.
2. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992.
3. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012, 1993.
4. Moncada S, Palmer RMI, Higgs A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-141, 1991. Bredt DS. Nitric Oxide Synthases. En: *The Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 8th Ed., New York, 2001. Pp. 4275-4290.
5. Bredt DS. Nitric Oxide Synthases. En: *The Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 8th Ed., New York, 2001. Pp. 4275-4290.
6. Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 268:8410, 1993.
7. Sessa WC, Barber CM, Lynch KR. Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res* 72:921, 1993.
8. Robinson LJ, Michel T. Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *PNAS* 92:11776, 1995.
9. Liu J, García-Cardena G, Sessa WC. Biosíntesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. Mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines 15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34:12333, 1995. Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:e1-e4.

10. Shaul PW, Samrt EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Person RG, Michel T. Acylation targets endothelial nitric oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271:6518, 1996.
11. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: Implications for nitric oxide signaling. *PNAS* 93:6448, 1996.
12. Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 270:995, 1995.
13. Bredt DS. Nitric Oxide Synthases. En: *The Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, 8th Ed., New York, 2001. Pp. 4275-4290.
14. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosome localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478, 1993.
15. Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics* 19:350, 1994.
16. Wang J, Dudley D, Wang XL. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency modifiable by cigarette smoking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:e1-e4, 2002.
17. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, et al. T27863C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870, 1999.
18. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* 24(4):218-224, 2005.
19. Sohni YR, Burke JP, Dyck PJ, O'Kane DJ. Microfluidic chip-based method for genotyping microsatellites, VNTRs and insertion/deletion polymorphisms. *Clin Biochem* 36(1):35-40, 2003.

20. Hwang JJ, Tsai CT, Yeh HM, Chiang FT, Hsu KL, Tseng CD, Liao CS, Tseng YZ, Lai LP. The 27-bp tandem repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene is not associated with coronary artery disease in a hospital-based Taiwanese population. *Cardiology* 97:67-72, 2002.
21. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredle RM, Wilcken DE. A smoking-dependant risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1: 41-45, 1996
22. Akar N, Akar E, Cin S, Deda G, Avcu F, Yalcin A. Endothelial nitric oxide intron 4, 27 bp repeat polymorphism in Turkish patients with deep vein thrombosis and cerebrovascular accidents. *Thromb Res* 94:63-64; 1999.
23. Kotani K, Shimomura T, Murakami F, Ikawa S, Kanaoka Y, Ohgi S, Adachi K, Nanba E. Allele frequency of human endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in abdominal aortic aneurysm. *Int Med* 39:537-539, 2000.
24. Ordóñez AJ, Fernández Carreira JM, González Franco A, Martín Sánchez L, Álvarez MV, Coto García E. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron 4, 27 bp repeat and -786 T/C) and venous thromboembolism. *Thromb Res* 99:563-566, 2000.
25. Khurana VG, Meissner I, Yourvaj R, et al. The presence of tandem endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms identifying brain aneurysms more prone to rupture. *J Neurosurg* 102:526-531, 2005.
26. Broderick JP, Brott TG, Tomsick T, et al. Intracerebral Haemorrhage: more than twice as common as subarachnoid haemorrhage. *J Neurosurg* 78:188-191, 1993.

ANEXOS

ANEXO 1- CONSENTIMIENTO INFORMADO



SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA,
DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA.
DETERMINACION DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL POLIMORFISMO
eNOS27 (GEN DE LA OXIDO NITRICO SINSETASA) EN POBLACION
MESTIZA MEXICANA.



HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Al firmar abajo, yo: _____, reconozco que:

- Se me ha explicado en que consiste este protocolo y se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas respecto a los beneficios y las limitaciones de la(s) prueba(s) genética(s) que se realizarán con mi muestra.
- Se me ha informado que este es un estudio de investigación cuyo objetivo es tener información del gen eNOS27 en población mexicana, y que por tanto, no hay resultados específicos para mi persona.
- Se me ha dicho que este estudio es gratuito y no remunerado; que es voluntario y que puedo pedir se suspenda mi participación en él si así lo deseo, sin que esto afecte la atención médica que recibo.
- Se me ha asegurado que mi muestra será manejada por un número, por lo que estará en completo anonimato, así mismo, que los datos del cuestionario y los resultados del estudio sólo serán vistos por los investigadores.
- Se me ha informado en qué consiste el proceso para la obtención de muestra, así como de los riesgos que implica.
- Se me ha comunicado que mi muestra puede ser útil para otros trabajos de investigación y SI / NO he aceptado que se utilice.
- He leído este documento en su totalidad y entiendo que puedo guardar una copia para su constancia.
- Se ha notificado que cualquier duda al respecto puedo comunicarme con la Dra. Marcela Fragoso Benítez o Dra. Liliana García Ortiz, al teléfono 5200 5003, ext. 14507

NOMBRE COMPLETO

FIRMA

FECHA

TELÉFONO

TESTIGO 1 (NOMBRE, FIRMA)

TESTIGO 2 (NOMBRE, FIRMA)

INVESTIGADOR QUE OBTIENE EL CONSENTIMIENTO

ANEXO 2- HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS



SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA,
DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA.
DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA ALÉLICA DEL POLIMORFISMO
ENOS27 (GEN DE LA OXIDO NITRICO SINSETASA) EN POBLACION
MESTIZA MEXICANA.



HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

FECHA

#MUESTRA	TABAQUISMO cig/dia	ALCOHOLISMO vasos/sem	DROGADICCION	INFARTO AL MIOCARDIO	ENF. VASCULAR CEREBRAL	HIPERCOLESTEROLEMIA	OBESIDAD	ENF. VENOSA	DEMENCIA	ENF. HUNTINGTON	PAD. CARDIOVASC. NO ESP.	PAD. NEUROLOGICO NO ESP.	CIRUGIAS	DIABETES	HIPERTENSION	GESTAS	ABORTOS	CESAREAS	PREECLAMPSIA	ECLAMPSIA	DIABETES GESTACIONAL	EDAD	SEXO	TRABAJO hrs/dia	EJERCICIO hrs/sem	
				<50 >50	<50 >50				<50 >50		<50 >50	<50 >50		<50 >50	<50 >50											
PACIENTE																										
MADRE																										
PADRE																										
HIDO 1																										
HIDO 2																										
HIDO 3																										
HIDO 4																										
HERMANO(S)																										
HERMANA(S)																										
LINEA MATERNA																										
ABUELO																										
ABUELA																										
TIOS																										
TIAS																										
PRIMOS																										
PRIMAS																										
SOBRINOS																										
SOBRINAS																										
LINEA PATERNA																										
ABUELO																										
ABUELA																										
TIOS																										
TIAS																										
PRIMOS																										
PRIMAS																										
SOBRINOS																										
SOBRINAS																										

S si
N no
D desconoce