



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
"IGNACIO CHÁVEZ"**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**



**ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *eNOS* EN LA
SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL DESARROLLO DE
RESTENOSIS EN PACIENTES CON STENT CORONARIO.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICO
BIOLÓGICA**

**PRESENTA:
ANGÉLICA VIRIDIANA BARRIOS RODAS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA
ASESOR DE TESIS: QFB MARÍA LOURDES VEGA NAVARRETE**



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.

DEDICATORIAS

A mis padres, por apoyarme incondicionalmente, porque gracias a ustedes hoy en día soy la persona que soy, por que han hecho todo lo posible para que logre mis sueños y por darme su apoyo en los momentos más difíciles y lo más importante, por amarme tanto como yo los AMO a ustedes.

A Ricardo, que has sido mi amigo, mi confidente, mi apoyo; mi peloi te agradezco todo lo que hemos vivido a lo largo de este viaje maravilloso que hemos recorrido juntos, que nos ha ayudado a crecer como personas, como pareja y como profesionales, TE AMO.

A Sergio, gracias por ser un apoyo para mi mamá y para mí, por esas noches que me ayudaste a estudiar y por tomarte un tiempo siempre para escucharme. Aunque no lo diga TE QUIERO.

A mi hermano Alberto, para que aprendas que con constancia y dedicación se pueden lograr nuestros sueños, nada es imposible; TE AMO hermanito. Siempre lucha por tus sueños.

A mis amigas Marva, Eli y Yashué, que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas y por los buenos momentos que hemos compartido y no olvidaré, espero que esta amistad duré muchos años más, las quiero mugris.

A mis angeles (mi mami Teresa, mi abuelito Amilcar, mi abuelita Juvencia y mi prima Patsy) que se nos adelantaron en el camino; aunque sé que donde quiera que estén siempre me acompañarán y me hubiera gustado compartir éste logro con ustedes en vida, los extraño.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Manuel Fragoso Lona** por permitirme ser parte de este proyecto, exigiéndome más cuando usted sabía que podía dar más de mí, entre muchas otras cosas; pero lo que siempre le reconoceré y agradeceré es siempre dedicarnos a sus alumnos un tiempo cuando lo necesitamos.

A la **Q.F.B. María Lourdes Vega Navarrete** por su apoyo a lo largo de este proyecto y porque gracias a usted desarrolle mi gusto por la genética que me ha abierto el panorama profesional.

A la **Q.F.B. Patricia Vidal Millán** porque a lo largo de la carrera me enseñó a siempre esforzarme más, que el conocimiento es infinito por lo que no hay que dejar de prepararse y sobre todo a tener pasión en lo que haga además de que el éxito es consecuencia de la perseverancia.

Al **Q.F.B. Francisco Javier Parada García** y al **M. en C. Arturo Valle Mendiola** gracias por ser parte de este proceso tan importante para mí y por sus comentarios para lograr un mejor trabajo.

“Solo triunfa en el mundo quien se levanta y busca a las circunstancias y las crea si no las encuentra”

Bernard Shaw

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
A. INTRODUCCIÓN.....	5
B. MARCO TEÓRICO.....	7
1. ATROSCLEROSIS.....	7
1.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	8
2. SINDROME CORONARIO AGUDO (SCA).....	10
2.1 FISIOPATOLOGÍA DE SCA.....	13
2.2 EL ENDOTELIO Y DISFUNCIÓN.....	19
2.3 TRATAMIENTO.....	20
3 RESTENOSIS.....	23
3.1 FISIOPATOLOGÍA DE RESTENOSIS.....	24
4 ÓXIDO NÍTRICO (ON).....	27
4.1 BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO.....	28
4.2 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS).....	30
5 GEN DEL ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (eNOS).....	32
5.1 POLIMORFISMOS.....	33
C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
D. HIPÓTESIS.....	36
E. OBJETIVO.....	37
F. METODOLOGÍA.....	38
1. DISEÑO.....	38

2.	UNIVERSO	38
3.	VARIABLES.....	39
4.	TÉCNICAS	40
5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
G.	RESULTADOS	42
H.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
I.	CONCLUSIÓN.....	52
J.	PERSPECTIVAS.....	53
K.	ANEXOS.....	54
1.	EXTRACCIÓN DE DNA POR MÉTODO DE EXPULSIÓN SALINA. Modificado de ⁽¹⁰⁴⁾	54
2.	TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL	56
L.	REFERENCIAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1: ELECTROCARDIOGRAMA NORMAL ⁽²⁵⁾	10
FIG. 2: CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES CORONARIOS AGUDOS (SCA). EL ELECTROCARDIOGRAMA (ECG) PERMITE DISTINGUIR DE ENTRADA ENTRE LOS SCA CON Y SIN ELEVACIÓN DEL SEGMENTO ST.HBPM: HEPARINA DE BAJO PESO MOLECULAR ⁽²⁸⁾	12
FIG. 3: ETAPA DE OXIDACIÓN DEL PROCESO ATROSCLERÓTICO ⁽¹²⁾	14
FIG. 4: ETAPA DE INFLAMACIÓN DEL PROCESO ATROSCLERÓTICO ⁽¹²⁾	16
FIG. 5: ETAPA DE TROMBOSIS DEL PROCESO ATROSCLERÓTICO ⁽¹²⁾	18
FIG. 6: BAJO CONDICIONES PATOLÓGICAS SE PRODUCEN ALTERACIONES EN UNO O MÁS DE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR EMITIDOS POR EL ENDOTELIO, LO CUAL ES CONOCIDO COMO DISFUNCIÓN ENDOTELIAL ⁽⁵⁾	20
FIG. 7: CLASIFICACIÓN DE MEHRAN DE LA REESTENOSIS INTRASTENT DE ACUERDO CON LA EXTENSIÓN DEL PROCESO PROLIFERATIVO ⁽¹⁰⁵⁾	22
FIG. 8: MECANISMOS DE RESTENOSIS ⁽⁴⁶⁾	26
FIG. 9: REACCIÓN GENERAL CATALIZADA POR LA NOS: FORMACIÓN DE ON EN DOS PASOS CONSECUTIVOS ⁽⁶²⁾	29
FIG. 10: LA MOLÉCULA DE ÓXIDO NÍTRICO (ON) POSEE UN ELECTRÓN DESAPAREADO, EL CUAL INTERACTÚA RÁPIDAMENTE CON OTRAS MOLÉCULAS QUE TAMBIÉN TIENEN ELECTRONES DESAPAREADOS, TALES COMO LAS PROTEÍNAS O LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) ⁽¹⁰⁶⁾	30

*FIG. 11: ESTRUCTURA DE LA ENZIMA ENOS. TOMADA DE [HTTPS://WWW.CAYMANCHEM.COM](https://www.caymanchem.com)
(68) 31*

FIG. 12: LOCALIZACIÓN DEL GEN ENOS. 33

*FIG. 13: LOCALIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -786 T/C, -1474 A/T Y EN EL EXÓN 7 GLU298ASP
DENTRO DEL GEN ENOS..... 34*

*FIG. 14.-DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ENTRE LOS POLIMORFISMOS GLU298ASP, -786 T/C Y -
1474 T/A. TOMADA DEL PROGRAMA HAPLOVIEW VERSIÓN 4.1. 45*

*FIG. 15.- ÁREA DE EXTRACCIÓN DEL LABORATORIO DE GENÓMICA "INSTITUTO NACIONAL DE
CARDIOLOGÍA" 55*

*FIG. 16.- ÁREA DE PCR EN TIEMPO REAL. LABORATORIO DE GENÓMICA DEL "INSTITUTO
NACIONAL DE CARDIOLOGÍA" 58*

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- PRIMERS UTILIZADOS PARA CADA SNP EN DONDE SE MUESTRA CUAL ESTÁ MARCADA COMO VIC /FAM EN PCR EN TIEMPO REAL.....	40
TABLA 2.-CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES CON Y SIN RESTENOSIS.	42
TABLA 3.-FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS (GLU298ASP,-786T/C Y -1474T/A) DEL GEN ENOS EN PACIENTES CON Y SIN RESTENOSIS.....	43
TABLA 4 .- MODELO DE HERENCIA AJUSTADO DEL POLIMORFISMO -1474 T/A DEL GEN ENOS. ..	44
TABLA 5.-ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS DEL GEN ENOS EN PACIENTES CON Y SIN RESTENOSIS.	46

ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico	IL	Interleucina
ADM	Antecedentes de diabetes mellitus	INF	Interferón
ADMA	Dimetilarginina asimétrica	IP	Intervencionismo previo
ADP	Adenosín difosfato	IRC	Insuficiencia renal crónica
AE	Angina estable	IS	Isquemia silente
AI	Angina inestable	ITB	Índice de presión arterial tobillo/brazo
Akt	Proteincinasa B	kb	kilobases
ATC	Angioplastia transluminal coronaria	kDa	Kilodalton
CaM	Calmodulina	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
CK-MB	Creatin fosfo cinasa fracción MB	LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
CML	Células musculares lisas	LOX	Receptor de LDL oxidadas
CRCP	Cirugía de revascularización cardíaca previa	MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
DES	Stents liberadores de fármacos	M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
DM-2	Diabetes mellitus tipo 2	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
DNA	Ácido desoxirribonucleico	mtNOS	Óxido nítrico sintasa mitocondrial
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
ECEA	Enfermedades crónicas esenciales del adulto	nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
ECG	Electrocardiograma	NOS	Óxido nítrico sintasa
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles	ON	Óxido nítrico
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio	PAN	Péptido natriurético auricular
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial	PCR	Proteína C reactiva o reacción en cadena de la polimerasa
EPG	Factor de crecimiento epidérmico	PCR hs	Proteína C reactiva de alta sensibilidad
ERO	Especies reactivas de oxígeno	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FAD	Flavin adenina dinucleótido	PTCA	Angioplastia transluminal coronaria percutánea
FDA	Food and Drug Administration	RM	Razón de momios
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico	SCA	Síndrome coronario agudo
FMN	Flavinmononucleótido	SDS	Duodecil sulfato de sodio
GCS	Guanilato ciclasa	SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico	TBH	Tetrahidrobiopterina
GTP	Guanosín trifosfato	TC	Tomografía computarizada
HAS	Hipertensión arterial sistémica	TGF	Factor transformador de crecimiento
HBPM	Heparina de bajo peso molecular	TNF	Factor de necrosis tumoral
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	VCAM	Molécula de adhesión vascular
IAM	Infarto agudo de miocardio	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
IC	Intervalo de confianza		
ICAM	Molécula de adhesión intracelular		

A. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbilidad y mortalidad en casi dos terceras partes de la población mundial. Cada año, mueren alrededor de 17 millones de personas por enfermedad cardiovascular, se estima que cada 4 segundos ocurre un evento coronario y cada 5 segundos un evento vascular cerebral ^(1,2).

En México al igual que en otros países emergentes y en la mayoría de los países desarrollados la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) o también denominadas enfermedades crónicas esenciales del adulto (ECEA), tales como hipertensión arterial sistémica (HTAS), diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), obesidad y aterosclerosis entre otras, han demostrado un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, llegando a superar la prevalencia de las enfermedades transmisibles en el adulto sin excluir a los adolescentes y a la población infantil. A esta transformación se ha aplicado el término de “Transición epidemiológica” ^(2,3).

En países como México, la transición epidemiológica genera un doble problema de salud pública y un grave problema social, además de un descontrol de los sistemas de salud que se ven enfrentados al impacto económico-social ^(1,3).

Hoy en día se buscan desesperadamente nuevas técnicas que permitan encontrar el origen de las enfermedades crónicas, responsables del mayor gasto en la salud ⁽¹⁾. Las enfermedades cardiovasculares tienen una etiología multifactorial con participación de factores genéticos y ambientales, por lo que la identificación de genes de susceptibilidad tiene relevancia para el desarrollo de nuevos tratamientos y la predicción del riesgo de enfermedad. Así, la estrategia ha sido analizar los polimorfismos presentes en genes candidatos que codifican

para proteínas importantes en el sistema homeostático encargado de mantener el buen funcionamiento del sistema cardiovascular. Se han reportado varios estudios en poblaciones caucásicas, asiáticas y africanas pero hay pocos datos en la población mexicana ⁽⁴⁾.

Por lo que se ha decidido estudiar el gen Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS); ya que es una enzima encargada de la producción de óxido nítrico (ON) en el organismo. El ON cumple una serie de funciones relacionadas con la homeostasis del sistema vascular, de ello se deduce que la reducción de la actividad de esta molécula constituye uno de los elementos claves en todos los procesos fisiopatológicos que culminan en las enfermedades cardiovasculares ⁽⁵⁾. Sin embargo, este gen no solamente se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares sino que también con enfermedades como cáncer de próstata ⁽⁶⁾, preclamsia ⁽⁷⁾, neumonía relacionada con la influenza AH1N1 ⁽⁸⁾, riesgo de osteonecrosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico ⁽⁹⁾, edema pulmonar de altura ⁽¹⁰⁾ entre muchas otras.

Por lo que realizar el estudio de los polimorfismos *eNOS-786 T>C* (rs2070744), *eNOS-1474 A>T* (rs1800783) y en el exón 7 *Glu298Asp* (rs1799983) es muy importante para tratar de establecer una correlación entre la presencia de alguno de sus alelos y la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la restenosis tras el implante de stent coronario en la población mexicana.

B. MARCO TEÓRICO

1. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis o más correctamente llamada enfermedad aterotrombótica es una enfermedad progresiva y multifactorial; que se desarrolla de forma característica focal (áreas de distribución o máxima turbulencia) y al mismo tiempo sistémico (cerebral, cardíaco, renal, aorta abdominal, miembros inferiores); es de índole genético, asociada al factor edad pero no necesariamente y casi siempre se debe a la actuación sinérgica de uno o más factores de riesgo cardiovascular (tabaquismo, hipertensión arterial, dislipidemia, diabetes y obesidad. Abarca un amplio espectro de eventos pro-inflamatorios y pro-trombóticos que afectan al endotelio, cuyo desarrollo ocurre a lo largo de 40 o 50 años iniciando en etapas tan tempranas como la infancia y adolescencia y suele estar muy avanzada cuando aparecen los síntomas. Se caracteriza por la acumulación de lípidos en las capas íntima y media arterial, acompañada de la proliferación de células musculares lisas que conducen a la formación de la placa aterosclerótica ^(11,12,13,14,15,16,17).

Reportes epidemiológicos en los Estados Unidos de América y países Europeos, así como, datos de la Secretaría de Salud de la República Mexicana brindan sólidas bases para afirmar que esta mortal enfermedad, permanecerá en un lugar predominante de entre los problemas de salud para las siguientes dos décadas ^(18,19,20).

La ateroescclerosis es la causa subyacente de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares como la enfermedad arterial coronaria, el síndrome isquémico coronario agudo, estenosis, entre otros, que a su vez causan la mayor parte de

las muertes en los países desarrollados, y en muchas regiones en vías de desarrollo⁽²¹⁾.

1.1. *DIAGNÓSTICO CLÍNICO*

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la aterosclerosis son: (22,23,24)

- La prueba de ejercicio: a pesar de que se suele considerar una técnica imprecisa en individuos asintomáticos.
- Índice de presión arterial tobillo/brazo (ITB): (sensibilidad ≈90% y especificidad ≈98%)
- Ecografía carotídea: Mediante esta técnica se obtienen imágenes nítidas de la pared arterial, sobre todo en la pared posterior de la carótida común, donde puede medirse con precisión el grosor del complejo íntima-media.
- Detección de calcio coronario por tomografía computarizada (TC): Estas técnicas son muy sensibles para la detección de calcificaciones en las arterias coronarias.
- Resonancia magnética: puede utilizarse a modo de coronariografía para detectar lesiones oclusivas coronarias en pacientes sintomáticos, no descarta que existan placas que ocluyen menos del 50% del lumen vascular.
- Estudio de la función endotelial: La técnica de estudio ecográfico de la función endotelial en la arteria braquial, que es la más ampliamente utilizada, evalúa los cambios de calibre del vaso ante dos tipos diferentes de estímulos: el aumento de flujo post-isquemia inducida por un torniquete, que libera óxido nítrico endógeno, relajante del músculo liso, y en condiciones normales causa una vasodilatación que es, por

definición, dependiente del endotelio, y la administración de nitroglicerina sublingual como donante exógeno de óxido nítrico, que produce una vasodilatación independiente del endotelio y refleja el funcionamiento del músculo liso arterial.

- Proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCR hs): a diferencia de la PCR convencional, un reactante de fase aguda que sólo aumenta en caso de inflamación importante, aguda o crónica, su determinación en suero se ha incorporado a la batería de factores de riesgo medidos en varios estudios prospectivos grandes, los cuales han confirmado su valor pronóstico, independiente y más allá de otros factores de riesgo, de la incidencia de enfermedad vascular aterosclerótica en individuos asintomáticos.
- Electrocardiograma (ECG) : (Fig 1)⁽²⁵⁾
- Ecocardiografía convencional
- Gammagrafía con talio y otras pruebas .Defectos de perfusión miocárdica de imagen de perfusión del miocardio
- Ecocardiografía transesofágica: identifica hallazgos de placas de ateroma en la aorta
- Ecografía abdominal: si hay aterosclerosis identifica un aneurisma aórtico
- Detectar marcadores inflamatorios: Moléculas de adhesión (molécula de adhesión intracelular 1 [ICAM-1], molécula de adhesión vascular 1 [VCAM-1], selectina-E, selectina P); citocinas (interleucinas 1, 6, 8 y 10 y factor de necrosis tumoral α [TNF- α]); reactantes de fase aguda:

fibrinógeno, amiloide A y proteína C reactiva; recuento leucocitario, troponina C, troponina I.

- Análisis sanguíneos: Recuento elevado de leucocitos, química sanguínea: triglicéridos, glucosa y colesterol (total, HDL, LDL).

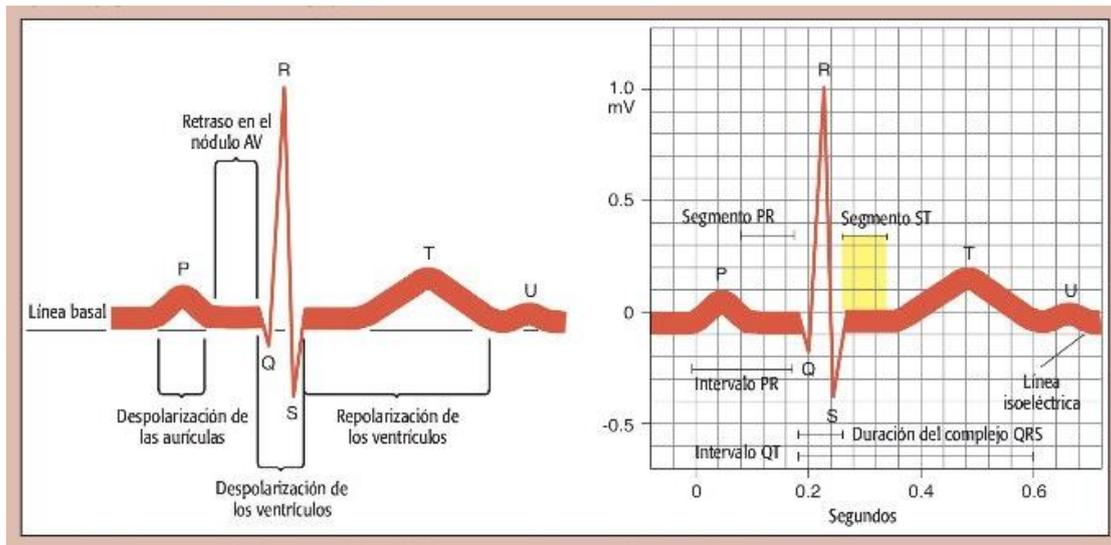


Fig. 1: Electrocardiograma normal ⁽²⁵⁾

2. SINDROME CORONARIO AGUDO (SCA)

El término síndrome coronario agudo (SCA) fue introducido en 1985 por Fuster para diferenciar los eventos fisiopatológicos específicos que distinguen la angina inestable y el infarto de miocardio de la enfermedad coronaria estable. ⁽²⁶⁾ Los síndromes coronarios se clasifican en estables e inestables. Los síndromes estables se caracterizan fisiopatológicamente por la existencia de un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno por parte del miocardio. Su traducción anatómica suele ser una placa ateromatosa significativa que condiciona un descenso de perfusión en una zona del miocardio. El flujo que llega a esta zona en condiciones de reposo es suficiente, mientras que al aumentar las demandas (por ejemplo durante el ejercicio físico) es insuficiente y

se produce un desequilibrio, con la consiguiente aparición de isquemia miocárdica y angina; y se encuentran los inestables o también llamados síndromes coronarios agudos (SCA) que incluyen la angina inestable, el infarto agudo de miocardio (IAM) sin elevación del segmento ST(no Q), el IAM con elevación del segmento ST(transmural o con onda Q) y la muerte súbita ⁽²⁷⁾.

El síndrome coronario agudo (SCA) es un término operacional especialmente útil en la evaluación de los pacientes con dolor torácico con el que se designa a cualquier conjunto de síntomas clínicos, compatibles con isquemia miocárdica aguda ⁽²⁶⁾.

El síntoma clásico asociado con SCA es disconfort o dolor en el tórax; sin embargo, los síntomas pueden incluir disconfort en otras áreas del tronco, náuseas, disnea, diaforesis, náusea, y mareo. Los síntomas del IAM son característicamente más intensos que los de la angina y duran más de 15 minutos. Es posible que se presenten síntomas atípicos en ancianos, mujeres y diabéticos ⁽²⁷⁾.

Para detectar SCA es necesario realizar diferentes estudios como:

- Hallazgos electrocardiográficos (Elevación del segmento ST, depresión isquémica del segmento ST >0.5 mm, un electrocardiograma normal o cambios no diagnósticos en el segmento ST o la onda T).([Fig_2](#)) ⁽²⁸⁾
- Marcadores séricos: Las Troponina I y T ya que son cardioespecíficas, mientras que la C carece de cardioespecificidad y de utilidad clínica.
- Niveles de Creatin fosfo cinasa fracción MB (CK-MB): Aunque no son específicos del miocardio, durante varias décadas los marcadores bioquímicos empleados para la confirmación del daño miocárdico fueron estos.

- PCR (Proteína C reactiva) de alta sensibilidad.
- Mioglobina: es el primer marcador que se eleva después del daño celular miocárdico.
- Péptido natriurético auricular (PAN): Es un nuevo biomarcador pertenece a la familia de las hormonas peptídicas y juega un rol fundamental en la homeostasis y las enfermedades cardiovasculares. El PAN es una prohormona almacenada en la aurícula, que es liberada en forma activa: PAN C- terminal y en forma inactiva: PAN N-terminal (NT-PAN), por lo cual es menos rápida de clarificar en la circulación y más estable que el PAN. Los niveles aumentados de NT-PAN están asociados proporcionalmente con tasas de mortalidad a largo y corto plazo ^(26,27,29).

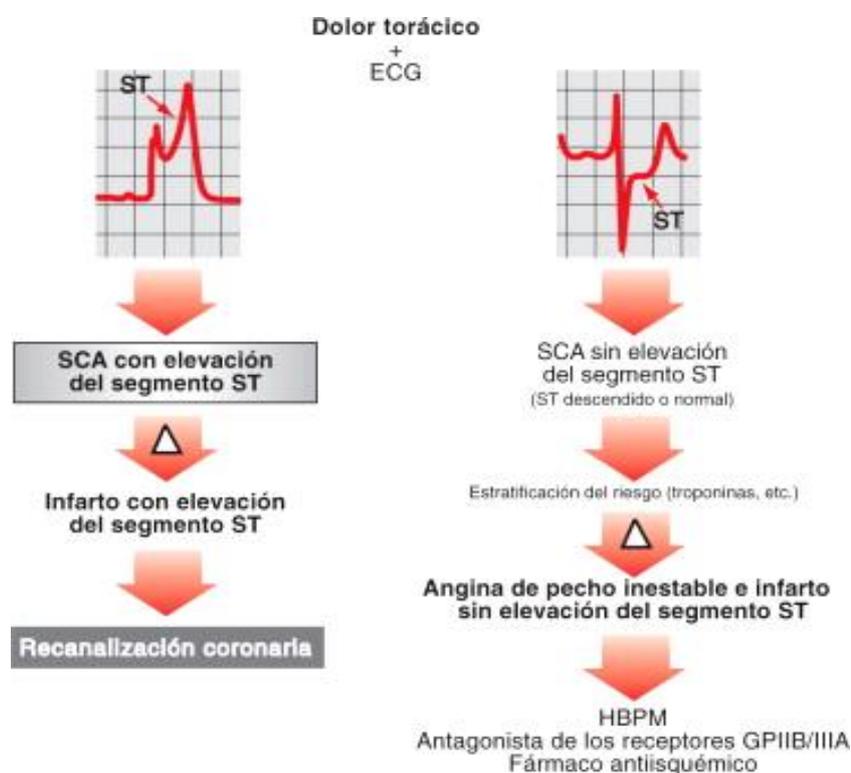


Fig. 2: Clasificación de los síndromes coronarios agudos (SCA). El electrocardiograma (ECG) permite distinguir de entrada entre los SCA con y sin elevación del segmento ST. HBPM: heparina de bajo peso molecular ⁽²⁸⁾.

2.1 FISIOPATOLOGÍA DE SCA

El proceso aterosclerótico consta de 3 etapas: Oxidación, inflamación y trombosis.

❖ OXIDACIÓN

El acontecimiento crítico en el inicio del proceso aterogénico es el depósito de lípidos en la pared vascular a partir de las lipoproteínas plasmáticas, especialmente las LDL (lipoproteínas de baja densidad) pequeñas y densas, las cuales son oxidadas por radicales libres en el espacio subendotelial. Los cuales son causados por el estrés oxidativo generado por el desbalance de óxido-reducción caracterizado por un aumento de las especies reactivas de oxígeno o ERO donde se incluyen radicales libres y compuestos no radicales libres derivados del oxígeno molecular, tales como el radical anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, entre otros, producto de la reducción incompleta del oxígeno en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria y/o de ciertas reacciones enzimáticas, estos productos no alcanzan a ser compensados por las defensas antioxidantes; por lo que esto ocurre principalmente en patologías degenerativas y/o procesos inflamatorios ^(30,31,32).

La LDL produce un engrosamiento del interior de la pared del vaso que sirve de mecanismo de defensa, reforzando estos lugares para que la arteria no se rompa y pueda soportar este flujo, sin embargo si entra más grasa de la que se necesita el LDL se oxida. La capacidad aterogénica de las LDL pequeñas y densas radica en que al ser partículas más pequeñas, con menor contenido lipídico, presentan una distribución espacial diferente de las LDL normales, hecho que impide su normal reconocimiento por los receptores B: E, permaneciendo más tiempo en circulación y aumentando su probabilidad de

ingresar a la pared vascular y ser oxidadas. Como consecuencia de la oxidación se producen cambios importantes en la estructura de la lipoproteína; a partir de ese momento la LDL deja de ser reconocida por los receptores B: E y pasa a ser internalizada por los macrófagos por medio de los receptores basurero o barredores (scavenger receptors), cuyo número aumenta por acción del M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) recientemente se ha descubierto otro receptor el LOX-1 (*Lectin-like Oxidized LDL receptor-1*) que existe en la superficie de estas células, jugando un importante papel en la activación endotelial ^(11,21,30). (Fig 3) ⁽¹²⁾

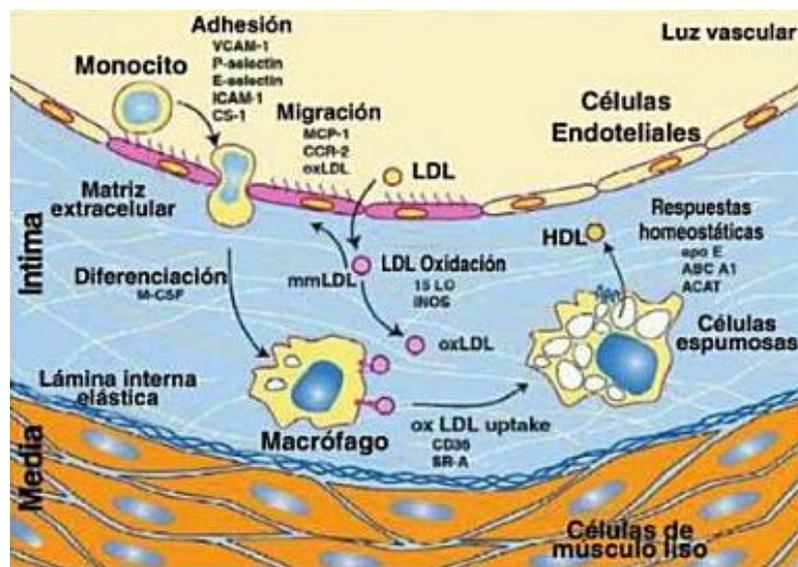


Fig. 3: Etapa de oxidación del proceso aterosclerótico ⁽¹²⁾.

❖ INFLAMACIÓN

Las células endoteliales activadas expresan una variedad de citocinas que tienen distintas acciones sobre los monocitos circulantes, así el aumento en la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) favorece la

fijación de los monocitos a la pared arterial, al ser atraídos por la secreción de la proteína-1 quimiotáctica de los monocitos (MCP-1), posteriormente penetran al espacio subendotelial, donde el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) estimula su proliferación y diferenciación en macrófagos.

Las LDL oxidadas no son degradadas con facilidad en los lisosomas, como lo es el LDL nativo, y tienden a acumularse en el citoplasma de los macrófagos, estos últimos producen citocinas que favorecen la proliferación de células musculares lisas y su migración de la media a la íntima como: interleucina- 1 (IL-1) que interviene en la activación celular, factor de crecimiento fibroblástico (FGF) que induce la síntesis proteica y la división celular, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) que estimulan la proliferación y migración celular, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor transformador de crecimiento tipo alfa (TGF-alfa), FGF y TNF-alfa que activan la proliferación y migración de las células hacia la íntima vascular

Los macrófagos son un primer mecanismo de defensa de la pared, y reciben la ayuda de otros factores como el HDL que colabora en la limpieza de este exceso de LDL oxidado; pero la sobrecarga de colesterol esterificado intracelular, forma inclusiones citoplasmáticas y da lugar a la formación de células espumosas, constituyéndose así las estrías grasas que pueden estar ya presentes en jóvenes e incluso en niños. Debido a que hay un exceso de LDL oxidado que los macrófagos no pueden eliminar, el sistema de limpieza queda sobrepasado y se llega a un desorden celular y los macrófagos llenos de colesterol sufren apoptosis. De tal manera que a partir de la estría grasa se forma la capa fibrosa.

Una vez activado el endotelio éste actúa sobre los linfocitos T, permitiendo su fijación a la pared vascular mediante las moléculas de adhesión ICAM-1 y selectina E, y su posterior penetración a la íntima por la secreción de factores quimiotácticos. Los linfocitos T en el ambiente subendotelial producen citocinas como M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y fundamentalmente interferón gamma (INF-gamma) que desempeñan importantes funciones en el proceso de formación de la placa aterogénica. En cuanto a las plaquetas ,estás se fijan a las células endoteliales segregando distintas citocinas entre las que se destaca el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que juega un papel importante en la proliferación y migración de las células musculares lisas hacia la íntima (11,21,33,34,35,36).

(Fig 4)⁽¹²⁾

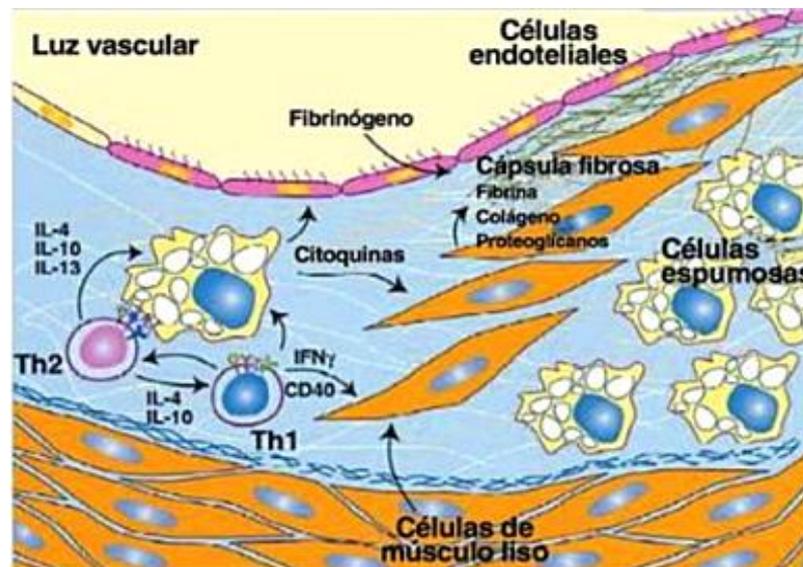


Fig. 4: Etapa de inflamación del proceso ateroesclerótico ⁽¹²⁾.

❖ TROMBOSIS

Al conjunto de macrófagos muertos, cargados de lípidos y a las células multinucleadas con restos de macrófagos y lípidos se le denomina *núcleo lipídico*. Este centro lipídico está rodeado por una capa de tejido conectivo que

se conoce como *cápsula fibrosa*. Esta placa se denomina *vulnerable*, ya que presenta riesgo de ruptura. Algunas características que hacen propensas las placas a las complicaciones trombóticas son las siguientes:

- Núcleo lipídico de mayor volumen
- Capa fibrosa delgada
- Bordes de la capa fibrosa con fuertes elementos inflamatorios: gran concentración de macrófagos activados, que secretan enzimas metaloproteinasas, que tienden a degradar el colágeno, y a hacer por lo tanto físicamente más débil a la placa.
- Factores de riesgo
- Fuerzas mecánicas de la sístole

La formación del trombo se presenta en cuatro estadios:

1. Adhesividad plaquetaria.
2. Activación del factor VII de coagulación.
3. Propagación del trombo.
4. Organización del trombo

Adhesividad plaquetaria: La ruptura de la placa o el daño al endotelio provocan la adherencia de las plaquetas. El principal receptor plaquetario es el denominado glicoproteína Ib-IX y se une al factor Von Willebrand en la pared arterial, este último sufre cambios en su superficie, con lo cual promueve la adhesión. Una vez depositadas las plaquetas, éstas se extienden para cubrir la mayor parte de la lesión liberando el contenido de los gránulos intracelulares, con lo cual contribuyen al inicio del proceso de la trombosis.

Activación del factor de coagulación: La lesión arterial expone el factor VII al *factor tisular*, este último estimula la actividad enzimática del factor VIIa para la

activación de factores IX y X. Al activar el factor X se generan pequeñas cantidades de trombina que activa los cofactores V y VIII, con lo cual se genera mayor cantidad de trombina; ésta a su vez es un agonista plaquetario muy potente que recluta más plaquetas al trombo.

Propagación del trombo: Se realiza cuando más plaquetas se incorporan a la masa creciente del trombo, se activa un segundo receptor denominado glicoproteína IIb/IIIa. Una vez que se activa une el fibrinógeno a la plaqueta manteniéndolos fuertemente unidos.

Organización del trombo: El desarrollo de un trombo es un balance entre dos fuerzas opuestas, una que promueve la propagación de éste y las fuerzas opuestas que lo rodean y disminuyen su tamaño. El resultado final dependerá de la magnitud de cada una de estas fuerzas ya sea provocando la oclusión total de la arteria, un trombo mural o la disolución del coágulo ^(11,12,21,37). ([Fig 5](#)) ⁽¹²⁾

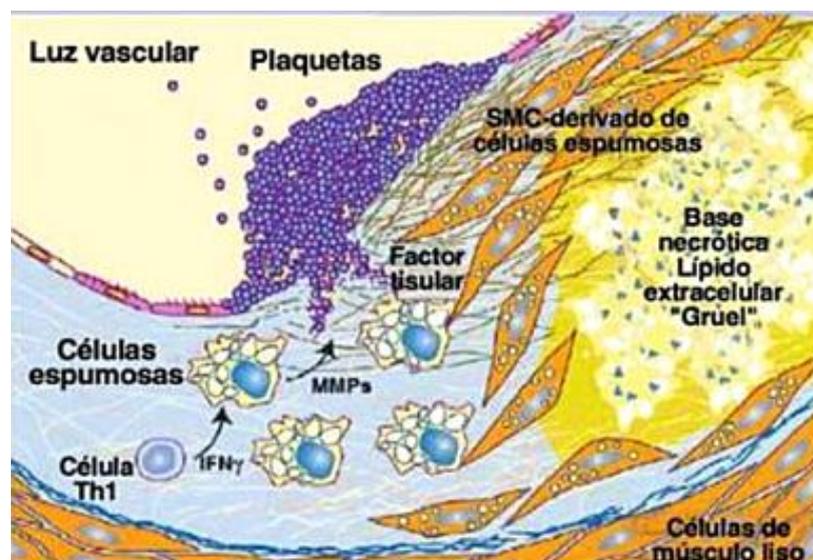


Fig. 5: Etapa de trombosis del proceso aterosclerótico ⁽¹²⁾.

2.2 EL ENDOTELIO Y DISFUNCIÓN

El endotelio vascular es una monocapa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos y juega un papel clave en la prevención de la aterosclerosis, pesa 1,8 kg y mide alrededor de 700 m², no solamente actúa como una barrera mecánica entre la sangre y el vaso arterial, sino también como una glándula autocrina, paracrina y endocrina. Este órgano de células planas es capaz de regular el tono arterial, la proliferación del músculo liso, la agregación plaquetaria, la adhesión de los monocitos, la regulación de la trombosis y fibrinólisis, homeostasis mediación de la inflamación y la producción de radicales libres. Las sustancias vasodilatadoras secretadas por el endotelio son: el óxido nítrico (ON), la prostaciclina, la bradicinina y el factor hiperpolarizante, mientras que las sustancias vasoconstrictoras de origen endotelial son: la endotelina 1, el tromboxano y la activación de la angiotensina II por la enzima convertidora que se expresa en la célula endotelial. De modo que la función del endotelio vascular juega un papel primordial no solo en la génesis de la aterosclerosis sino también en la hipertensión y la insuficiencia cardíaca ^(23,38,39).

Por lo mismo diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción del endotelio vascular resulta de la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico debido a la disminución de su formación o al incremento de su degradación, en ambos casos la formación elevada de superóxidos y el estrés oxidativo representan dos mecanismos importantes, que ocasionan daño en la íntima o una disfunción endotelial ^(32,38,39).

Hay no obstante, que tener en cuenta que cuando existe deterioro endotelial pueden además afectarse otras funciones de este tejido (Fig 6) ⁽⁵⁾, y puede facilitarse la interacción de las plaquetas y los leucocitos con la pared vascular, así como el crecimiento y la migración de las células musculares lisas ⁽⁴⁰⁾.

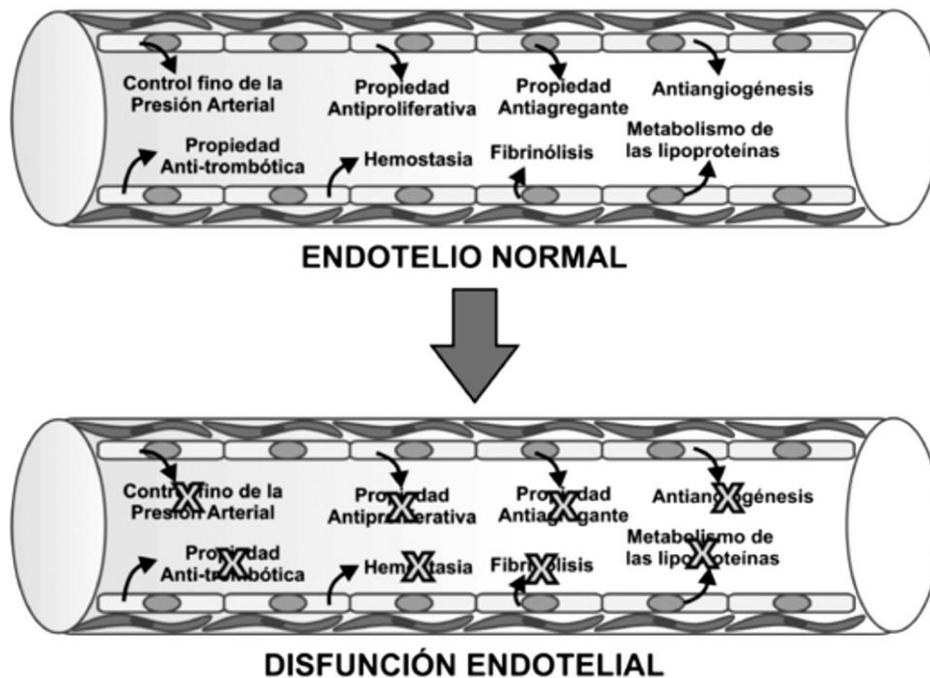


Fig. 6: Bajo condiciones patológicas se producen alteraciones en uno o más de los mecanismos de señalización molecular emitidos por el endotelio, lo cual es conocido como disfunción endotelial ⁽⁵⁾.

2.3 TRATAMIENTO

Debido a que la aterosclerosis ha ido en aumento durante los últimos años se han diseñado distintos métodos y técnicas para evitar un mayor número de muertes a nivel nacional como mundial; antes de finalizar la década de los 70's, las únicas opciones terapéuticas que podían ser ofrecidas a pacientes, eran el manejo clínico y la cirugía de revascularización miocárdica. En 1978 Gruentzig en Zurich, realizó por primera vez una angioplastia transluminal coronaria (ATC)

o también llamada angioplastia transluminal coronaria percutánea (PTCA) con balón ^(13,41).

Es un procedimiento de revascularización mínimamente invasivo utilizado como tratamiento a lesiones ateroscleróticas; esta técnica presentó un gran avance científico que fue ocupando progresivamente un espacio en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. A pesar de estos progresos significativos, la ATC exhibe 4 aspectos importantes que limitan el empleo del balón: morfologías de alta complejidad (que limitan una indicación más amplia de esta técnica); estenosis residuales mayores a 30% (que a pesar de significar éxito angiográfico tiene un impacto negativo en el pronóstico tardío); oclusión aguda del vaso arterial (incidencia 3-5% responsable de las mayores complicaciones de la técnica); y la re-estenosis coronaria la cual se retomará más adelante ^(42,43,44,45).

Durante los noventa las estrategias para el tratamiento de esta enfermedad se enfocaban básicamente en el bypass arterial coronario y la angioplastia coronaria percutánea transluminal. Con el propósito de optimizar los resultados surge la idea a finales de los noventa de utilizar como tratamiento los stent intracoronarios, que vinieron a revolucionar los métodos convencionales convirtiéndose en la mejor herramienta y grandes optimizadores de los resultados de la ATC para el tratamiento de este padecimiento. Pero la colocación de stents coronarios presentaba una alta incidencia de trombosis aguda y sub aguda (10%-25%); la primera tentativa para reducir estas complicaciones trombóticas fue la administración de anticoagulación sistémica (ácido acetilsalicílico –AAS–, warfarina/cumarínicos, dextran, dipiridamol y heparina), pero los resultados demostraron un aumento de las complicaciones vasculares. Por lo que se han diseñado stents liberadores de fármacos o Drug

Eluting Stents (DES) para evitar las complicaciones vasculares así como disminuir la tasa de re-estenosis ^(42,43,44,45,46).

En un inicio los stents fueron diseñados como estructuras de soporte (scaffolding), no como medios de liberación de drogas; la primera generación de estos stents fue aprobado en el 2003 por la FDA (Food and Drug Administration) ⁽⁴⁷⁾. Los stents liberadores de fármacos la rapamicina (sirolimus) y paclitaxel son los fármacos más utilizados y con los que se han obtenido mayores beneficios sin embargo hay antineoplásicos, inmunodepresores, inhibidores de la migración, cicatrizantes, etc ^(47,48).

Cuando aún y colocado un stent ya sea liberadores de fármaco o no, y se descubre que hay presencia de más del 50% del diámetro de estenosis en el segmento del stent, se confirma la presencia de re-estenosis, tradicionalmente la clasificación se basa en la longitud de la lesión, si es focal (<10mm) o difusa (>10mm) mediante una angiografía ([Fig 7](#)), además se puede clasificar la lesión en seis grupos (I-VI) de acuerdo al patrón y que tan desarrollada se encuentre

Patrón	Longitud	Subtipo y localización	Esquema
<i>Focal</i>	< 10mm	IA. Focal en articulación o en hueco en la arquitectura del stent.	
		IB. Focal en borde del stent (una sola localización).	
		IC. Focal en el cuerpo del stent.	
		ID. Multifocal en dos o más sitios del stent.	
<i>Difuso</i>	10mm	II. Difuso intrastent, sin salir de este.	
		III. Difuso proliferativo: abarca toda la longitud del stent y se extiende fuera de este.	
		IV. Difuso, oclusión total con flujo TIMI 0.	

Fig. 7: Clasificación de Mehran de la reestenosis intrastent de acuerdo con la extensión del proceso proliferativo ⁽¹⁰⁵⁾.

en relación con el vaso afectado ^(49,50).

Pero, se ha observado que entre un 12 y 30% de los pacientes con tratamiento de stent intracoronario desarrollan restenosis.

Se observa en más del 20% de los pacientes cuando se utilizan stents medicados desnudos y en menos del 10 % cuando se implantan stents medicados ^(42,43,44,45,46).

3 RESTENOSIS

La restenosis es un proceso complejo y multifactorial, considerada una manifestación vascular local que causa el estrechamiento del vaso sanguíneo en respuesta al daño mecánico o físico; que se inicia con la lesión causada por el balón u otro dispositivo percutáneo en la pared arterial al momento de la ATC ^(47,51,52,53).

Los factores implicados en la aparición de la restenosis son varios, dentro de ellos se encuentran: los clínicos (edad avanzada, sexo, presencia de angina estable e inestable, infarto agudo de miocardio, diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemia, obesidad y tabaquismo), factores angiográficos (arterias de poco diámetro, estenosis largas, uso de varios stents convencionales) y factores propios del procedimiento (menor diámetro al final de la ACTP, retroceso elástico, hiperplasia neointimal, trombo mural, entre otros). La mayor incidencia de restenosis se produce entre los primeros 3 y 6 meses, y este intervalo es el período de máxima vigilancia para diagnosticarla en pacientes asintomáticos. A pesar de que ha habido tantos avances en la biología vascular, farmacología y bioingeniería, la restenosis aun representa un problema significativo en la población ^(47,50,51,53).

3.1 FISIOPATOLOGÍA DE RESTENOSIS

La fisiopatología de la restenosis involucra eventos que son iniciados inmediatamente después del implante de un stent o una ACTP y consta de 4 fases o mecanismos: ([Fig 8](#))⁽⁴⁶⁾

Retracción elástica: Es la regresión de la pared vascular que ocurre en forma temprana como respuesta normal al estiramiento producido por el balón. La retracción elástica depende de características plásticas de la placa aterosclerótica y características elásticas de la pared arterial. Ocurre principalmente durante los 30 minutos después de la ATC.

Formación de trombo mural y respuesta inflamatoria: Inmediatamente después de la implantación del stent, hay denudación endotelial, que produce la pérdida de factores antitrombóticos derivados del endotelio (prostaglandina I₂, factor relajante derivado del endotelio, activador tisular del plasminógeno, etc.) lo que permite la adhesión y agregación plaquetaria, con la subsiguiente degranulación y liberación de sustancias procoagulantes, vasoconstrictoras y mitogénicas (PDGF, tromboxano A₂, serotonina, ADP, factor de Von Willebrand, fibronectina, factor V y fibrinógeno) y protooncogenes produciendo un incontable número de diversos factores de señalización celular iniciando una cascada de inflamación y realizando la adhesión de moléculas que causan la formación del trombo. En los próximos días o semanas, una variedad de glóbulos blancos se reúnen en el lugar del daño, secretan sus propios factores, y ejercen su propia influencia en la curación del tejido. La respuesta inflamatoria puede persistir por meses.

Proliferación neointimal: Es el resultado final de un proceso que comienza con el daño endotelial producido al inflar el balón de angioplastia en la íntima arterial al realizar la ATC el cual fractura la placa aterosclerótica, invocando la adhesión y

activación plaquetaria. La pérdida de la capa endotelial expone al colágeno subyacente al torrente sanguíneo y al contactar con los receptores de membrana de las plaquetas desencadenan los fenómenos de adherencia y agregación plaquetaria. Las plaquetas activadas liberan un factor de crecimiento que actúa en forma local sobre las células musculares lisas (CML) provocando su migración al trombo para actuar como un soporte, migrando desde la media a la íntima arterial en donde comienza la proliferación. Existen otros factores liberados por el endotelio lesionado por lo que se activa y expresa una serie de moléculas de adhesión (ICAM-1, E-selectina, P-selectina y VCAM-1) que a su vez activan las células musculares lisas, además los macrófagos atraídos a la zona de angioplastia como parte de la respuesta inflamatoria. Eso constituye un fuerte estímulo para la proliferación de CML, las células musculares lisas comienzan a aumentar la síntesis de DNA y cambiar su habitual fenotipo contráctil por uno proliferativo–secretor de proteoglicanos y dan lugar a una síntesis excesiva de matriz extracelular, que resulta en un incremento de la masa neointimal (hiperplasia). En forma concomitante, y a partir de los bordes laterales de la lesión comienzan a migrar y proliferar las células endoteliales sanas, con el fin de recubrir la lesión porque éstas inhiben el crecimiento de las CML a través de la producción de óxido nítrico; finalmente, las células musculares lisas se transforman en secretoras. La hiperplasia neointimal es incluso más pronunciada con la implantación de varios *stents*. Este proceso de reendotelización es el único que puede poner fin a la proliferación de CML, mediante el factor inhibidor de la mitogénesis.

Alteraciones geométricas o remodelamiento crónico: El mecanismo final responsable de la restenosis es el remodelamiento tardío del vaso. Durante los

primeros meses siguientes a la angioplastia, la neointima se expande, y el volumen adicional comprende CML y matriz extracelular. La acumulación de fibras de colágeno incrementa el volumen de matriz extracelular mientras en paralelo se reduce la degradación de colágeno en la matriz extracelular contribuyendo a la mayor presencia de colágeno en la matriz. El remodelamiento inadecuado de la pared arterial con cicatrización y constricción de la adventicia desempeña un papel en la pérdida del diámetro luminal, esto produce una capa neointimal. Este remodelado es bidireccional, con una reducción posterior en el área de corte transversal de la membrana elástica externa (entre 1 y 6 meses). Son descritos el remodelamiento positivo (“efecto Glagov”: placas grandes que no invaden la luz arterial) que puede ocurrir después de la angioplastia y el negativo que puede contribuir a la restenosis que produce la compresión del *stent*; estos son básicamente el incremento o reducción del diámetro de la arteria coronaria en el sitio tratado comparado en relación con un segmento de referencia del vaso. Adicionalmente, es evidente la reendotelización de segmentos parciales de la superficie del vaso lesionado (46,50,51,52,53,54,55,56).



Fig. 8: Mecanismos de Restenosis (46).

4 ÓXIDO NÍTRICO (ON)

En los primeros estudios realizados en 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron la necesaria presencia del endotelio vascular para producir relajación de un anillo de aorta torácica de conejo inducida por la acetilcolina, y concluyeron que ésta la producía una sustancia difusible liberada por el endotelio, que se denominó *endothelium derived relaxing factor* o factor relajante derivado del endotelio (EDRF) ⁽⁵⁷⁾.

En 1987 Palmer, Ferridge & Moncada identificaron al EDRF como óxido nítrico (ON), al comparar las características farmacológicas de ambos, y seguidamente determinaron que el aminoácido L-arginina es el precursor biosintético del óxido nítrico (Palmer, Ashton & Moncada, 1988), motivo por el que se escogió como la molécula del año en 1992 por la revista *Science*. A partir de estos trabajos y en los últimos años se han señalado nuevas funciones del ON en procesos fisiológicos y fisiopatológicos del organismo y las consecuencias para la salud ^(57,58,59).

El óxido nítrico (ON) es un gas de vida media corta con elevada capacidad de difusión, que va desde las células endoteliales hasta las células de músculo liso de la pared vascular, que actúa como factor relajante e interviene en numerosas vías metabólicas; es un radical libre diatómico debido a que su electrón no apareado es inestable y en presencia de oxígeno y agua se oxida a nitrito y nitrato; el ON ejerce múltiples efectos sobre la función cardíaca a través de acciones directas e indirectas sobre los cardiomiocitos ^(60,61).

Además de que el ON ejerce regulación en la vasodilatación, tiene otro tipo de funciones: regula la expresión de células musculares lisas vasculares, tiene un efecto antiagregante plaquetario, contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared arterial y evita la adhesión leucocitaria local ^(58,60).

4.1 BIOSÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO

El ON es un producto de la ruta metabólica denominada “vía de la L-arginina→ óxido nítrico”, en la que interviene una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS, por sus siglas en inglés) estas son capaces de incorporar oxígeno molecular en dos pasos consecutivos ([Fig 9](#)). Además se requiere la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavinmononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) además de Akt (proteincinasa B) para fosforilar y activar a la NOS ^(57,58,59,61,62,63,64). Estos cofactores son necesarios para el transporte de electrones de la óxido-reducción que ocurre entre el oxígeno molecular y la L-arginina, además de que tiene una elevada afinidad por el hierro del grupo hemo y por tanto reacciona con hemoproteínas como la guanilato ciclasa (GCS) ⁽⁵⁹⁾.

El donador de electrones es el NADPH que cede dos electrones al FAD, el cual, a su vez, reduce el FMN, este último reduce el grupo prostético ferrohemo a su forma ferrosa, a la cual se puede unir ahora el oxígeno para oxigenar el sustrato L-arginina. La reacción global se inhibe por monóxido de carbono y la actividad es completamente dependiente de calmodulina y calcio para las isoformas neuronal y endotelial ^(61,62,63).

De esta forma, el óxido nítrico así generado es transferido desde la célula generadora (célula endotelial) a una célula efectora (célula de músculo liso adyacente), en donde se une principalmente al grupo hemo y activa a la enzima guanilato ciclasa (GCS) una enzima soluble que provoca el aumento intracelular de GMPc a partir de GTP, mediador de los efectos fisiológicos produciendo vasodilatación ^(57,58,60,64,65).

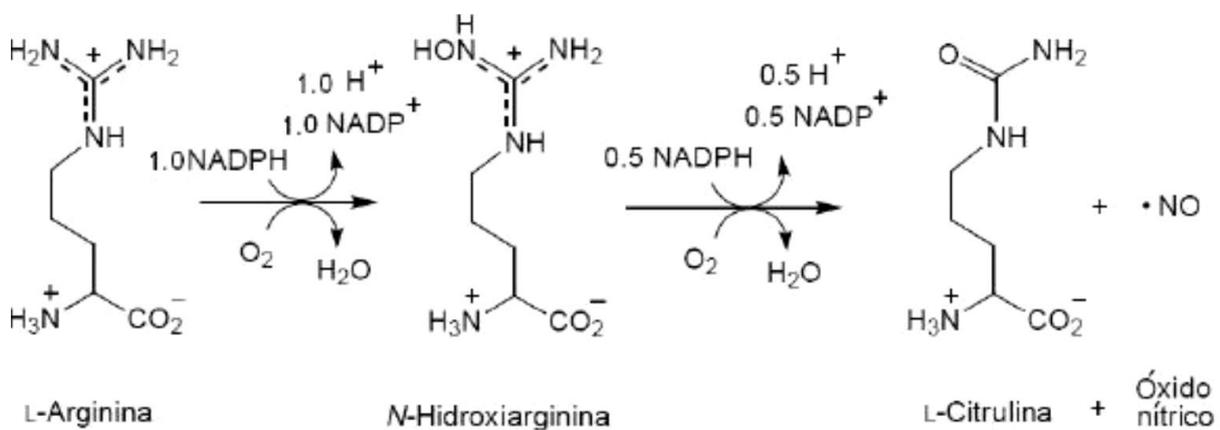


Fig. 9: Reacción general catalizada por la NOS: Formación de ON en dos pasos consecutivos ⁽⁶²⁾.

El ON es capaz de reaccionar con especies reactivas de oxígeno (ERO): como el anión superóxido formando peroxinitrilo (el peroxinitrilo es altamente reactivo) o con macromoléculas plasmáticas que contienen grupos sulfhidrilo, al igual que cuando las concentraciones de L-arginina no son las adecuadas para el metabolismo, esto ocurre debido a un importante incremento en la generación de radicales libres en prácticamente todas las enfermedades que cursan con disfunción endotelial ^(58,62,66). ([Fig 10](#))

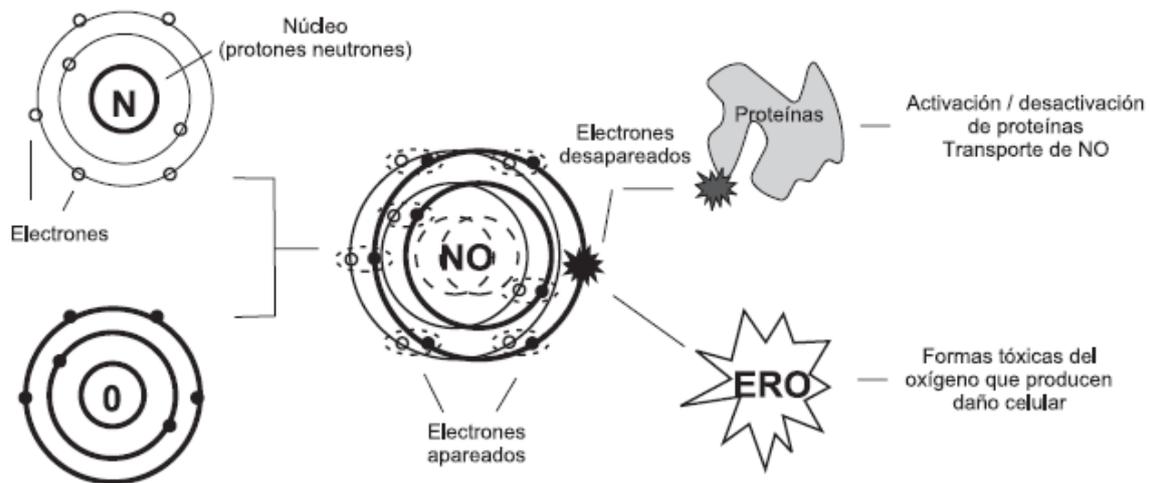


Fig. 10: La molécula de Óxido Nítrico (ON) posee un electrón desapareado, el cual interactúa rápidamente con otras moléculas que también tienen electrones desapareados, tales como las proteínas o las especies reactivas del oxígeno (ERO) ⁽¹⁰⁶⁾.

4.2 ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS)

Recientemente se ha clasificado a la NOS en cuatro isoformas: ^(57,58,59,60,61,62,63,67)

- **Endotelial** (*eNOS, NOS tipo III, NOS-3 o ecNOS*): Isoforma constitutiva calcio-dependiente del endotelio, responsable de la formación habitual de ON al actuar como señalizador molecular al igual que la nNOS. La eNOS y la nNOS producen pequeñas cantidades de ON (pmoles) y por cortos periodos de tiempo (segundos a minutos), se activan por el complejo Ca^{++} -calmodulina ($Ca^{++}M$). La velocidad de producción de ON es de 16 nmol/s, tiene una masa molecular de 135 kDa y se expresa en el endotelio vascular y endocárdico, así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas. [\(Fig 11\)](#) ⁽⁶⁸⁾
- **Inducible** (*iNOS, NOS tipo II, NOS-2, macNOS o hepNOS*): Isoforma calcio-independiente se puede inducir tanto en el endotelio como en otras células de la pared vascular, macrófagos, etc. En situaciones inflamatorias o inmunológicas es estimulada, principalmente, por el factor

de necrosis tumoral (TNF) y diferentes interleucinas. Produce ON por periodos largos de tiempo (horas) y en grandes cantidades (nmoles). La velocidad de producción de ON es de 105 mmol/s y su masa molecular es de 125-130 kDa.

- Neuronal (nNOS, NOS tipo I, NOS-1, bNOS o ncNOS): Es una isoforma constitutiva calcio dependiente; presente en el cerebro. La velocidad de producción de ON es de 96 nmol/s y su masa molecular de 160 kDa
- Mitocondrial (NOSmt): Localizada en la mitocondria, la cual se ha sugerido es una modificación postraduccional de la nNOS. Cuenta con una masa molecular de 127 kDa.

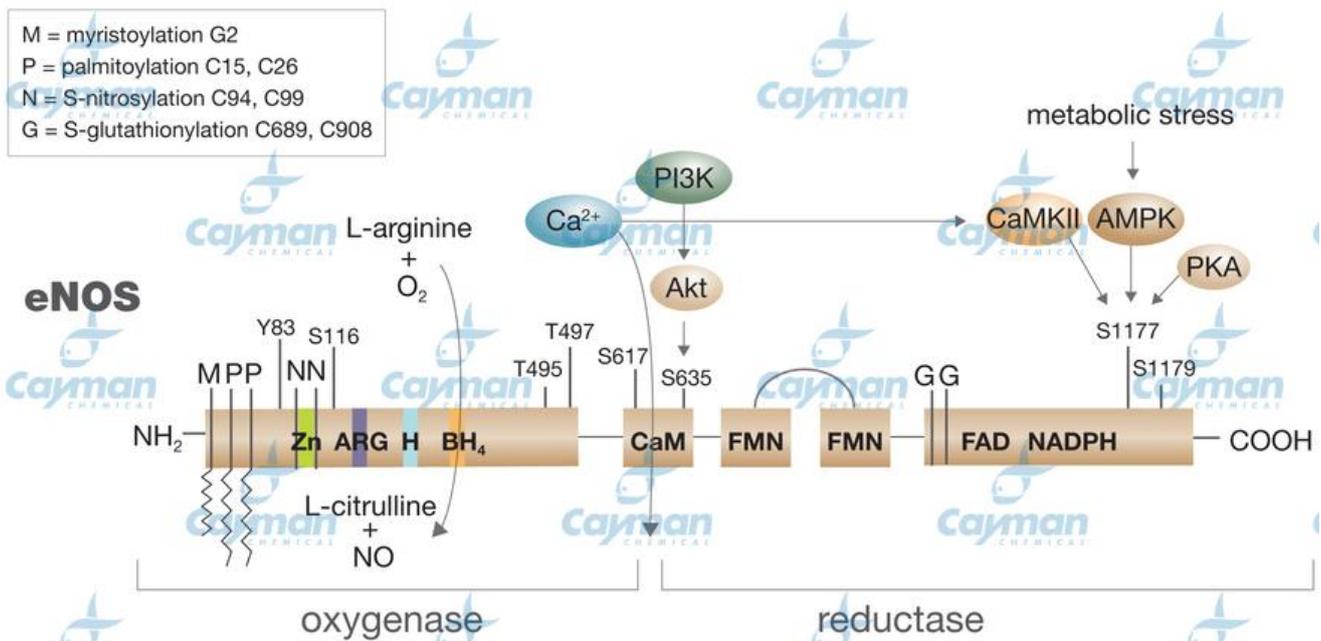


Fig. 11: Estructura de la enzima eNOS. Tomada de <https://www.caymanchem.com>⁽⁶⁸⁾.

5 GEN DEL ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (eNOS)

El gen eNOS contiene 26 exones que abarcan aproximadamente 21 kb de DNA genómico que se localiza en el cromosoma 7q35-q36 ([Fig 12](#)); es la principal enzima que sintetiza ON en las células endoteliales; esta molécula juega un papel fundamental en la regulación del endotelio. Como se mencionó anteriormente, la eNOS tiene un papel crucial en la regulación y función del endotelio vascular, debido a que participa en la vasodilatación, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de leucocitos al endotelio, así como la proliferación y migración de células de músculo liso ⁽⁶⁹⁾. Estudios previos han demostrado que la baja expresión del gen de la eNOS y su baja actividad enzimática, incrementan la contracción vascular por vasoconstrictores como la endotelina-1, tromboxanos y serotonina, intensificando la permeabilidad vascular, la formación de trombos exacerbando la proliferación y migración de células músculo liso vascular en eventos ateroscleróticos, hipertensión y trombosis ^(70,71,72,73). Así mismo, estudios *in vitro* de células endoteliales de arteria coronaria obtenidas de humano han demostrado que hay una significativa disminución de la expresión del gen eNOS en pacientes con aterosclerosis ^(74,75). Por otro lado, estudios experimentales y clínicos, han demostrado que las LDLox, el TNF-alfa entre otros estímulos aterogénicos suprimen la expresión del gen eNOS ^(76,77,78,79,80,81). No obstante también proveen evidencia de que la eNOS no solo se asocia con la disfunción endotelial, sino también tiene un papel muy importante en la progresión de la aterosclerosis ^(67,69).

Existe un inhibidor competitivo endógeno de la eNOS descubierto en 1992 en pacientes con insuficiencia renal, denominado dimetilarginina asimétrica (ADMA) (los dos metilos están unidos a un solo nitrógeno del grupo guanido) y se

encuentra aumentado en estas condiciones y en otras situaciones patológicas como la hipercolesterolemia, la aterosclerosis y la hipertensión arterial ⁽⁸²⁾; debido a todo lo mencionado anteriormente se ha relacionado al gen eNOS en diversos estudios realizados con la susceptibilidad de padecer ciertas enfermedades como: Alzheimer de inicio tardío, espasmo de la arteria coronaria, hipertensión, hipertensión inducida por el embarazo, ictus isquémico y desprendimiento de la placenta ⁽⁸³⁾.

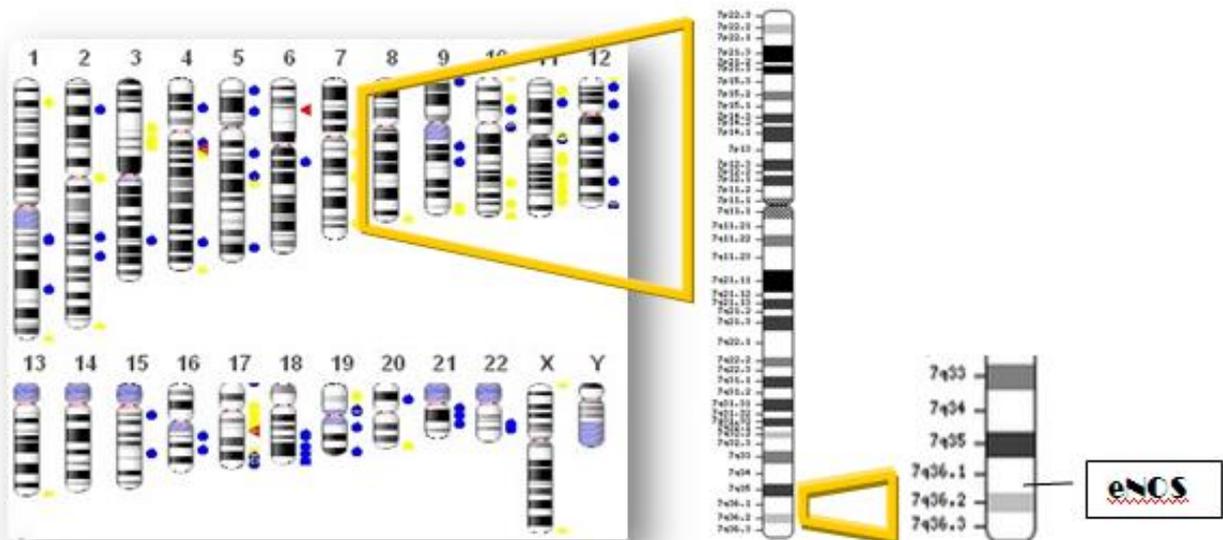


Fig. 12: Localización del gen eNOS.

5.1 POLIMORFISMOS

Varios estudios han demostrado la existencia de sitios polimórficos, en este caso se analizaron SNPs (single nucleotide polymorphisms) en el brazo largo del cromosoma 7; aquellos que se encuentran en la región promotora pueden influir en la transcripción del mRNA y reducir la expresión génica; dentro de los cuales

destaca el -786 T/C (rs2070744), en donde existe un cambio de base de una timina por una citocina el cual afecta la transcripción del gen y se ha demostrado que se asocia fuertemente con angina espástica, cáncer de vejiga, psoriasis, infarto al miocardio y espasmo coronario. El polimorfismo -1474 T/A (rs1800783) presenta un cambio de base de timina por adenina e influye en la actividad transcripcional *in vitro*, lo que se ha relacionado con espasmo arterial coronario, nefropatías y enfermedad arterial coronaria; en cuanto a la región codificante, el polimorfismo situado en el exón 7 Glu298Asp o 894 T/G (rs1799983) el cual presenta un cambio de aminoácido, de ácido glutámico por ácido aspártico, el cual puede influir con respecto a la alteración funcional de la enzima eNOS, se asoció significativamente con alzheimer de aparición tardía, hipertensión en el embarazo y astenoszoospermia también asociaron este polimorfismo significativamente con accidente cerebrovascular isquémico, independientemente de la edad, el sexo, la hipertensión, la diabetes y la hipercolesterolemia (67,84,85,86,87). (Fig 13)

ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL (E_{ncs})

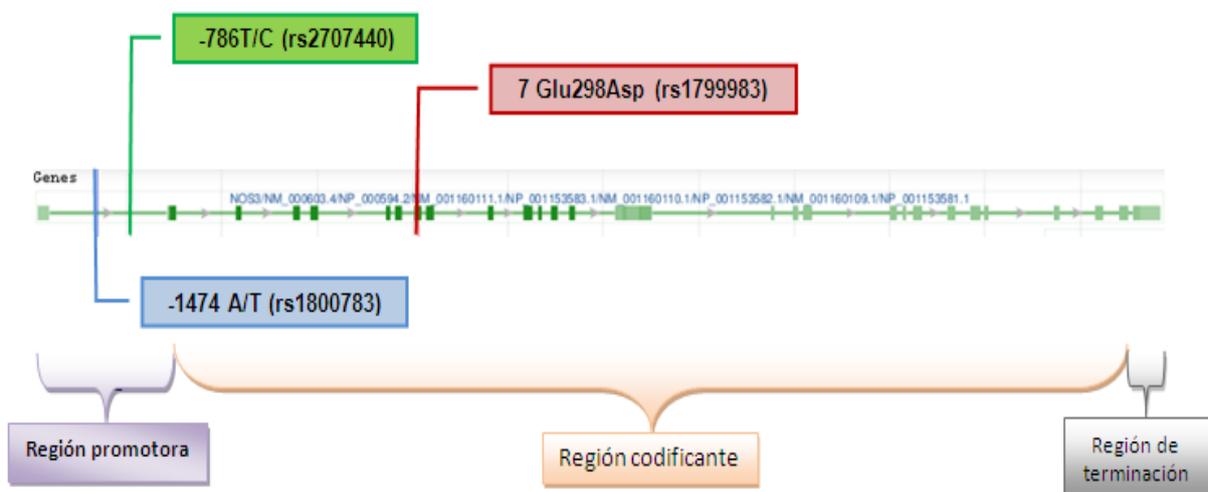


Fig. 13: Localización de los polimorfismos -786 T/C, -1474 A/T y en el exón 7 Glu298Asp dentro del gen eNOS.

C. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La restenosis es una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial y sigue siendo el problema más importante de intervencionismo coronario incluso en la era del stent. Datos en poblaciones caucásicas registran que entre el 12 y el 30% de los pacientes que reciben un stent intracoronario desarrollan restenosis. Este padecimiento es de origen multifactorial, es decir en su desencadenamiento participan tanto factores genéticos como ambientales.

El estudio de los polimorfismos presentes en el gen que codifica para la molécula relevante en endotelio vascular, será de mucha importancia para definir si este puede ser un marcador de susceptibilidad y/o resistencia en el desarrollo de la restenosis tras el implante de un stent coronario y en un futuro permitir mejores y más dirigidos tratamientos. En este proyecto de investigación se estudiaron algunos polimorfismos previamente reportados y otros que no han sido reportados o asociados a este padecimiento que tiene un efecto importante en la expresión y/o función de dicho gen, con la finalidad de identificar si uno o más sitios polimórficos presentes en el gen de estudio participa en la susceptibilidad a desarrollar restenosis en la población mexicana. Por otro lado, el identificar uno o más sitios polimórficos en un mismo gen permitió construir haplotipos y se identificó si estos haplotipos tuvieron un efecto en la susceptibilidad al desarrollo de esta patología en la población mexicana.

Pregunta de investigación: ¿Están los polimorfismos del gen eNOS asociados con el desarrollo de restenosis en pacientes tras el implante de un stent coronario?

D. HIPÓTESIS

Si la molécula codificada por el gen *eNOS* regula el endotelio que conlleva al desarrollo de la placa aterosclerótica y por tanto a la restenosis y sus genes presentan sitios polimórficos que regulan su producción y/o función, algunos de sus alelos podrían diferenciar a los pacientes de los individuos control y ser por tanto marcadores de susceptibilidad y/o resistencia para este padecimiento en la población mexicana.

E. OBJETIVO

Determinar el papel de los polimorfismos -786 T/C (rs2070744), -1474 T/A (rs1800783) y en el exón 7 Glu298Asp (rs1799983) presentes en el gen *eNOS* en la susceptibilidad y/o resistencia al desarrollo de la restenosis tras el implante de stent coronario en la población mexicana.

F. MÉTODOLOGÍA

1. DISEÑO

Tipo de estudio: Clínico experimental, de cohorte y prospectivo.

2. UNIVERSO

Población de estudio: 223 pacientes mexicanos hombres y mujeres a quienes se les implantó un stent coronario en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y que se tenga un seguimiento de control angiográfico al menos 6 meses después de su intervención. El grupo incluyó pacientes con y sin restenosis.

Se realizaron los angiogramas del intervencionismo y control que determinaron la presencia de restenosis, realizado por dos médicos adjuntos al servicio de hemodinámica del instituto, que no hayan participado en los cateterismos del enfermo.

Definición operacional: Restenosis intrastent.- se define como una estenosis del 50% o mayor por estimación visual intrastent o dentro de los 5 mm proximales o distales de los bordes del stent.

Crterios de inclusión:

- 1.- Pacientes mexicanos que sean mayores a 30 años de edad.
- 2.- Antecedente de colocación de al menos un stent en el Instituto Nacional de Cardiología" Ignacio Chávez".
- 3.- Realización de coronariografía de control al menos 6 meses después de la intervención.
- 4.- Localización del expediente y de los angiogramas coronarios.

Criterios de exclusión:

- 1.- No reunir los criterios anteriores.
- 2.- Incapacidad de comparación de las coronariografías.

3. VARIABLES

Independientes:

- Polimorfismos presentes en el gen eNOS
 - -786 T/C (rs2070744)
 - -1474 T/A (rs1800783)
 - En el exón 7 Glu298Asp (rs1799983)

Dependientes:

- Pacientes que desarrollaron restenosis.
- Pacientes que no desarrollaron restenosis.

Intervinientes:

- Se evaluaron las variables demográficas como género, hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia y el hábito de fumar entre otros factores de riesgo que influyeron en el desarrollo de la restenosis.
- Se evaluó la patología por la cual el paciente ingresó a la institución como: angina inestable, infarto agudo al miocardio, aterosclerosis entre otras; además se evaluó si el paciente estuvo bajo el tratamiento de algún fármaco.

4. TÉCNICAS

Extracción de ADN

Se tomaron 5 mL de sangre periférica de cada individuo en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el DNA genómico por medio de técnica de expulsión salina ⁽⁸⁸⁾.

Cuantificación de DNA

Se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), la longitud de onda con la que se leyó el DNA fue de 260 nm.

Ajuste de concentración de DNA

Todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de 10 ng/μL para ser utilizadas en el equipo Fast Real-Time 7900.

Determinación de los polimorfismos por PCR en tiempo real

Todos los polimorfismos fueron determinados por PCR en tiempo real en el equipo Fast Real-Time 7900 de la casa comercial Applied Biosystems. Para tal efecto, cada muestra de DNA genómico fue amplificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando ensayos TaqMan que cubren la región donde se localiza el polimorfismo diseñados por la misma casa comercial como se muestra en la tabla.

SNPs	Primers[VIC/FAM]	Alelo ancestral
rs1799983	CCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA[G/T]CCCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC	G
rs2070744	CCAGGGCATCAAGCTCTCCCTGGC[C/T]GGCTGACCCTGCCTCAGCCCTAGTC	C
rs1800783	GCTTAATATGGAAGCCAGACTTGGG[A/T]TCTGTTGTCTCCTCCAGCATGGTAG	A

Tabla 1.- Primers utilizados para cada SNP en donde se muestra cual está marcada como VIC /FAM en PCR en tiempo real.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de la molécula (eNOS) analizadas se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de Chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de X^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO (V. 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). El valor de p se manejó con un nivel de significancia establecido como $p < 0.05$. El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf (89). Las variables demográficas fueron evaluadas utilizando la prueba de Chi-cuadrada para obtener un estimador ajustado por los estratos considerados en el análisis. El ajuste de riesgo considerando las variables demográficas presentes en la restenosis se realizó con regresión logística por medio del programa SNPStat's (bioinfo.iconcologia.net/SNPstats). El análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento se realizó utilizando el programa Haploview 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

G. RESULTADOS

En el presente estudio se analizaron un total de 223 pacientes, 86 con restenosis y 137 sin restenosis. Las características de la población, así como los factores de riesgo pertenecientes a nuestro análisis se muestran en la tabla 2. Sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio.

Tabla 2.-Características demográficas de pacientes con y sin restenosis.

FACTORES DE RIESGO	CON RESTENOSIS (n=86) N (%)	SIN RESTENOSIS (n=137) N (%)	p
Edad	61.3 ± 9.8	59.3 ± 10.4	0.15
Género	Femenino 16(18.6) Masculino 70(81.4)	Femenino 32(23.4) Masculino 105(76.6)	0.40
Intervencionismo Previo(IP)	9(10)	15(11)	0.91
Cirugía de Revascularización Cardíaca Previa (CRCP)	7(8)	8(6)	0.51
Antecedentes de Diabetes Mellitus (ADM)	34(40)	50(36)	0.65
Hipertensión Arterial Sistémica(HAS)	53(62)	76(55)	0.37
Hipercolesterolemia	47(55)	83(61)	0.38
Tabaquismo	52(60)	89(65)	0.50
Insuficiencia Renal Crónica(IRC)	6(7)	6(4)	0.29
Infarto Agudo al Miocardio(IAM)	28(33)	45(33)	0.96
Angina Inestable(AI)	28(33)	37(27)	0.38
Angina Estable(AE)	13(15)	30(22)	0.21
Isquemia Silente(IS)	9(10)	12(9)	0.67
Síndrome Isquémico Coronario Agudo(SICA)	55(64)	89(65)	0.88
Uso de aspirina en cateterismo control	81(94)	132(96)	0.33
Uso de betabloqueadores	66(77)	110(80)	0.53

Las frecuencias observadas en los tres sitios polimórficos Glu298Asp, -786T/C y -1474T/A del gen eNOS, se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en cada uno de los grupos de estudio. Por otra parte, la distribución genética como puede observarse fue similar entre pacientes con y sin restenosis (Véase Tabla 3).

Tabla 3.-Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos (Glu298Asp,-786T/C y -1474T/A) del gen eNOS en pacientes con y sin restenosis.

GEN/ SNP	CON RESTENOSIS		SIN RESTENOSIS		p	OR (95% IC)	
	N	%	N	%			
eNOS Glu298Asp	Genotipo	86		137			
	GG	52	60%	86	63%	0.73	0.91(0.50-1.64)
	GT	27	31%	44	32%	0.91	0.97(0.52-1.80)
	TT	7	8%	7	5%	0.36	1.65(0.50-5.46)
	Alelo	172		274			
	G	131	76%	216	79%	0.51	0.86(0.53-1.39)
	T	41	24%	58	21%	0.51	1.17(0.72-1.88)
eNOS - 786T/C	Genotipo	86		137			
	T/T	44	51%	77	56%	0.46	0.82 (0.46-1.45)
	T/C	34	40%	51	37%	0.73	1.10 (0.61-1.99)
	C/C	8	9%	9	7%	0.46	1.46(0.49-4.34)
	Alelo	172		274			
	T	122	71%	205	75%	0.37	0.82 (0.52-1.29)
	C	50	29%	69	25%	0.37	1.22(0.78-1.91)
eNOS - 1474T/A	Genotipo	86		137			
	TT	39	45%	76	55%	0.14	0.67(0.37-1.19)
	TA	43	50%	52	38%	0.08	1.63(0.91-2.93)
	AA	4	5%	9	7%	0.55	0.79(0.34-1.81)
	Alelos	172		274			
	T	121	70%	204	74%	0.34	0.81(0.52-1.27)
	A	51	30%	70	26%	0.34	1.23(0.79-1.92)

Posteriormente se elaboró el análisis de riesgo estimado por medio de cinco modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, heterocigoto y aditivo) ajustado por los factores de riesgo y características de la población (edad, género, IP, CRCP, ADM, HAS, hipocolesterolemia, tabaquismo, IRC, IAM, AI, AE, IS, SICA, Uso de aspirina en el cateterismo control y uso de betabloqueadores).

Los resultados mostraron que los individuos con el polimorfismo -1474 T/A, con el genotipo T/A bajo el modelo heterocigoto, decrecen el riesgo de desarrollar restenosis tras el implante de un stent (RM=0.51 y $p= 0.028$) como se observa en la tabla 4.

Tabla 4 .- Modelo de herencia ajustado del polimorfismo -1474 T/A del gen eNOS.

MODELO	GENOTIPO	RM (95% IC)	P
Codominante	T/T	1.00	
T/T	T/A	0.52(0.28-0.96)	0.086
T/A	A/A	1.15(0.31-4.21)	
A/A			
Dominante	T/T	1.00	
T/T, T/A - A/A	T/A-A/A	0.57(0.31-1.04)	0.066
Recesivo	T/T-T/A	1.00	
T/T - T/A, A/A	A/A	1.57(0.45-5.55)	0.47
Heterocigoto*	T/T-A/A	1.00	
T/T - A/A, T/A	T/A	0.51(0.28-0.93)	0.028
Aditivo	---	0.74(0.46-1.21)	0.23

Sin embargo, no fue posible hacer este análisis en los sitios polimórficos [Glu298Asp (rs1799983) y -786 T/C (rs2070744)] debido a que no se ajustan por todas las variables. No obstante, se realizó un análisis univariado para los sitios polimórficos Glu298Asp y -786 T/C, para establecer la relación de susceptibilidad o protección al desarrollo de la restenosis correlacionando por cada una de las

variables de riesgo, dicho análisis mostró que bajo el modelo heterocigoto los individuos con el genotipo G/T del polimorfismo Glu298Asp y que tuvieron un intervencionismo previo decrecen el riesgo de desarrollar restenosis (RM=0.14 y una $p=0.02$). De manera similar, los pacientes con el polimorfismo -786 T/C que presentaron los genotipos T/C + C/C bajo el modelo dominante que presentaron angina inestable decrecen el riesgo de desarrollar restenosis (RM=0.32 a una $p=0.039$). No obstante, los individuos bajo el mismo modelo pero que presentan infarto agudo al miocardio incrementan el riesgo de desarrollar restenosis (RM=1.88 a una $p=0.037$).

Por otro lado, el análisis de desequilibrio de ligamiento mostró que los polimorfismos -1474 T/A y -786 T/C, tuvieron un moderado desequilibrio de ligamiento a una $D' = 76$, como se muestra en la Fig. 14. No obstante el análisis de haplotipos no muestra asociación estadísticamente significativa en los grupos de estudio. (Tabla 5)

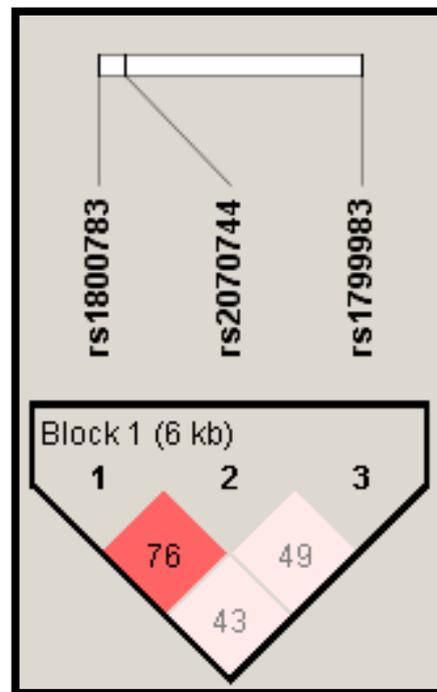


Fig. 14.-Desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos Glu298Asp, -786 T/C y -1474 T/A. Tomada del programa Haploview versión 4.1.

Tabla 5.-Análisis de haplotipos del gen eNOS en pacientes con y sin restenosis.

Haplotipo	Con Restenosis n=86	Sin Restenosis n=137	p
TTG	0.569	0.635	0.1609
ACT	0.125	0.122	0.9168
ACG	0.111	0.092	0.5114
TTT	0.080	0.071	0.7225
ATG	0.050	0.037	0.5022
TCG	0.032	0.024	0.6295
TCT	0.023	0.014	0.4932

H. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La eNOs es conocida como una de las enzimas clave en la producción de óxido nítrico (ON), la reducción de éste promueve la proliferación de células del músculo liso vascular, y por lo tanto puede inducir a la formación de la neoíntima que lleva a la restenosis coronaria intra-stent^(90,91,92,93).

Este gen ha sido estudiado exhaustivamente para determinar la relevancia de las variantes presentes en el gen eNOS y su posible papel en la susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares.

Los resultados que obtuvimos en el estudio de las variantes del gen eNOS y la restenosis muestran que la edad, el género, el intervencionismo previo, la cirugía de revascularización cardíaca previa, los antecedentes de diabetes mellitus, la hipertensión arterial sistémica, la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la insuficiencia renal crónica, el infarto agudo al miocardio, la angina inestable, la angina estable, la isquemia silente, el síndrome isquémico coronario agudo, el uso de aspirina en cateterismo control y el uso de betabloqueadores son factores de riesgo que tienen un papel importante en el desarrollo de la restenosis en la población mexicana. Desafortunadamente, no fue posible observar diferencias estadísticas entre los pacientes con y sin restenosis.

❖ ***Glu298Asp***

La variante en el exón 7 Glu298Asp ha sido analizada en diversos estudios epidemiológicos, pero los hallazgos de asociación han sido inconsistentes y además no hay estudios que examinen este polimorfismo en mexicanos y su asociación con la restenosis⁽⁹⁴⁾.

Suziki y cols reportaron que el alelo T del polimorfismo Glu298Asp en el gen eNOS es un factor de riesgo independiente de restenosis intra-stent. ⁽⁹³⁾ De acuerdo con *Shuvalova y cols.* el alelo T del polimorfismo Glu298Asp (RM = 2.79; 95 % IC=1.17–6.66) es un factor de riesgo independiente para individuos con diabetes mellitus tipo 2 ⁽⁹⁵⁾. De la misma manera *Gomma y cols.* demostraron un elevado riesgo en el alelo T del polimorfismo Glu298Asp (RM = 1.88; 95 % IC: 1.01–3.51; p = 0.043) determinando que este efecto era esencialmente aditivo e independiente de otros factores clásicos de riesgo de adquirir restenosis intra-stent ⁽⁹⁶⁾. En línea con estos hallazgos los estudios funcionales plantean que las alteraciones derivadas de la vía del ON, pueden ser debido a la menor liberación endotelial de ON relacionado con el alelo T del polimorfismo Glu298Asp del gen eNOS ⁽⁹⁷⁾. Controversial con los hallazgos anteriores nuestros resultados mostraron que bajo el modelo heterocigoto los individuos con el genotipo G/T confieren protección al padecimiento de restenosis cuando son sometidos a intervencionismo previo.

❖ **-786T/C**

El análisis del polimorfismo -786T/C mostró que los individuos bajo el modelo dominante (T/C o C/C), tiene un papel importante en el desarrollo de la restenosis dependiendo la variable, los individuos que tienen cualquier genotipo (T/C o CC) que presentan infarto agudo del miocardio incrementan el riesgo de desarrollar restenosis (RM=1.88, 95% IC= 0.71-4.96, p= 0.037) en comparación con los individuos que presentan angina inestable que decrecen el riesgo (RM=0.32 ,95%IC= 0.11-0.91, p= 0.039). Conforme a lo anterior, *Nakayama y cols.* reportaron que la mutación -786 C suprime la transcripción del gen eNOS,

lo que sugiere que la presencia del alelo C reduce la producción endotelial de ON en las arterias y predispone a los pacientes que tengan el alelo C a espasmo coronario ⁽⁹⁸⁾, esto es apoyado en un estudio donde hay evidencia *in vivo* de la función de la eNOS mutada en ratones y muestra un aumento del espesor de la pared del vaso acompañado de una respuesta hiperplásica de la pared arterial, lo que indica que un defecto en la vía del ON puede promover la remodelación anormal y cambios patológicos en la morfología de la pared del vaso asociado con aterosclerosis y restenosis ⁽⁹⁹⁾; en línea con nuestro hallazgo siempre que los pacientes presenten infarto agudo del miocardio previo. Por otro lado, controversial a estos hallazgos, *Misiak y cols* citan que derivado de diversos estudios transcripcionales, no es posible explicar con claridad el papel del polimorfismo -786 T/C en la posible disminución de la expresión del gen eNOS y por consiguiente la reducción de la liberación de ON ⁽¹⁰⁰⁾.

Rudic y cols mencionan que la eNOS es necesaria para la remodelación vascular, la pérdida de la funcionalidad resulta en un fenotipo vascular anormal que puede sinergizar con factores etiológicos adicionales observados en las enfermedades cardiovasculares asociadas con la disfunción endotelial, tales como la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis ⁽¹⁰¹⁾, cuestión similar en nuestro estudio, pero nuestra asociación como factor de riesgo es con infarto agudo al miocardio y como factor de protección la angina inestable.

Por lo anterior en el presente estudio proponemos que el polimorfismo -786 T/C juega un papel importante en el desarrollo de la restenosis, no obstante es necesaria la realización de un mayor número de estudios al respecto, o bien darle continuidad al estudio presentado haciendo ciertas modificaciones, tales como ampliar el número de individuos a estudio además de adicionar pruebas

como la medición de nitratos/nitritos en sangre (reacción de Griess) para verificar el aumento o disminución de los niveles de ON en relación con el papel que juegan los polimorfismos (Glu298Asp, -786T/C y -1474T/A) en la restenosis.

❖ **-1474T/A**

Finalmente el análisis del polimorfismo -1474 T/A aún no ha sido reportado en artículos relacionados con restenosis, sin embargo *Kuzmanic y cols.* propusieron que el efecto del alelo "A" de este polimorfismo afecta la transcripción del mRNA, reduciendo la expresión del gen y puede llevar a una alteración en la producción o reducir la biodisponibilidad del ON causando susceptibilidad a encefalopatía hipóxica isquémica ⁽¹⁰²⁾. En controversia con este dato nuestros resultados muestran que bajo el modelo heterocigoto los individuos que tiene el genotipo "T/A" decrecen el riesgo de desarrollar restenosis ajustado por los factores de riesgo cardiovascular (RM=0.51, 95%IC= 0.28-0.93). Si es bien cierto que la encefalopatía hipóxica isquémica y la restenosis no son enfermedades del todo similares, presentan diversas semejanzas como: la acumulación de radicales libres y la importancia del papel de la eNOS como vasodilatador de los vasos sanguíneos en ambas patologías, una en el cerebro y otra en el endotelio vascular. Sin embargo debido a la diversidad genética además de los factores de riesgo correspondientes a cada población y por tratarse de enfermedades distintas nosotros proponemos que en la población mexicana el polimorfismo -1474 T/A aumenta la expresión del gen por lo que existe una mayor producción de ON causando la vasodilatación de los vasos sanguíneos disminuyendo así el riesgo de restenosis en la población mexicana.

En este orden de ideas, es evidente que contamos con resultados que no concuerdan con los anteriormente expuestos, sin embargo, esto demuestra que nuestra población presenta características genéticas diferentes a las poblaciones rusa, japonesa, inglesa, italiana, croata, etc; debido a que nuestra carga genética está formada por una mezcla de genes que se han estado combinando por más de 500 años, conformada por un 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides; además de los diferentes estilos de vida y costumbres que hacen a ciertas poblaciones más susceptibles que a otras a padecer ciertas patologías, e incluso predecir una respuesta al tratamiento de la enfermedad. Lo anterior sugiere que los datos reportados en otras poblaciones no se pueden aplicar a la población mexicana (4). Probablemente esa es la razón de que no obtuvimos diferencias en nuestro estudio de distribución genética y para evitar un falso negativo se recomienda ampliar el tamaño de muestra de la población así como tener acceso a las variables angiográficas para poder realizar un mejor sesgo en la población ⁽¹⁰³⁾.

I. CONCLUSIÓN

Este estudio reporta que los polimorfismos Glu298Asp, -786T/C y -1474 T/A del gen eNOs juegan un papel importante en el desarrollo de la restenosis en población mexicana.

J. PERSPECTIVAS

- Darle continuidad al presente estudio.
- Ampliar el tamaño de muestra de la población.
- Adicionar pruebas de medición de nitratos/nitritos en sangre por medio de la reacción de Griess, para verificar el aumento o disminución de los niveles de ON en relación con el papel que juegan los polimorfismos (Glu298Asp, -786T/C y -1474T/A) en la restenosis.
- Tener acceso a las variables angiográficas.

K. ANEXOS

1. EXTRACCIÓN DE DNA POR MÉTODO DE EXPULSIÓN SALINA.

Modificado de (104).

- Recolectar 5-6mL de sangre total con EDTA como anticoagulante.
- Centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos y desechar el plasma.
- Separar las células nucleadas con TKM-1(3/4 partes)
- Pasar la muestra a un tubo Falcon de 50mL.
- Adicionar 130µL de Tritón X-100.
- Agitar durante 10 minutos en el OrbitronRotator II.
- Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm.
- Desechar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en TKM-1 hasta la marca y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos (repetir el paso 9, las veces necesarias hasta obtener el pellet de color blanco).
- Agregar 800 µL de TKM-2.
- Con la ayuda de una pipeta traspasar a un tubo Eppendorf y adicionar 50 µL de SDS 10%.
- Agitar la muestra en el vortex.
- Incubar 10 minutos a 55°C.
- Agitar nuevamente la muestra en el vortex.
- Adicionar 300µL de NaCl a una concentración 5M.
- Colocar la muestra en la microcentrifuga a 14000 rpm durante 5 minutos.
- Tomar el sobrenadante y transvasar el volumen a dos tubos Eppendorf (rotulados como 20°C y -70°C).

- Adicionar 900µL de etanol absoluto a temperatura ambiente en cada uno de los tubos.
- Centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C de temperatura.
- Decantar el sobrenadante.
- Adicionar 900µL de etanol al 70% frío.
- Centrifuga a 4°C por 5 minutos a 14000 rpm.
- Descartar el sobrenadante.
- Introducir las muestras abiertas en el Speed back 10 minutos (para eliminar el exceso de etanol de la muestra).
- Agregar 150µL de TE (para diluir el DNA).
- Incubar a 65°C mínimo durante 15 minutos.
- Medir la concentración del DNA a 260nm. Este proceso se lleva a cabo directamente en el equipo NanoDrop, la pureza del DNA se mide a 260 nm y las proteínas a 280; la relación 260/280 nos da la pureza y el valor debe oscilar entre 1.7-2.0.



Fig. 15.- Área de extracción del laboratorio de genómica "Instituto Nacional de Cardiología"

2. TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

La amplificación por medio de la técnica de PCR en tiempo real consta de varios pasos, en este caso utilizamos el equipo Fast Real-Time 7900 de la casa comercial Applied Biosystem la cual proporciona los reactivos que se necesitan : master mix y los ensayos Taqman.

La master mix está compuesta por los siguientes reactivos: AmpliTaq DNA polimerasa, dNTP's, referencia pasiva ROX, buffer y MgCl.

Los ensayos Taqman contienen los iniciadores y la sonda que detectaran el sitio polimórfico, en el extremo 5' presentan una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador (quencher) que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas en una misma secuencia de DNA y a una distancia determinada toda la energía emitida en forma de fluorescencia por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero.

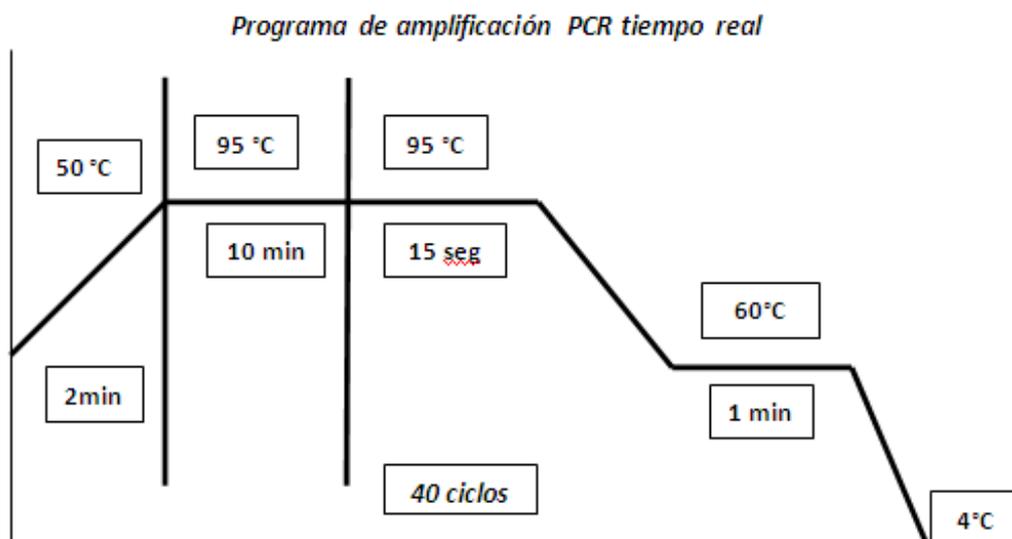
La detección de la PCR en Tiempo Real se lleva a cabo mediante la medición de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación y detectada por el sistema óptico de detección del equipo especialmente diseñado para este propósito. La cantidad de fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación es proporcional a la cantidad de producto de amplificación generado. La determinación de los SNP's es por medio de dos sondas cada una de las cuales presenta en la posición central una de las variantes del nucleótido dimórfico. Marcadas con los reporteros FAM y VIC para diferenciarlas entre sí. El principio es que la sonda se hibride perfectamente con la secuencia blanco que es escindida por la Taq polimerasa mientras que esta hace una diferencia en el nucleótido dimórfico, se reduce la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia

blanco y por lo tanto se degrada por la misma Taq polimerasa que tiene función de exonucleasa liberando el fluorocromo para permitir su identificación. De esta forma un aumento en la señal de uno de los reporteros indicará homocigosidad para el nucleótido dimórfico que reporta la fluorescencia específica; mientras que si reporta fluorescencia de ambos reporteros es un indicativo de heterocigosidad.

❖ REACTIVOS UTILIZADOS

Muestras	223 muestras(10 ng/uL)
5 uL Master mix	530 uL
0.125 uL Sonda Taqman	13uL
0.750 uL agua	80 uL

❖ EL PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN



- Amplificación: 50°C durante 2 minutos.
- Desnaturalización: 95°C durante 10 minutos.
- Alineación y elongación: 95°C durante 15 segundos.
- Alineación y elongación final: 60°C durante 1 minuto.
- Se llevaron a cabo 40 ciclos.

❖ SOFTWARE

Una vez finalizado el proceso de amplificación se analizaron los resultados en el mismo equipo por medio de software SDS 3.1. El análisis se llevó a cabo mediante discriminación alélica, en donde se pueden identificar tres figuras de distintos colores (rombo azul, círculo rojo y triángulo verde), el rombo de color azul es para la identificación de homocigotos en la variante tipo silvestre, el círculo rojo para homocigotos tipo mutante y el verde para heterocigotos.



Fig. 16.- Área de PCR en tiempo real. Laboratorio de genómica del "Instituto Nacional de Cardiología".

L. REFERENCIAS

1. Rosas Peralta M, Attie F. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. Arch Cardiol Mex. 2007; 77: p. 91-93.
2. Velazquez Monroy O, al. e. Prevalencia e interrelación de enfermedades crónicas no transmisibles y factores de riesgo cardiovascular en México. Arch Cardiol Mex. 2003; 73: p. 62-77.
3. Rosas Peralta M, al. e. Re-encuesta Nacional de Hipertensión Arterial (RENAHTA): Consolidación Mexicana de los Factores de Riesgo Cardiovascular. Cohorte Nacional de Seguimiento. Arch Cardiol Mex. 2005; 75: p. 96-111.
4. Vargas Alarcón G. Polimorfismos genéticos en enfermedades cardiovasculares. La experiencia en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Arch Cardiol Mex. 2007; 77: p. 88-93.
5. Guillermo Acosta A, Áñez Vermolen J, Andara CV, Bermúdez Pirela V, Bermúdez Arias F. Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: De la síntesis a la acción del óxido nítrico. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2006; 25: p. 54-59.
6. Branković A, Brajušković G, Nikolić Z, Vukotić V, Cerović S, Savić-Pavićević D, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk in Serbian population. Int J Exp Pathol. 2013; 10.
7. Alemán I, Alex R, Ramírez M, Hung A, Ramírez C. Expresión de las óxido nítrico sintasas constitutiva, endotelial e inducible en pacientes venezolanas con preclamsia. Invest Clin. 2008; 49: p. 321-330.
8. Romanova EN, Goyorin AV. TNF- α , IL-10, and eNOS gene polymorphisms in patients with influenza A/H1N1 complicated by pneumonia. Ter Arkh. 2013; 85: p. 58-62.
9. Kim HS, Bae SC, Kim TH, Kim SY. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. Int Orthop. 2013.
10. Wang QQ, Yu L, Huang GR, Zhang L, Liu YQ, Wang TW, et al. Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and nitric oxide synthase 3 genes as risk factors of high-altitude pulmonary edema: a case-

- control study and meta-analysis. *Tohoku J Exp Med.* 2013; 229: p. 255-266.
11. Fernández GC, Tardáguila FM, López CT, Velasco M, San Miguel P, de la Fuente A. Fisiopatología de la placa de ateroma y sus implicaciones en la imagen. *Radiología.* 2003; 45: p. 107-114.
 12. Ruíz B, Bandrés F. Prevención primaria de la arteriosclerosis. 1st ed. Madrid: Fundación Tejerina; 2009.
 13. Bournon RA, López MN. Aterosclerosis y lesión endotelial: ¿proceso irreversible? *Med Int Mex.* 2010; 26: p. 590-596.
 14. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002; 420: p. 868-874.
 15. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: p. 115-126.
 16. Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: Theory versus practice. *Circulation.* 1999; 100: p. 1148-1150.
 17. Libby P. Tratado de cardiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" Distrito Federal: Intersistemas; 2012.
 18. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular disease. Part 1: General considerations, the epidemiologic transition, risk factors and impact of urbanization. *Circulation.* 2001; 104: p. 2746-2753.
 19. World Health Organization. The World Health report 2004. Changing history. Geneva: World Health Organization; 2004.
 20. Secretaría de Salud de México. Secretaría de Salud: México. [Online]. [cited 2013 julio 15. Available from: www.salud.gob.mx.
 21. Florenzano FU. Fisiopatología de la placa aterosclerótica. *Clínica Los Condes.* 2000; 11: p. 1-11.
 22. Carbayo JA. Nuevos marcadores de riesgo cardiovascular ¿Pueden influir en la clasificación de riesgo cardiovascular? *Clin Invest Arterioscl.* 2012; 24: p. 57-70.
 23. García Barreto D, García Fernández R, García Pérez JV, Concepción Milián A, Peix González A. Diagnóstico preclínico de la aterosclerosis: Función endotelial. *Rev Cubana Med.* 2003; 42: p. 58-63.

24. Ros E, Zambón D, Gilabert R. Técnicas de diagnóstico de aterosclerosis preclínica y su utilización para mejorar la predicción de riesgo cardiovascular. *Clin Invest Ateroscl.* 2002; 14: p. 187-197.
25. Porth CM. *Essentials of Pathophysiology.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins; 2011.
26. Carlos A, Cassiani M, Cabrera AG. Síndromes coronarios agudos: Epidemiología y diagnóstico. *Salud Uninorte.* 2009; 25: p. 118-134.
27. Chorro F, López V. *Electrocardiografía en la práctica clínica.* 2nd ed. Valencia: PUV; 2005.
28. Bonnefoy E, Kirkorian G, Chevalier P, Piriou V, Touboul P. Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST: primeras 48 horas. *EMC - Anestesia-Reanimación.* 2002; 28: p. 1-16.
29. Llevadot J. *Síndromes coronarios agudos* Madrid: Elsevier; 2004.
30. Espondaburu OR, Fara Hunt VA, Ocampo LI. El proceso aterogénico y su desarrollo en las enfermedades autoinmunes. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2004; 38: p. 181-192.
31. Calderón JC, Fernández AZ, María de Jesús AI. Aterosclerosis, estrés oxidativo y actividad física. *Invest Clin.* 2008; 49: p. 397-410.
32. Carrillo Calvillo J, Bear Sandoval IR. Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo, lípidos y aterotrombosis. *Aterosclerosis: Un proceso inflamatorio.* *Archivos de Cardiología de México.* 2004; 74: p. S379-S384.
33. Di Coletto P, Soyombo A. The role of the endothelium in atherogenesis. *Curr Opin in Lipidol.* 1993; 4: p. 364-372.
34. Boulanger C, Tanner F, Bea M, Hahn A, Werneer A, Luscher T. Oxidized low density lipoprotein induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res.* 1992; 70: p. 1191-1197.
35. Simon B, Cunningham L, Cohen R. Oxidized low density lipoproteins cause contraction and inhibit endothelium dependent relaxation in the pig coronary artery. *J Clin Invest.* 1990; 86: p. 75-79.
36. Chin J, Azhar S, Hoffman B. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J*

- Clin Invest. 1992; 89: p. 10-18.
37. Hernández Morales S. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Archivos de Cardiología de México. 2007; 77: p. 219-224.
38. Badimón L, Martínez González J. Actualización y futuro del óxido nítrico en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular:Disfunción endotelial. Rev Esp Cardiol Supl. 2006; 6: p. 21A-30A.
39. Verdejo París J. Función endotelial. Archivos de Cardiología de México. 2006; 76: p. 164-169.
40. Alexandre M, Ortega A. Función y disfunción endotelial Madrid: Editorial complutense; 2000.
41. Schillinger M, Minar E. Restenosis after percutaneous angioplasty. Vascular Health and Risk Management. 2005; 1: p. 73-78.
42. Weiczorek SJ, Tsongalis GJ. Pharmacogenomics: Will it change the field of medicine? Clin Chim Acta. 2001; 308: p. 1-8.
43. Rapold HJ, David PR, Guiteras VP. Restenosis and its determinants in first and repeat coronary angioplasty. Eur Heart J. 1987; 8: p. 757-786.
44. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F. A comparison of ballon expandable stent implantation with ballon angioplasty in patients with coronary artery disease.Benestent Study Group. N Engl J Med. 1994; 331: p. 489-495.
45. Serruys PW, Van Hout B. Randomised comparison of implatation of heparincoated stents with ballon angioplasty in selected patients with coronary artery disease(Benestent II). Lancet. 1998; 352: p. 673-681.
46. Hamdan Suleiman N. Stents coronarios y prevención de reestenosis: Primera parte. Medicrit. 2006; 3: p. 68-77.
47. Seedial SMEa. Local drug delivery to prevent re-estenosis. J Vasc Surg. 2013; 57: p. 1403-1414.
48. Morena R. Stents recubiertos y otros dispositivos antirreestenosis. Rev Esp Cardiol. 2005; 58: p. 842-862.

49. Mitra AK, Agrawal DK. In stent restenosis:bane of the stent era. J Clin Pathol. 2006; 59: p. 232-239.
50. de la Peña M. Tratado del corazón Madrid: Instituto Europeo de Salud y Bienestar Social; 2010.
51. Kraitzer A, Kloog Y, Zilberman M. Approaches for prevention of restenosis. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008; 85: p. 583-603.
52. Chang CC, Ong ET. Coronary restenosis. Acta Cardiol Sin. 2005; 21: p. 177-189.
53. Álvarez González L, Almeida Gómez J, Méndez Peralta T. Variables asociadas a reestenosis clínica en pacientes con intervencionismo coronaio percutáneo con stent convencional. Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc. 2011; 17: p. 27-36.
54. Berrazueta J, Segovia J. El Endotelio, ese órgano desconocido.Estudio de su principal molécula de síntesis , el óxido nítrico y de la función endotelial Madrid: Real Academia Nacional de Medicina; 2005.
55. González Fajardo JA, Martín Pedrosa JM, Ibañez Maraña MA, Gutiérrez Alonso VM, Carrera S, Vaquero Puerta C. Epidemiología de la reestenosis. Angiología. 2003; 55: p. S190-S198.
56. Reparaz LM, Cervera Bravo T, Ligeró Ramos JM, Portero JL, García Pajares R. Reestenosis: Factores que modifican los resultados tardíos. Angiología. 2003; 55: p. S208-S224.
57. Ferrer Viant D, Fonseca JC, García Rodríguez RE, Martínez Anglada PF. Óxido nítrico: Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. MEDISAN. 1998; 2: p. 45-53.
58. Duarte Mote J, al. e. Óxido nítrico: Metabolismo e implicaciones clínicas. Med Int Mex. 2008; 24: p. 397-406.
59. Ferraro SS, López Ortega AA. Óxido nítrico: Un radical libre sorprendente. Gaceta de Ciencias Veterinarias. 2002; 8: p. 8-16.
60. Martínez Augustin O, Sánchez de Medina F. Arginina, óxido nítrico y función endotelial. Ars Pharm. 2004; 45: p. 303-317.
61. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Efectos del óxido nítrico sobre la

- función cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006; 6: p. 3A-20A.
62. Saavedra Molina A, Calderón Cortés E, Sierra Campos E, Cortés Rojo C, Gaona Zamudio FJ, Clemente Guerrero M. Papel patofisiológico del óxido nítrico mitocondrial. *Mensaje Bioquímico.* 2004; 28: p. 27-43.
63. Guzmán Grenfell AM, Velázquez González A, Sierra Vargas MP. Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 2006; 14: p. 227-232.
64. Moncada S. Óxido nítrico: Un nuevo mensajero biológico Salamanca: Ediciones Universidad Salamanca; 2003.
65. Berrazuela JR. Óxido nítrico endógeno y fármacos nitrovasodilatadores Santander: Universidad de Cantabria; 1994.
66. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M, Portolés A. *Farmacología básica y clínica.* 18th ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
67. Rao S, Austin H, Davidoff MN. Endothelial nitric oxide synthase intron 4 polymorphism is a marker for coronary artery disease in african-american and caucasian men. *Sociedad Iberoamericana de Información Científica.* 2005; 15: p. 191-197.
68. May O. Cayman Chemical. [Online]. [cited 2013 Septiembre. Available from: <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2185;jsessionid=B7795683359FA66A201AF8A289E756BB>.
69. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004; 109: p. III27-III32.
70. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: Cardiac events. *Circulation.* 2005; 111: p. 363-368.
71. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: p. 2479-2488.
72. Fukuchi M, Giaid A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in

- human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion. *Lab Invest.* 1999; 79: p. 659-670.
73. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270: p. 319-324.
74. Yang Z, Kozai T, Van der Loo B. HMG-Co A reductase inhibition improves endothelial cell function and inhibits smooth muscle cell proliferation in human saphenous veins. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 36: p. 1691-1697.
75. Alonso J, Sánchez de Miguel L, Monton M, Casado S, López Farre A. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: Regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: p. 5719-5726.
76. Eto M, Barandier C, Rathgeb L. Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: Role of Rho/ROCK and mitogen activated protein kinase. *Circ Res.* 2001; 89: p. 583-590.
77. Ming XF, Viswambharan H, Barandier C. Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: p. 8467-8477.
78. Agnoletti L, Curello S, Bachetti T. Serum from patients with severe heart failure down regulates eNOS and is proapoptotic: Role of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation.* 1999; 100: p. 1983-1991.
79. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2002; 101: p. 1899-1906.
80. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002; 106: p. 653-658.
81. Bugiardini R, Manfrini O, Pizzi C, Fontana F, Morgagni G. Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: A study of women with chest pain and normal coronary

- angiograms. *Circulation*. 2004; 109: p. 2518-2523.
82. Devlin T. *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4th ed. Barcelona: Reverté; 2004.
83. Gil A. *Tratado de nutrición, tomo 1: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. 2nd ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2010.
84. PubMed-NCBI. NOS3 nitric oxide synthase 3(endothelial cell)[Homo sapiens(human)][base de datos en internet]. [Online]. [cited 2013 Agosto. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4846>].
85. PubMed-NCBI. SNP rs 2070744 [base de datos en internet]. [Online]. [cited 2013 Agosto. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2070744].
86. PubMed-NCBI. SNP rs1800783 [base de datos en Internet].. [Online]. [cited 2013 Agosto. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800783].
87. PubMed-NCBI. SNP rs 1799983. [Online]. [cited 2013 Agosto. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799983].
88. Miller A. A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res*. 1998; 16: p. 1215-1217.
89. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1955; 19: p. 251-253.
90. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. .
91. Griendling KK, Fitzgerald GF. Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo. *Circulation*. 2012; 108: p. 1912–1916.
92. Jain SK, Palmer M. The effects of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22: p. 593–596.
93. Suzuki T, Okamura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, et al. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. *Int J Cardiol*.

2002; 86: p. 71-76.

94. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. 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. PNAS. 2000 marzo; 97: p. 2832-2835.
95. Shuvalova YA, Kaminsky AI. Association between polymorphisms of eNOS and GPx-1 genes. Mol Cell Biochem. 2012; 370: p. 241–249.
96. Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T[C] gene polymorphism are associated with coronary in-stent restenosis. Eur Heart J. 2002; 23: p. 1955–1962.
97. Philip I, al. e. G894T Polymorphism in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With an Enhanced Vascular Responsiveness to Phenylephrine. Circulation. 1999 junio; 99: p. 3096-3098.
98. Nakayama M, et.al.. T-786/C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm. Circulation. 1999 junio; 99: p. 2864-2870.
99. Colombo MG, al. e. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease. Clinical Chemistry. 2003; 49: p. 389-395.
100. Misiak B, et.al.. The Role of -786T/C Polymorphism in the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene in Males with Clinical and Biochemical Features of the Metabolic Syndrome. International Journal of Endocrinology. 2011; 2011: p. 1-6.
101. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct Evidence for the Importance of Endothelium-derived Nitric Oxide in Vascular Remodeling. J. Clin. Invest. 1998 febrero; 101: p. 731-736.
102. Kuzmanić R, al. e. Association of NOS3 tag polymorphisms with hypoxic ischemic encephalopathy. Croat Med J. 2011; 52: p. 396-402.
103. Zolezzi I, et.al.. Análisis de la diversidad genómica en las poblaciones mestizas mexicanas para

desarrollar medicina genómica en México. PNAS Early Edition. 2009; 106: p. 8611–8616.

104. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research. 1991; 19: p. 5444.