



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CENTRO MEDICO NACIONAL  
SIGLO XXI

**Factores de riesgo clásicos y genéticos de disfunción  
endotelial en sujetos mexicanos y sin cardiopatía isquémica no  
aterosclerosa.**

## **TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:

**CARDIOLOGÍA**

PRESENTA

**GERARDO CARREÓN BALCÁRCEL**

ASESORES DE TESIS

**M. en C. Dr. Eduardo Almeida Gutiérrez**

**D. en C. Irma Isordia Salas**

México, D.F. 15 de Agosto 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Dr. Cesáreo A. Trueba Davalillo.**

Profesor del Curso Universitario de Ortopedia  
Hospital Español de México

**Dr. Félix I. Gil Orbezo.**

Asesor de la Tesis.  
Jefe del Servicio de Ortopedia  
Hospital Español de México

**Dr. Alfredo Sierra Unzueta.**

Jefe de Enseñanza e Investigación Médica.  
Hospital Español de México

***Agradecimientos***

- En primer lugar quiero dar las gracias a Dios por permitirme llegar hasta el día hoy y poder culminar otra etapa en mi vida; siendo Él, un gran apoyo en todo momento.
- A mis padres por su apoyo y amor incondicional a lo largo de toda esta travesía. Sus consejos y regaños, que siempre son necesarios, me ayudaron en todo momento. Gracias por saber escuchar sin condiciones.
- A mis hermanos Guillermo y Mitzi, como una muestra de cariño y agradecimiento. Ya que con ellos siempre comparto todas mis experiencias, además de pasar momentos muy agradables.
- A mi sobrina Sofia, ya que ella es la “alegría” de mi vida, siempre tan vivaz e hiperactiva. Esperando ser un ejemplo para ella y que sepa que todo es posible, solo es cuestión de proponérselo.
- A mis profesores, en especial al Dr. Félix Gil Orbezo y el Dr. Cesáreo Trueba Davalillo, por haberme permitido estar con ellos durante todo este tiempo. Sus consejos, regaños y orientación me han servido enormemente.
- Al Dr. Víctor Jiménez, mi asesor estadístico, ya que sin su ayuda no habría terminado este proyecto.
- A todos mis amigos de la especialidad, compañeros del hospital y aquellas personas que hicieron ameno los días dentro y fuera del mismo, ya que sin sus sonrisas y apoyo, esta etapa sería muy distinta.

---

**Dr. RICARDO JÁUREGUI AGUILAR**

DIRECTOR GENERAL, MAESTRO TITULAR DEL  
CURSO DE CARDIOLOGÍA U.M.A.E. CARDIOLOGÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

---

**DR. RODOLFO HERRERA FRANCO**

DIRECTOR MÉDICO U.M.A.E. CARDIOLOGÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

---

**DR. JESUS SALVADOR VALENCIA SÁNCHEZ**

DIRECTOR DE EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD U.M.A.E.  
CARDIOLOGÍA CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

---

**DR. ROBERTO ARRIAGA NAVA**

DIVISION DE EDUCACION EN SALUD U.M.A.E. CARDIOLOGIA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

---

**DR. EDUARDO ALMEIDA GUTIÉRREZ**

CARDIÓLOGO, MAESTRO EN CIENCIAS, ASESOR DE TESIS,  
UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS CORONARIOS, U.M.A.E. CARDIOLOGÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

---

**DRA. IRMA ISORDIA SALAS**

PATÓLOGO CLÍNICO, MAESTRO EN CIENCIAS, ASESOR DE TESIS  
UNIDAD DE HEMOSTASIA Y ATERTROMBOSISHOSPITAL GENERAL REGIONAL  
CARLOS MCGREGOR SÁNCHEZ. IMSS.

## AGRADECIMIENTOS

Doy Gracias a Dios, por darme la vida y guiarme en cada paso que he dado a través de este largo camino de la Medicina.

A mi Madre Adela Balcárcel Andrade, por hacer de mí un hombre de bien, por su amor, comprensión y apoyo, por los valores y principios que me ha inculcado, gracias por estar siempre en los momentos buenos y malos de mi vida.

A mi Padre Gerardo Carreón Falfán, por su apoyo y consejo en cada uno de mis proyectos, por enseñarme a no claudicar y a dar siempre el mayor esfuerzo, por enseñarme el mundo de la Medicina y ser siempre un ejemplo para mí.

A mis Hermanos Luis Alberto, Eduardo Enrique, Aris y Sara, por su amor y comprensión en todos estos años de carrera, gracias por tanta alegría que le han dado a mi vida y por ser parte de la inspiración para hacer las cosas mejor cada día.

A mis Amigos Juan Carlos, Christian, Gustavo, Carlos, Claudio† y Linda, quienes siempre han estado conmigo y con quienes he compartido momentos maravillosos durante la carrera y especialidad.

A mis Maestros en la especialidad, quienes me han formado como Cardiólogo y me han dado las herramientas con las que trabajaré en la próxima etapa de mi vida.

A mis Tutores de tesis, Dr. Almeida, Dra. Isordia y a la Dra. Contreras por el tiempo dedicado y la enseñanza que me dejaron con este trabajo.

Gerardo Carreón Balcárcel

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO  
XXI

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Tesis que para obtener el grado de Especialista en Cardiología  
presenta:

GERARDO CARREÓN BALCÁRCEL

FACTORES DE RIESGO CLÁSICOS Y GENÉTICOS DE DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN  
SUJETOS MEXICANOS CON Y SIN CARDIOPATÍA ISQUÉMICA NO ATEROSCLEROSA.

TUTORES DE TESIS:

M. EN C. DR. EDUARDO ALMEIDA GUTIÉRREZ

Cardiólogo adscrito a la Unidad de Cuidados Intensivos Cardiovasculares  
Hospital de Cardiología Centro Médico Siglo XXI. IMSS.  
Universidad Nacional Autónoma de México

D. EN C. IRMA ISORDIA

Patólogo Clínico, adscrito a la Unidad de Hemostasia y Aterotrombosis  
Hospital General Regional Carlos McGregor Sánchez. IMSS.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

México, Distrito Federal, 15 de Agosto 2009.

Página | 3

## INDICE

TÍTULO	PÁGINA
Resumen	5
Marco Teórico	6
Justificación	19
Pregunta	20
Hipótesis	20
Objetivos	21
Material y Métodos	22
Tamaño de la Muestra	22
Criterios de Inclusión	22
Criterios de Eliminación	22
Procedimientos	23
Variables Independientes	27
Variables Dependientes	29
Diseño del estudio	30
Análisis estadístico	30
Consideraciones éticas	30
Anexos	32
Resultados	33
Discusión y Conclusiones	36
Bibliografía	45



## RESUMEN

La enfermedad arterial coronaria un problema de salud mundial y la primera causa de morbimortalidad. En nuestro país constituyó 19.6% de los fallecimientos en el 2007. La manifestación clínica con más impacto social y biológico de esta enfermedad es el infarto miocárdico. Mas del 90% de los pacientes con cardiopatía isquémica tienen lesiones aterosclerosas en las arterias coronarias epicárdicas, pero el resto pueden presentar la enfermedad por otras etiologías como trombos, vasoespasmo, enfermedades inflamatorias y de la colágena y disfunción endotelial. Poco se ha estudiado a cerca de los factores de riesgo que se relacionan a la disfunción endotelial, y lo escrito está en relación a los factores de riesgo clásicos, sin embargo en el mundo existen poco estudios de asociación con factores genéticos y en la población mexicana no existe alguno.

### Objetivo

Determinar la asociación de los factores de riesgo clásicos y genéticos con la disfunción endotelial en sujetos mexicanos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

### Material y Métodos

Se realizó un estudio de casos y controles observacional, longitudinal-retrospectivo analítico, ambielectivo. Se estudiaron a 50 sujetos con edad  $\geq 18$  años, cualquier género, cardiopatía isquémica demostrada por cuadro clínico y métodos inductores de isquemia con angiografía que demostró coronarias sin lesiones y con flujo coronario lento (flujo TIMI  $< III$ ) en el Hospital de Cardiología de CMN SXXI de Enero 2007 a Diciembre 2008; se incluyeron 50 controles sanos sin manifestaciones clínicas de cardiopatía isquémica. Los criterios de eliminación fueron sujetos con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa que no tuvieran adecuada ventana en el ultrasonido braquial. El estudio se propuso como una fase piloto para estudiar la posible asociación del polimorfismo en nuestra población, el tamaño de muestra necesario fue 240 sujetos por grupo y se determinó en base a antecedentes en otras poblaciones sin embargo se realizó un punto de corte para el análisis al tener reclutados 50 participantes en cada grupo. Se les realizó a todos los sujetos ultrasonido de la arteria braquial para demostrar disfunción endotelial y toma de muestra sanguínea para determinar polimorfismo Glu298Asp del NOS3. Las variables independientes fueron Hipertensión Arterial, Diabetes Mellitus, Dislipidemia, Sobrepeso, Obesidad y el polimorfismo genético. La variable dependiente fue la Disfunción endotelial.

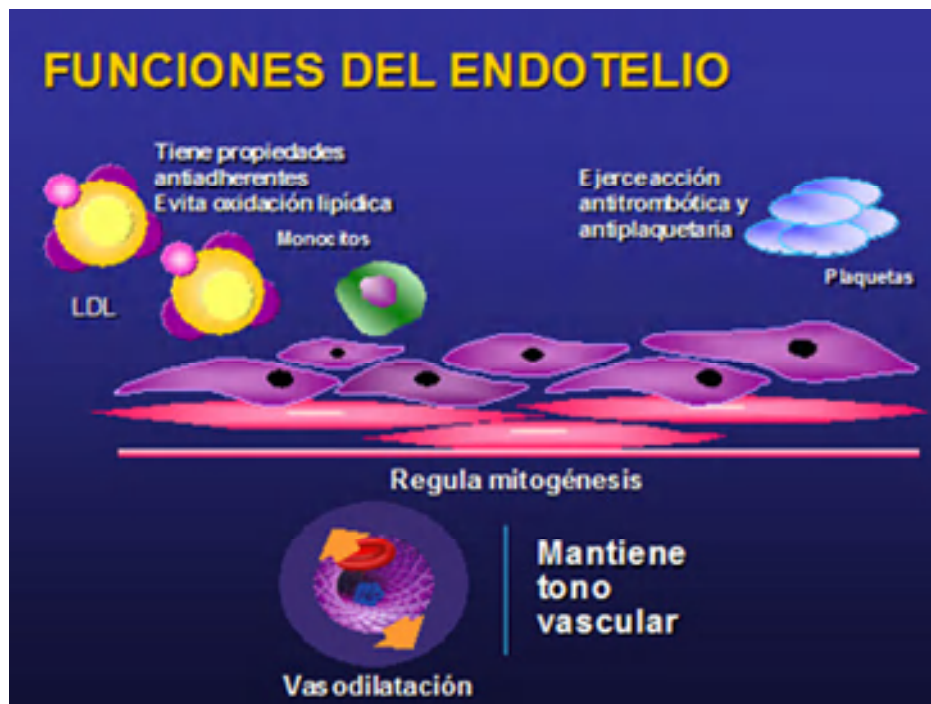
### Resultados

Los factores de riesgo clásicos de aterosclerosis y cardiopatía isquémica mostraron asociación altamente significativa con la disfunción endotelial (antecedente de tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión arterial y dislipidemia, todas ellas  $p < 0.01$ ) Los hallazgos en la prueba de función endotelial muestran que entre ambos grupos el diámetro basal de la arteria braquial fue similar, en la segunda medición de los diámetros braquiales se demuestra claramente la diferencia entre el grupo con disfunción endotelial 0.38 cm (0.35-0.43 cm) comparado con el grupo de función endotelial normal 0.46cm (0.40-0.51cm.),  $p < 0.001$ . Con éste tamaño de muestra, no encontramos diferencias significativas en la distribución de los genotipos, sin embargo existe clara tendencia hacia el riesgo en sujetos portadores del genotipo GA.

## MARCO TEÓRICO

La disfunción endotelial se considera una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y predispone a aterosclerosis. El endotelio es una monocapa de células que recubre la pared luminal de vasos sanguíneos, pero no solo es una barrera sino que tiene múltiples funciones, entre ellas: regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, ejerciendo un papel central como sensor y transmisor de señales; protege la pared arterial frente al desarrollo de lesiones y contribuye a la homeostasis vascular a través de ese control continuo de los estímulos que recibe y la adaptación de su estado funcional; también participa de manera activa en el proceso de inflamación y anti-inflamación (1).

Las células endoteliales (CE) mediante un programa de expresión génica y la síntesis y procesamiento de proteínas altamente regulables, son capaces de detectar los cambios tanto físicos (estrés mecánico hemodinámico) como químicos (liberación de moléculas en su entorno) y transformarlos en respuestas funcionales adaptativas. Ésta capacidad de adaptación le confiere un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular (1).



**Figura 1.** Funciones del endotelio en condiciones normales.

Dentro de las funciones antitrombóticas están la inhibición de la adhesión plaquetaria, de la coagulación, y también regula el sistema trombolisis-fibrinolisis; también actúa en el control de la actividad de las células musculares lisas (CML) de la capa media (tono vascular/proliferación) y modula el tránsito de macromoléculas como las lipoproteínas, y la adhesión de leucocitos (monocitos/linfocitos T) a la pared arterial (figura 1) <sup>(1)</sup>

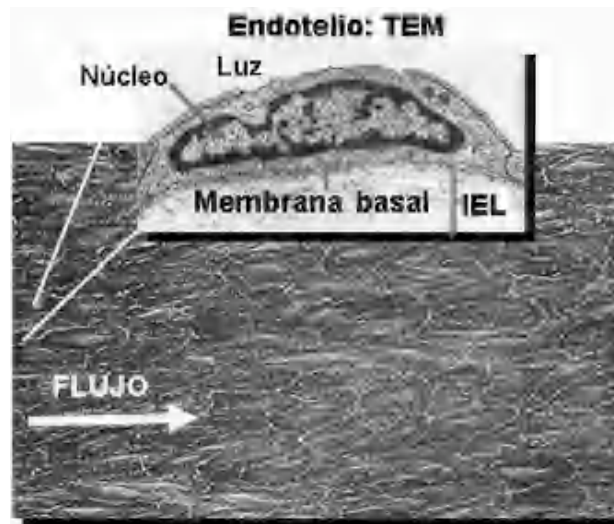
Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se ha definido como disfunción endotelial. La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular y que puede facilitar el desarrollo de aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis.

#### MODIFICACIONES DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR EN LA DISFUNCION ENDOTELIAL.

El endotelio es una monocapa celular conectada por uniones intracelulares que restringe el tráfico de macromoléculas entre la sangre y la pared vascular. Dicho proceso se realiza mediante un complejo sistema microvesicular compuesto por caveolas y un glucocálix en su superficie apical rico en glucosaminoglicanos sulfatados que permiten la absorción selectiva de diversas macromoléculas. La pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas hacia el interior de la pared permite un mayor depósito de moléculas circulantes, como el fibrinógeno y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), iniciando el proceso de disfunción endotelial. Las uniones más comunes entre las CE son las células adherentes (Adherens junctions) que están formadas por proteínas de adhesión transmembrana pertenecientes a la familia de las caderinas. Estas proteínas se organizan en clusters en los contactos entre células y, mediante su dominio citoplasmático, se conectan con el entramado de proteínas del citoesqueleto que compone el soporte estructural del endotelio. El incremento en la permeabilidad endotelial parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por el calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular. Diversos estímulos protrombóticos, inflamatorios o lipídicos (como la trombina, el lipopolisacárido o las lipoproteínas) producen cambios significativos en la permeabilidad endotelial <sup>(1)</sup>.

El flujo de LDL a través del endotelio se produce a favor del gradiente de concentración mediante un proceso de transcitosis que no está mediado por el receptor, potenciado por ciertos factores de riesgo como la hipercolesterolemia (que aumenta el gradiente de concentración) o la hipertensión (que incrementa la permeabilidad endotelial). En modelos animales, las regiones más propensas a desarrollar lesiones ateroscleróticas presentan una mayor permeabilidad a las LDL y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Éste efecto de las lipoproteínas parece vinculado con la desorganización que producen sobre la f-actina y con la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, proceso que involucra la activación de la cinasa Rho/Rho. Concentraciones aterogénicas de LDL y LDL oxidadas (LDL<sub>ox</sub>) también regulan negativamente la

síntesis e incrementan la degradación de proteoglicanos del heparán sulfato que compone la matriz extracelular del espacio subendotelial (figura 2), a través de una inducción de la secreción endotelial de heparinasa, lo que favorece la permeabilidad vascular.<sup>(1,2,3)</sup>

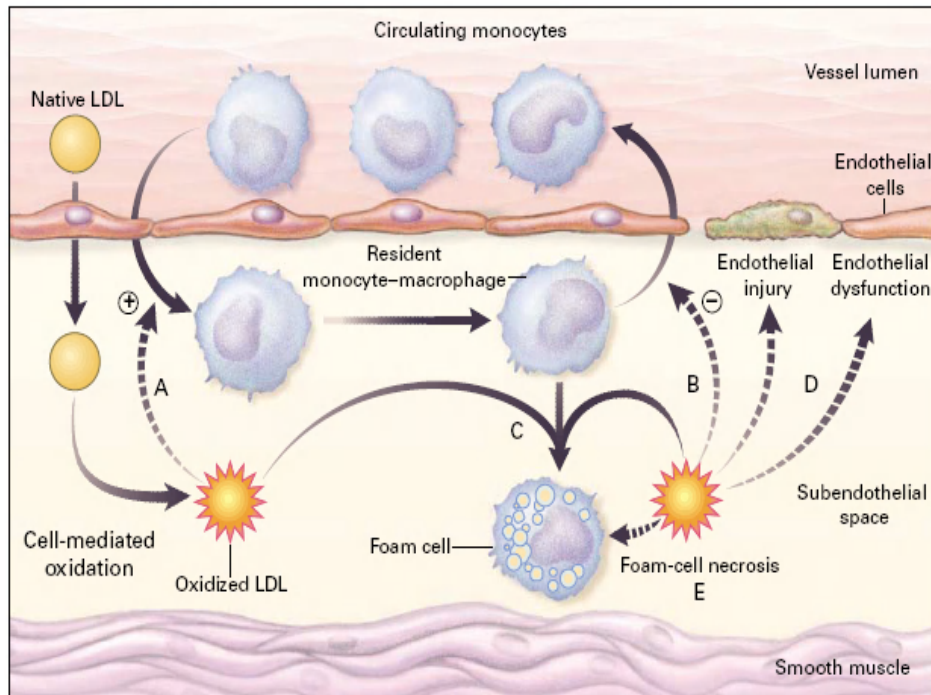


**Figura 2.** Imagen del endotelio vascular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM). El endotelio se apoya en la membrana basal y en la lámina elástica interna (IEL) y se alinea con la dirección del flujo sanguíneo. Las células endoteliales forman una monocapa de células conectada por uniones intercelulares específicas. Tomada de Badimón; Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:21A-30.

#### INFLAMACION EN LA DISFUNCION ENDOTELIAL.

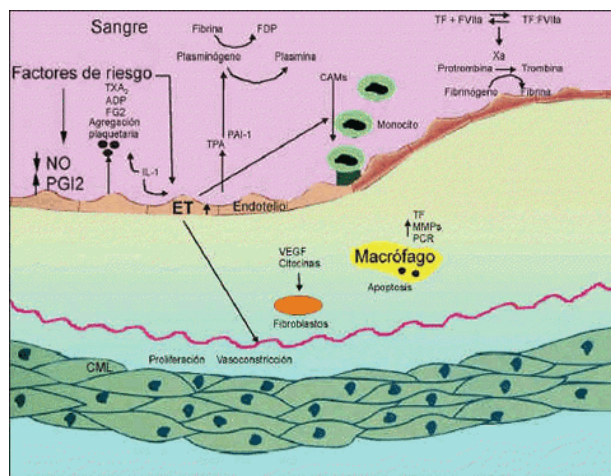
La activación del endotelio conlleva la expresión/secreción de citocinas, como la interleucina 1 (IL-1), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblasto básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos -MCP-1-) y la exposición proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes. Actualmente se conocen diversas CAM, que se agrupan fundamentalmente en dos familias en dos familias: la familia de las selectinas, como la E y P, denominadas así por su similitud estructural con las lectinas y las proteínas pertenecientes a las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1,2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1,2 y 3). Las CAM actúan como ligandos de las integrinas presentes en las membranas de los leucocitos. En los cultivos celulares se ha observado que las concentraciones aterogénicas de LDL (>160 mg/dl) incrementan la expresión de moléculas de adhesión per se y la inducida citocinas e incrementan la adhesión de monocitos

(4)



**Figura 3.** Activación endotelial y formación de la placa aterosclerosa.

El proceso de adhesión comienza con el deslizamiento de los leucocitos sobre la superficie endotelial, la posterior adhesión y finalmente su trans migración. La fase de rodamiento y adhesión resulta de la interacción específica entre los leucocitos y las moléculas de adhesión expresadas por el endotelio (figura 3). El rodamiento representa la interacción entre los leucocitos y las selectinas, con la consiguiente adhesión en la que participan otras CAM de la familia de las inmunoglobulinas, como la ICAM y la VCAM. Los niveles de expresión de las CAM en las lesiones ateroscleróticas son superiores a los de las áreas que no presentan aterosclerosis; esta sobreexpresión de CAM, junto con la inducción de sustancias quimioatrayentes como MCP-1, facilita la unión y la migración de los monocitos en las áreas de lesión. El endotelio activado por agentes proinflamatorios y aterogénicos (citocinas, LDLox, etc) expresa CAM que no se hallan presentes en el endotelio normal, como VCAM-1 y sobreexpresa otras como ICAM-1 (figura 4). (4)



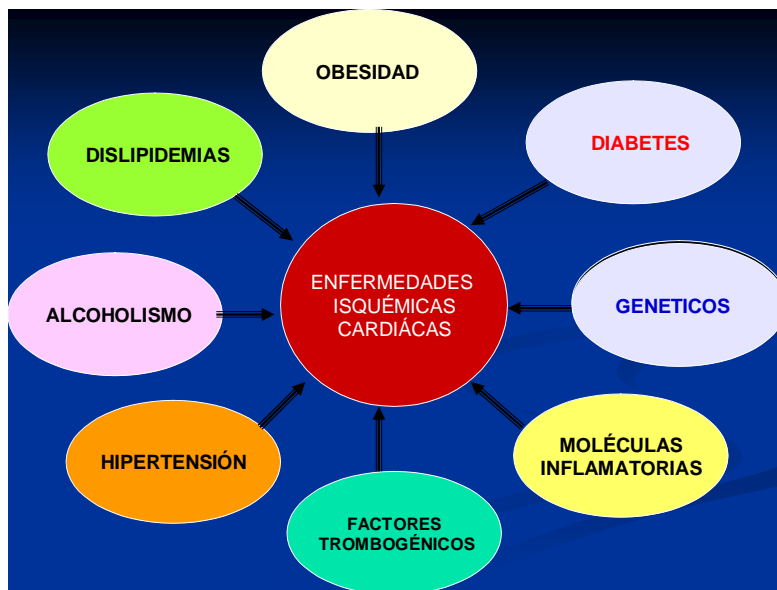
**Figura 4.** Disfunción endotelial avanzada. En la disfunción endotelial se produce vasoconstricción, las células endoteliales incrementan la expresión de VCAM e ICAM-1 que facilita la adhesión de monocitos y plaquetas a los vasos. Los mediadores inflamatorios causan apoptosis de las células endoteliales y las células musculares lisas, y producen proteinasas como las MMP-2 reguladas por las lipoproteínas oxidadas y las citocinas. Las MMP-2 contribuyen a activar la agregación plaquetaria, junto con los gránulos liberados por las propias plaquetas (TXA<sub>2</sub>, ADP y FG<sub>2</sub>). Las células apoptóticas liberan FT activado que desencadena la cascada de la coagulación. El FT interactúa con el FVII, activa el FX, que activa la conversión de protrombina a trombina. Finalmente, se genera fibrina que, junto con las plaquetas activadas, crean la estabilidad suficiente para la formación del trombo mural. El FT activado por los factores de riesgo sistémicos contribuye a la actividad procoagulante de las lesiones ateroscleróticas y a la formación del trombo. Sambola; Rev Esp Cardiol 2003; 56: 1001 – 1009.

#### FALTA DE REGULACION DEL TONO VASCULAR EN LA DISFUNCION ENDOTELIAL.

El Óxido nítrico (NO) es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales. El NO se podría clasificar como una molécula ateroprotectora de origen endotelial: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e inhibidor de la expresión de CAM y de la adhesión de monocitos. Por tanto, a través de la alteración de la producción de NO endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. <sup>(5,6)</sup>

La disminución de la dilatación dependiente de NO es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial. Se observa en paciente con diversos factores de riesgo, como la hipercolesterolemia, diabetes o homocisteinemia. La alteración de la dilatación dependiente del endotelio por la hipercolesterolemia también puede deberse a una disminución de la biodisponibilidad de NO. Por el contrario, al disminuir los valores plasmáticos de LDL mediante la dieta o fármacos hipolipemiantes, se ha comprobado una mejora de la función endotelial. <sup>(7)</sup>

En las últimas décadas se han demostrado factores de riesgo coronario (el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad -LDL-, el tabaquismo, la diabetes, hipertensión arterial, etc.) y otros factores emergentes (radicales libres de oxígeno, homocisteína, infecciones, déficit estrogénico) en la génesis de la aterosclerosis. <sup>(8)</sup>



**Figura 5.** Factores genéticos y modificables que favorecen el desarrollo de la enfermedad isquémica cardíaca.

Estos factores de riesgo clásicos y emergentes están demostrando su asociación no sólo con las etapas en que ya se encuentra establecida la aterosclerosis, sino desde la etapa que solo existe disfunción endotelial y también la etapa en que existe la manifestación clínica de isquemia (angina e infarto del miocardio) <sup>(8)</sup>. (figura 5)

El tabaco ejerce influencia sobre las propiedades de la pared vascular, aunque esta puede ser distinta en las arterias elásticas como la carótida común o en arterias musculares como la braquial. <sup>(9)</sup>

Luego de fumar un cigarrillo, el diámetro de la arteria carótida aumenta escasamente y su distensibilidad se encuentra disminuida. Por otra parte, en el caso de la arteria braquial, su diámetro no se modifica luego de fumar un cigarrillo, acompañándose de un tono vascular aumentado, posiblemente relacionado con un nivel incrementado de catecolaminas. <sup>(10)</sup>

Existe una amplia base científica que demuestra que el tabaquismo favorece el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas a nivel del árbol vascular periférico, actuando tanto en forma directa como asociado a distintos factores de riesgo, por lo que un adecuado control de los mismos es necesario para una disminución de la incidencia de eventos y una mejor evolución de los pacientes afectados. <sup>(11)</sup>

Existen estudios donde se ha demostrado que la severidad de la disfunción endotelial se asocia con el riesgo cardiovascular, por ello se han propuesto diversas intervenciones farmacológicas y dietéticas para reducir el riesgo

cardiovascular secundario a disfunción endotelial, sin embargo, aún no se ha identificado un factor (o conjunto de ellos) que expliquen de una manera eficaz la presencia y evolución de la disfunción endotelial y finalmente su efecto sobre la producción de isquemia. (12)

El endotelio y su función han entrado plenamente en la práctica clínica, y el control de la función endotelial está emergiendo como un elemento clave en terapias que pueden interferir en el desarrollo de la aterosclerosis y sus complicaciones clínicas. (13)

#### OXIDO NÍTRICO

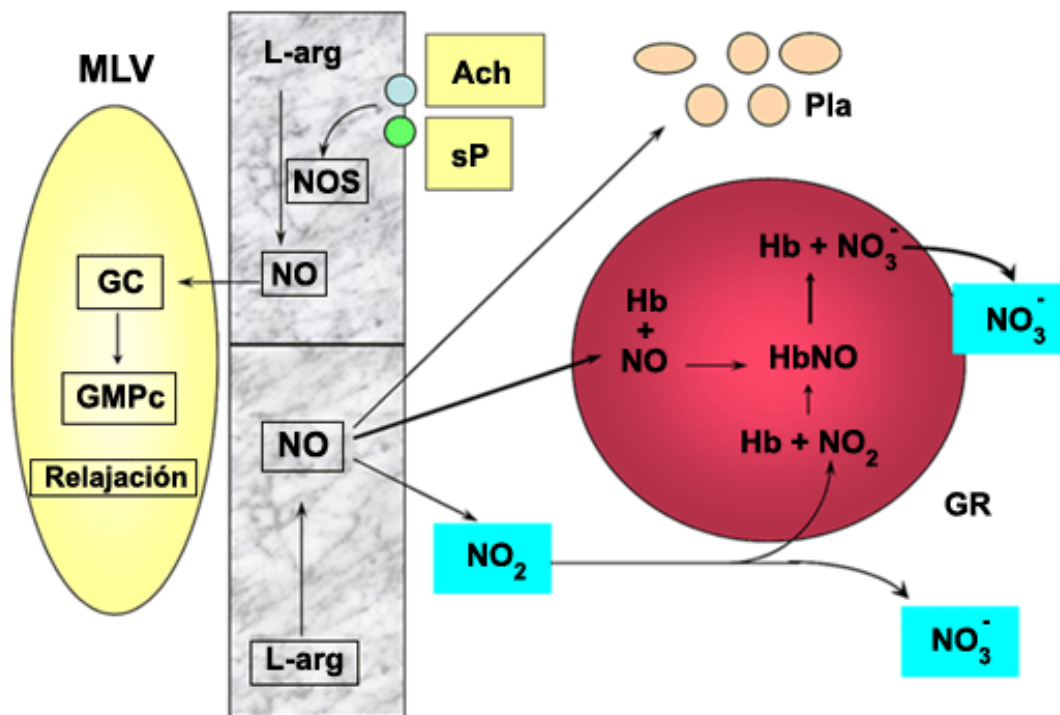
Un factor primordial en la regulación del tono vascular es el óxido nítrico (ON). Esta molécula tiene diversos efectos que confieren protección al vaso sanguíneo (14):

- Vasodilatador (vía relajación de las Células de músculo liso vascular (CMLV))
- Inhibidor de la adhesión y agregación plaquetaria
- Inhibidor de la proliferación de las CMLV
- Inhibidor de la interacción leucocito/endotelio (disminuye las moléculas de adhesión (CAM))
- Antioxidante (compensa los efectos del anión superóxido)

#### SINTESIS CARDIACA DE OXIDO NITRICO

En los cardiomiocitos, el NO es generado por la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS), la cual tiene tres isoformas: Neuronal (nNOS, codificada por el gen NOS1), inducible (iNOS codificada por el gen NOS2) y endotelial (eNOS, codificada por el gen NOS3). iNOS y nNOS son constitutivas y se activan por el complejo  $Ca^{++}$ -calmodulina ( $Ca^{++}M$ ), mientras que la codificada por NOS2 es inducible,  $Ca^{++}$  - independiente y produce NO a mayor velocidad que las otras NOS (iNOS; 105 nmol/s, nNOS y eNOS, 96 y 16 nmol/l respectivamente) (15).





**MLV:** músculo liso vascular; **Pla:** Plaquetas; **GR:** Glóbulo Rojo

- Receptor de Ach
- Receptor de sustancia P

**Figura 6** El Oxido Nítrico liberado desde su sitio de síntesis en este caso el endotelio difunde rápidamente hacia el músculo liso adyacente. Una vez ejercido su efecto o antes de esto, puede difundir hacia la sangre y unirse a otras moléculas, como el grupo Heme de la Hemoglobina, o ser metabolizado a nitratos y nitritos.

## eNOS

Se expresa en el endotelio vascular y endocárdico así como en los cardiomiocitos, los monocitos y las plaquetas. En los cardiomiocitos se localiza en las caveolas del sarcolema y, en particular en los túbulos T. En el miocardio humano predomina en el epicardio del ventrículo izquierdo (VI) y en la aurícula. La eNOS presenta una doble acilación (miristilación en Gly2 y palmitoilación en Cys15 y Cys26) que es necesaria para su anclaje en las caveolas, donde interactúa con las caveolinas-1 (células endoteliales) y 2 (cardiomiocitos) que la inactivan <sup>(16)</sup>.

La producción del óxido nítrico por células endoteliales es estimulada por fuerzas mecánicas incluyendo las fuerzas de rozamiento y también por la exposición a agonistas dependientes de receptores como la acetilcolina, adenosindifosfato, bradicinina, trombina y serotonina (figura 6). El óxido nítrico producido, difunde a la pared del vaso y produce vasodilatación mediante la activación primaria de guanil ciclasa y el incremento intracelular de guanosinmonofosfato ciclica (cGMP) en las células musculares lisas. También puede producir vasodilatación por mecanismos no dependientes de cGMP tales como la activación de canales iónicos de calcio dependientes de potasio. Además, el

óxido nítrico inhibe la agregación plaquetaria, inhibe la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular; e inhibe la proliferación de las células musculares lisas por tanto, una disminución en el ON promueve formación de la neointima endotelial. (17)

En la circulación coronaria, las fuerzas de rozamiento aumentadas provocan vasodilatación en vasos angiográficamente normales, y además el efecto no es solo en vasos de capacitancia (epicárdicos), sino también ejerce la misma acción en los vasos coronarios intramiocárdicos (de resistencia), esta respuesta vasodilatadora de las coronarias es dependiente de la síntesis de ON ya que la vasodilatación por acetilcolina y otras sustancias agonistas de eNOS como la sustancia P y bradicinina, son también inhibidas por la infusión concomitante el inhibidor de eNOS N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA). (18,19)

Estos efectos también se observan en arterias periféricas como las braquiales, con respuesta a las fuerzas de rozamiento y las sustancias vasodilatadoras mencionadas anteriormente, de hecho, la vasodilatación inducida por ejercicio y la dilatación postisquémica de los vasos de resistencia del antebrazo también depende en parte del ON en los humanos. (20)

### EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA EN EL GEN NOS 3

Además de los factores de riesgo clásicos, existe también evidencia de la posible participación de alteraciones genéticas en la disfunción endotelial, una de ellas es el polimorfismo Glu298Asp del gen NOS3 (20,21).

La eNOS es codificada por el gen NOS3, que tiene 26 exones y está localizado en el cromosoma 7q35-36, (figura 7) ésta enzima es constitutiva del endotelio, donde en presencia de calcio interactúa con calmodulina y se activa para sintetizar el óxido nítrico (22).



**Figura 7.** cromosoma 7q35-36 NOS3. Tomado de WWW. PubMedCentral/tabid/93

Sabemos que un polimorfismo es una variación en la secuencia del DNA (alelo), en un gen determinado y dicha variación ocurre en más del 5% de la población general; estos polimorfismos ocasionan alteraciones en las funciones de las proteínas traduccionales. Se han descrito varios polimorfismos del gen NOS3 que causan variaciones en la bioactividad de la eNOS, lo que contribuye a patología cardiovascular, por ejemplo, los ratones knock-out para eNOS son hipertensos y se esperaría igual en el modelo humano, pero los resultados no son consistentes para polimorfismos en las regiones del intron del gen; sin embargo existe una mutación de una sola base (SNP) con frecuencia mayor del 5% en la población (polimorfismo) en el exón 7 de gen de la eNOS producido por un cambio de guanina por Timina en la posición 894 (G894T), lo que traduce en la sustitución de un aminoácido de Glutamina por Asparagina en la posición 298, Glu298Asp en la enzima sintetasa endotelial del óxido nítrico, y ésta sustitución

promueve disminución en la función de la enzima; este polimorfismo está asociado con hipertensión, angina vasoespástica (OR 2.83, intervalo de confianza 95% 1.25-6.41,  $p=0.009$ ) e infarto agudo del miocardio, sin embargo estas observaciones fueron en población japonesa, y no existe consistencia de estas asociaciones con otros grupos étnicos como los caucásicos, turcos, italianos y griegos, mientras que en la población latinoamericana sólo se encuentra un reporte de Chile, donde se estudia este polimorfismo y la cardiopatía isquémica secundaria a aterosclerosis, con resultados que sugieren que no existe dicha asociación, OR=1.5; IC 95% 0.87-2.59,  $p>0.05$ . (23).

Recientemente fue publicado un estudio de la asociación del polimorfismo Glu298Asp de la eNOS con flujo coronario lento en población Turca, donde se incluyeron a 85 pacientes 66 de los cuales tenían flujo coronario lento y 19 pacientes con flujo coronario normal. No se encontró asociación del polimorfismo genético con flujo coronario lento en esta población. (24)

Del mismo modo existen estudios que reportan la asociación del polimorfismo Glu298Asp, T786C y 4a/4b con la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) como factores predisponentes para hipertensión, isquemia, enfermedad cardíaca y daño renal, posiblemente por la reducción en la generación de ésta sustancia (ON), considerada una sustancia biología fundamental en la fisiología cardiovascular y renal. (25)

De manera paulatina se ha estudiado cada vez mas a este gen y la asociación del polimorfismo con enfermedad isquémica por lo que hoy en día encontramos estudios incluso en población latina como es el caso de Chile donde en el 2006 se reportan 112 pacientes y 72 controles a los que se determinó el polimorfismo por técnica de PCR, sin encontrar relación como factor de riesgo para cardiopatía isquémica. (26)

Por otro lado este polimorfismo se ha asociado no sólo a cardiopatía isquémica, también se han realizado estudios donde se relaciona con evento vascular cerebral, preeclampsia y disfunción eréctil este último en la población mexicana, permanece incierta la relación con diabetes mellitus ya que a la fecha no han sido descritas las interacciones del gen con la diabetes. (27)

Se han publicado dos meta-análisis en los que se encuentra asociación entre el polimorfismo Glu298Asp y la enfermedad coronaria determinando una adecuada magnitud de la asociación (odds ratio 1.17 Intervalo de confianza 95% 1.07, 1.28,  $p<0.05$ ; y OR 1.31; IC 95% 1.13 a 1.51). (28)

Existen otros polimorfismos en los que se ha encontrado asociación con la cardiopatía isquémica, sin embargo éstas asociaciones son aún más débiles y más inconsistentes entre los estudios. (29)

Los estudios que habían sido publicados se habían enfocado a demostrar la asociación entre el polimorfismo y la cardiopatía isquémica aterosclerosa, sin embargo en mayo del 2009, encontramos finalmente investigación que estudia la asociación del polimorfismo Glu298Asp con el flujo coronario lento en una población turca, y encontraron que la distribución del genotipo del Glu298Asp fue GG: 26%, GT 56% y TT 12% y no difiere significativamente entre el grupo de sujetos con coronarias con flujo lento ( $n=66$ ) y los sujetos con flujo normal y sin lesiones ( $n=19$ ), concluyen que en la población turca, éste polimorfismo no es un factor de riesgo para el desarrollo de flujo coronario lento. Una posible causa que explica la

falta de asociación es el tamaño muestral puesto que nuestro grupo de investigadores ha hecho el cálculo del poder de la muestra y vemos que este llega apenas a 0.12, y entonces determinamos que se necesitarían al menos 240 sujetos por grupo para poder determinar si existe asociación. (30)

Sabemos que la cardiopatía isquémica es un problema mundial de salud pública, representa en nuestro país la primera causa de muerte (31).

La mayoría de los enfermos con cardiopatía isquémica tienen una etiología aterosclerosa, sin embargo también existen otras causas de cardiopatía isquémica diferente a la aterosclerosis como la disfunción endotelial, ectasia coronaria, traumatismos, estados protrombóticos y enfermedades autoinmunes.

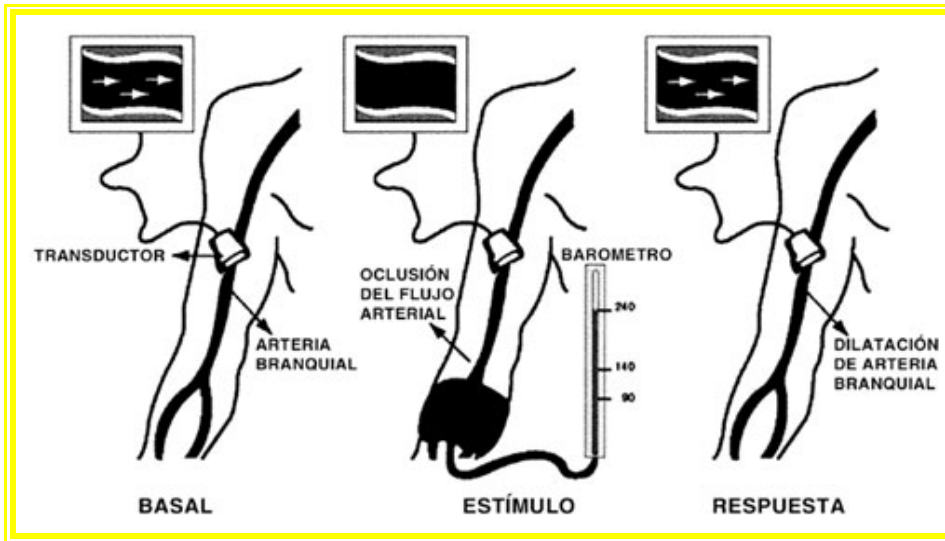
(32)

En la práctica clínica se encuentra un grupo de pacientes, en su mayoría mujeres, con cardiopatía isquémica crónica, diagnosticada por criterios clínicos convencionales (dolor tipo anginoso con estudios inductores de isquemia o gammagrafía de perfusión), y/o aguda (angina inestable, e infarto agudo del miocardio que se ha llegado a presentar con complicaciones del mismo) y que bajo estas circunstancias, tanto en su forma estable (angina crónica o angina estable) o aguda (angina inestable e infarto del miocardio) son sometidos a angiografía coronaria, encontrando arterias sin lesiones aterosclerosas angiográficas, estos casos en que no hay un sustrato obstructivo coronario la disfunción del endotelio es la causa. Es importante mencionar que el diagnóstico clínico es el síndrome isquémico (crónico o agudo) y la presentación es siempre semejante independientemente de la etiología, y en la práctica clínica no es posible distinguir (hasta ahora) mediante criterios clínicos, eléctricos, ecocardiográficos o gammagráficos si es secundario a un proceso de aterotrombosis, disfunción endotelial, ectasia, embolismo, etc., de tal forma que el diagnóstico etiológico se hace en base a la angiografía coronaria (33,34). ya que al no haber lesiones coronarias en presencia de cardiopatía isquémica demostrada por algún método inductor de isquemia se puede suponer que el problema se encuentra a nivel de la microvasculatura con disfunción de estas arterias que por lo general son intramiocárdicas (34)

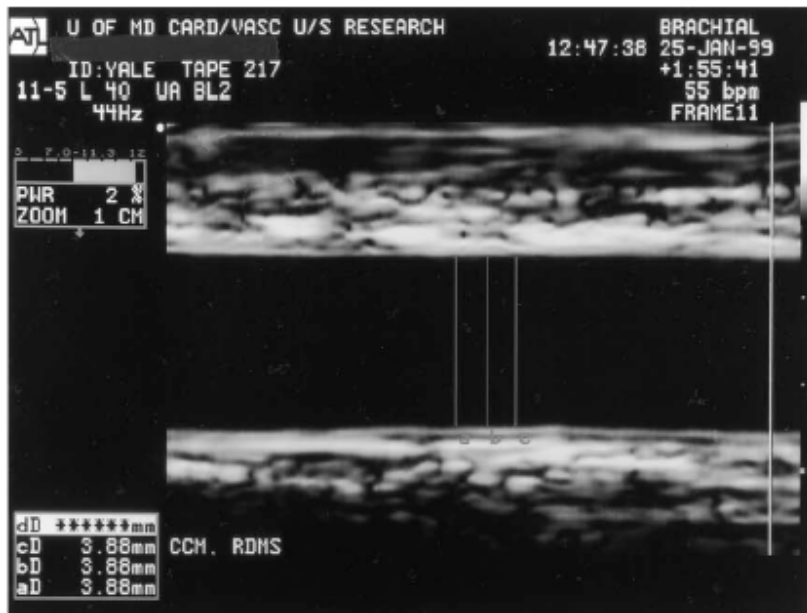
#### MEDICIÓN DE LA REACTIVIDAD VASCULAR (FUNCIÓN ENDOTELIAL).

La evaluación de la disfunción endotelial, en su vertiente de vasorreactividad, es una herramienta útil y validada, es decir, la función endotelial es un fenómeno medible, y se han desarrollado varios métodos: estudios intracoronarios (administración de acetilcolina intracoronaria, y el evidente flujo lento o datos de ello como el vasculamiento del medio de contraste), tomografía por emisión de positrones, pletismografía, ultrasonido braquial (figura 9,10,11) y estudios venosos. (35)

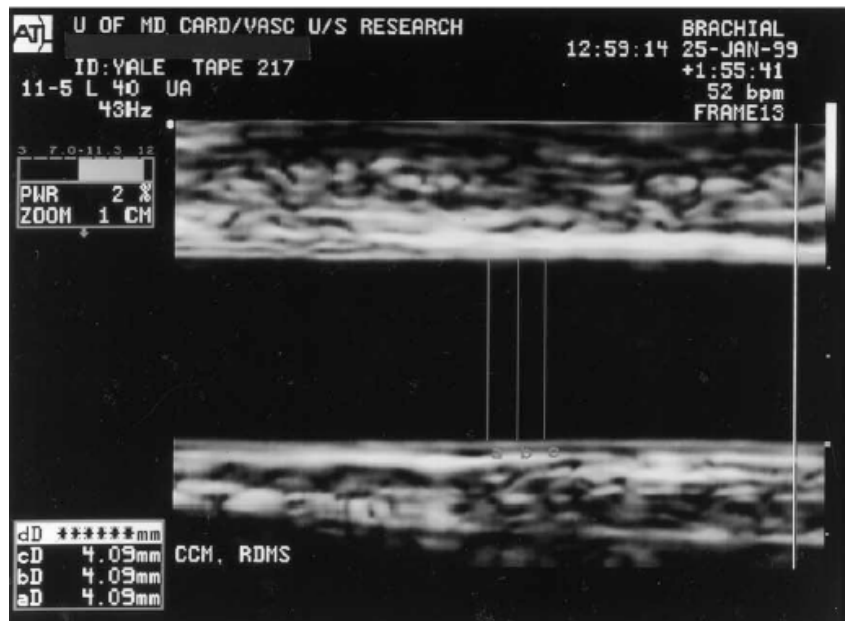
La dilatación arterial braquial inducida por flujo sanguíneo disfuncional se corresponde con una función endotelial coronaria lo que sugirió que un estudio no invasivo en el brazo tiene relevancia clínica en la coronariopatía.



**Figura 8.** Técnica del estudio para disfunción endotelial con ultrasonido de la arteria Braquial. Tomado de . J Am Coll Cardiol 2002;39: 257–65.



**Figura 10.** Imagen ultrasonográfica de la arteria braquial, diámetro de base, tomado de Am Coll Cardiol 2002;39: 257–65.



**Figura 11.** Imagen ultrasonográfica de la arteria braquial, diámetro tomado 1 minuto después del estímulo, tomado de Am Coll Cardiol 2002;39: 257-65.

**Tabla 1.** Factores que regulan la actividad de las óxido nítrico sintasas cardiacas

NOS 1 Aumenta	Hsp90, calmodulina, HIF, Hipoxia aguda y crónica, Enalapril.
NOS2 Aumenta	Noradrenalina, Isoproterenol, Citocinas (IL1B), TNFa, INF gamma, LPS) Hipoxia aguda y crónica Estrógenos, estatinas Hiperglucemia
NOS2 disminuye	DistensiónCorticoides, Bosentán, Aldosterona, Ciclosporina A, Ac. Retinoico Akt, PKA, PKG, PKC, calmodulina, dinamina-2
NOS3 aumenta	Cizallamiento, distensión, Hsp90, estimulación cardiaca, monóxido de carbono, hipoxia aguda Acetilcolina, adenosina, aniotensina II, agonistas de receptores (B1-2 adrenérgicos, AT1-angiotensina II, a1A-adrenérgico y 5-HT2B) Bradicinina, estrógenos, histamina, insulina, serotonina, sustancia P, estatinas, Ciclosporina A.
NOS3 disminuye	Caveolinas 1 y 3, NOSTRON, LDL, LPS, TNF2a, radicales libres ADMA, PKC, Endostatina, hipoxia crónica Hiperglucemia, productos de glucosilación avanzada, DM1 Corticoides, eritropoyetina, andotericina, milrinona

ADMA: Dimetilarginina asimérica, HIF: factor de transcripción inducible por hipoxia, IL: interlequina, INF: interferón, NOS: Óxido nítrico sintasa, PLS: lipopolisacáridos, TNF: factor de necrosis tumoral.

## Justificación del Estudio

La cardiopatía isquémica es una de las principales causas de muerte y el mayor problema de salud pública en el mundo. En enero del 2008 se publicó el estudio CARMELA (Cardiovascular Risk Factors Multiple Evaluation in Latin America), donde se encuentra que la población mexicana en comparación con otros países latinos tiene más riesgo de sufrir infartos de miocardio y mayor índice de Diabetes Mellitus y obesidad.

La disfunción endotelial se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y aterosclerosis y esta relacionada de manera integral con la patogénesis de la cardiopatía isquémica, asociándose a un incremento en el riesgo de Infarto de Miocardio y Enfermedad Vascular Cerebral.

El óxido nítrico es una de las principales sustancias vasoactivas en el cuerpo humano, en los cardiomiocitos su producción depende de 3 isoformas de la Óxido Nítrico Sintasa, estas son la neuronal, inducible y endotelial, esta última conocida como eNOS o NOS3 y como su nombre lo indica, se sintetiza en el endotelio vascular y endocárdico, además de esto se sintetiza también en el interior de monocitos y plaquetas, en modelos animales la expresión es 15 veces más a nivel de la microcirculación que a nivel de las arterias epicárdicas. Sus principales efectos son como vasodilatador y anti-inflamatorio.

Los pacientes con polimorfismo Glu298Asp de la eNOS produce una reducción en la biosíntesis de óxido nítrico. Existe evidencia de que la disfunción endotelial es el paso inicial en el desarrollo de aterosclerosis coronaria a través de estudios clínicos que evalúan una potencial asociación entre el polimorfismo de eNOS y riesgo de enfermedad cardiovascular, la mayoría de estos estudios se han realizado en población caucásica y no hay estudios de asociación de factores de riesgo genéticos en la cardiopatía isquémica no aterosclerótica en la población mexicana lo que constituye una nueva línea de investigación

## Pregunta de investigación

¿Cuál el riesgo de tener disfunción endotelial dado que se es portador de factores de riesgo cardiovascular clásicos en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa?

¿Cuál es la asociación que existe entre el polimorfismo Glu298Asp del NOS3 y la disfunción endotelial en los pacientes con cardiopatía isquémica no aterosclerosa y sin ésta?

¿Cuáles son los factores de riesgo (clásicos y genéticos) independientes para la presencia de disfunción endotelial?

## Hipótesis

El riesgo de disfunción endotelial dado que se es portador de hipertensión, diabetes y dislipidemia será al menos 1.5 en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

Los sujetos portadores del polimorfismo Glu298Asp del NOS3 tendrán mayor probabilidad de presentar disfunción endotelial en sujetos con cardiopatía isquémica no aterosclerosa y sin ésta.

Al menos la hipertensión arterial será un factor de riesgo independiente para la presentación de disfunción endotelial en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.



Objetivos.

**OBJETIVO GENERAL:**

Determinar los factores de riesgo clásicos que se encuentran asociados con la disfunción endotelial en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

Explorar la relación que existe entre el polimorfismo Glu298Asp del NOS3 y la disfunción endotelial en pacientes con cardiopatía isquémica no aterosclerosa y sin ésta.

Determinar qué factores de riesgo clásicos y genéticos tienen asociación independiente con la disfunción endotelial.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Determinar y comparar la frecuencia de hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, y dislipidemia en sujetos con y sin disfunción endotelial que tengan o no cardiopatía isquémica no aterosclerosa.
- Determinar y comparar la frecuencia de disfunción endotelial en sujetos con cardiopatía isquémica no aterosclerosa y sin ésta.
- Determinar y comparar la frecuencia de genotipos y frecuencia alélica del polimorfismo Glu298Asp en sujetos con y sin disfunción endotelial que tengan o no cardiopatía isquémica no aterosclerosa.
- Explorar el riesgo de disfunción endotelial en los portadores de hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, tabaquismo y polimorfismo Glu298Asp en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.
- Determinar si el riesgo de disfunción endotelial en los portadores de hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, tabaquismo y polimorfismo Glu298Asp es independiente en sujetos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.
- Determinar el tamaño muestral de acuerdo a la frecuencia de fenotipos y frecuencia alélica de nuestra población para determinar si existe o asociación entre el polimorfismo Glu298Asp y la disfunción endotelial y la cardiopatía isquémica.

## Metodología

Población Diana: Todos los sujetos con disfunción endotelial con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

Población Accesible: Todos los sujetos con disfunción endotelial con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa que ingresen al hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Diseño muestral:

- Mediante muestreo No Aleatorio, de casos consecutivos se incluyeron sujetos desde mes de Enero 2007 a Diciembre del 2008.
- Tamaño de la Muestra:
  - Se calculó el tamaño de la muestra en base a los antecedentes descritos en otras poblaciones (ya que en nuestra etnia no existen estudios de asociación con ésta patología); mediante el método para diferencia de proporciones, con un valor crítico (alfa) 0.05, poder estimado a priori 0.80 y un aumento del 20% de potenciales pérdidas, se determinó un tamaño de muestra de:
  - 240 casos
  - 240 controles

Dado que se propuso el presente estudio como una fase piloto para estudiar la posible asociación del polimorfismo en nuestra población, se realizó un corte para el análisis al tener reclutados 50 participantes en cada grupo.

Criterios de Inclusión:

Edad  $\geq 18$  años.

Cualquier género.

Pacientes con cardiopatía isquémica no aterosclerosa con flujo lento coronario (TIMI < III), demostrada por estudios inductores de isquemia.

Sujetos sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa, demostrada por estudios inductores de isquemia.

Todos los sujetos con al menos tres generaciones previas con familiares directos mexicanos.

Que hayan aceptado su participación previa firma del consentimiento informado.

Criterios de Eliminación:

Sujetos con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa que no tuvieran adecuada ventana en el ultrasonido braquial.

Descripción general del estudio:

Para la inclusión de pacientes con cardiopatía isquémica no aterosclerosa se seleccionó de la lista de procedimientos de hemodinámica a los pacientes con cardiopatía isquémica no aterosclerosa, éstos pacientes que fueron diagnosticados por médicos cardiólogos adscritos al Hospital de Cardiología Centro Médico Nacional demostrada por cuadro clínico, electrocardiográfico y algún estudio inductor de isquemia eléctrico o perfusorio y que al cateterismo se encontraran con arterias coronarias normales y flujo lento.

Los sujetos sin cardiopatía isquémica se obtuvieron de base poblacional, invitándoles al estudio con previa firma de consentimiento informado.

Se analizó hacia atrás en el tiempo mediante interrogatorio directo y por búsqueda de expedientes, y se obtuvieron los datos demográficos, historia clínica y teléfono; se les invitó a participar, se firmó el consentimiento informado y finalmente se les citó para realizar:

1. Ultrasonido doppler de la arteria humeral de acuerdo a las guías para la valoración ultrasonográfica de vasodilatación de la arteria braquial, mediada por flujo dependiente del endotelio técnica de Celermajer. <sup>(37)</sup>
  - a) Debido a que varios factores afectan la reactividad vascular mediada por flujo, incluidos la temperatura, alimentación, drogas y estimulación simpática, se les pidió a los pacientes ayuno de 8 a 12 horas y se realizó el estudio en un cuarto cerrado sin ruido y con adecuada temperatura. Se suspendieron los medicamentos vasoactivos por al menos 4 vidas medias. Se evitó el ejercicio y las sustancias que afectan la vasodilatación mediada por flujo como la cafeína, comidas ricas en grasas, vitamina C y tabaco.
  - b) Se utilizó un equipo de ultrasonido dotado con software vascular, de 2 dimensiones, espectro doppler y color, además de un transductor vascular de alta frecuencia (7MHz) en el hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI con la ayuda de un médico de base de nuestro hospital que se encuentra realizando Maestría en Ciencias Médicas (Dra. Alicia Contreras).
  - c) En cuanto a la adquisición de imágenes se posicionó a los pacientes en decúbito supino, con la mano y brazo en posición confortable y con el transductor colocado en el plano longitudinal de la fosa antecubital se localizó a la arteria humeral, en imagen de 2D, doppler y color, se tomó el diámetro máximo en onda sistólica. Se utilizó el manguito de un esfigmomanómetro insuflando 50mmHg por arriba de la presión sistólica basal para interrumpir el flujo de la arteria humeral durante un tiempo estandarizado de 4 minutos, corroborando de manera simultánea con las imágenes ultrasonográficas. Al desinflar existe un breve periodo de alto flujo y el estrés que este produce sobre la pared vascular que en condiciones normales causa dilatación de la arteria humeral, por lo que se procedió a medir el diámetro de la arteria un minuto después de haber desinflado el manguito del esfigmomanómetro. La prueba de función endotelial es normal cuando existe un aumento en el diámetro de la arteria al menos el 10% del basal y anormal es decir sugiere disfunción endotelial cuando no hay vasodilatación mayor al

10% del diámetro basal después de 1 minuto de haber desinflado el manguito de la presión arterial.

2. Toma de muestra sanguínea para análisis genético del polimorfismo Glu298Asp. (figura 12)

- a) La muestra fue tomada en ayuno, extrayendo sangre de la vena antecubital 10 ml de sangre total en tubos conteniendo EDTA (ácido etilendiamino-tetracético). Se centrifugó a 2500rpm por 10 minutos. Posteriormente el plasma se retiró cuidadosamente tratando de no perturbar la capa de células mononucleares (buffy coat) la cual fué transferida con una pipeta de plástico estéril a un tubo de plástico eppendorf estéril de 1.5 ml libre enzimas (RNAsas y DNAsas) y se utilizó para la obtención de ADN.

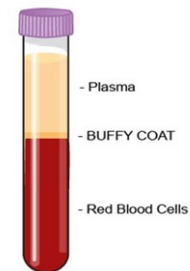
## METODOLOGIA



### Toma de muestra



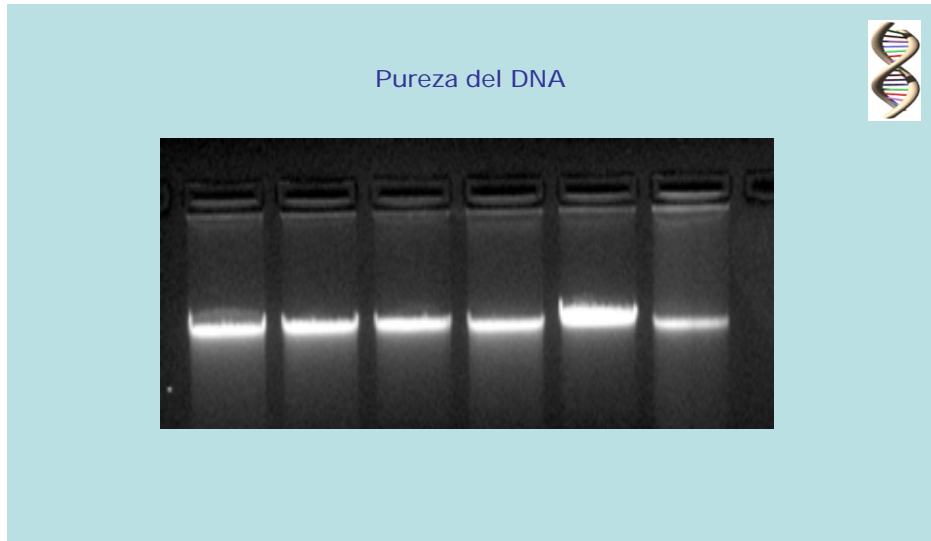
### Extracción de la muestra sanguínea (paquete leucocitario)



Centrigugación 2500 g/ 10 min.

**Figura 12.** Toma de Muestra

- b) Extracción y determinación de la pureza de ADN: Se utilizó el equipo comercial (Qiagen QIAamp DNAMini Kit) de acuerdo a las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el ADN se procedió a su conservación en un refrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta que fue utilizado para la amplificación de los segmentos correspondientes. Se visualizó pureza de ADN. (figura 13).



**Figura 13.** Pureza del DNA

Genotipificación de la enzima sintetasa del oxido nítrico: Posterior a la extracción de ADN, se llevó a cabo la reacción de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (sentido) 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' y (contrasentido) 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGGTCAC-3', así como el uso de 200ng de ADN, 10 pmol de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP, 3 mM de cloruro de magnesio, 1.0 U de pfu DNA polimerasa, en un volumen final de 50µl. Las condiciones térmicas consistirán en desnaturalización a 94°C por 30 seg., alineación a 60°C por 30 seg. y una extensión a 72°C por 30 seg., por 30 ciclos. (figura 14).



**PCR**

Oligonucleótidos específicos:

(sentido)

5'- CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3'

(contrasentido)

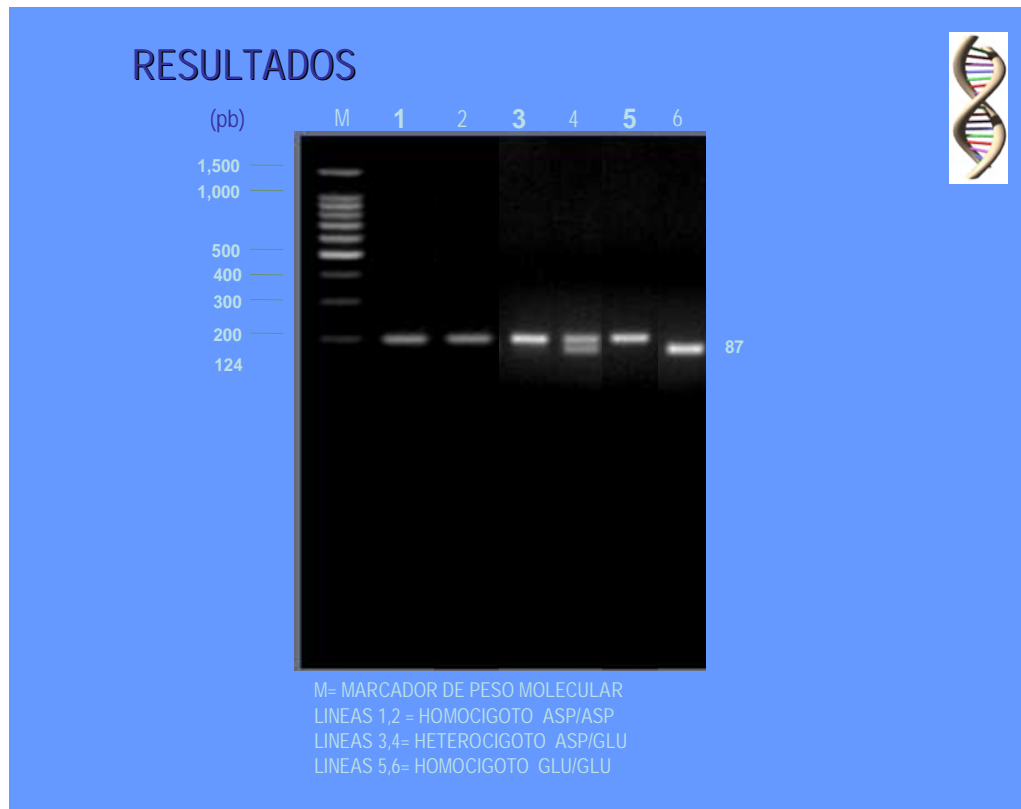
5'- AGTCAATCCCTTTGGTGGTCAC-3'

Condiciones térmicas:

Desnaturalización a 94°C/30seg	30 ciclos
Alineación a 60°C/30seg.	
Extensión a 72°C/ 30 seg.	

**Figura 14.** PCR

Identificación de fragmentos polimórficos: El producto de la PCR se sometió en partes iguales a digestión con las enzimas de restricción BanII y MboI respectivamente por 16 h a 37°C. El producto obtenido de 206 pb bajo la acción de la enzima BanII produjo dos fragmentos uno 124pb y uno menor de 82pb en la presencia de un nucleótido G en la posición 894 (correspondiendo al alelo Glu298), mientras que en la segunda reacción el mismo producto de 206pb con la enzima MboI generó dos fragmentos uno 119bp y uno de 87pb en la presencia de un nucleótido de T en la misma posición 894 el cual corresponde a un alelo Asp 298. Los productos obtenidos de la restricción se visualizaron en un gel de agarosa al 2.5% y teñido con bromuro de etidio. (figura 15).



**Figura 15.** Resultados: M=Marcador de peso molecular. Líneas 1,3 y 5=Producto de PCR de 206 pares de bases (PB). Línea 2=producto de PCR restringido, sujeto homocigoto Asp/Asp. Línea 4=Bandas 206 y 124 pares de bases, sujeto heterocigoto Asp/Glu Línea 6=Producto de PCR restringido 87 PB Sujeto HomocigotoGlu/Glu.

## DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA REALIZACION DEL PROTOCOLO

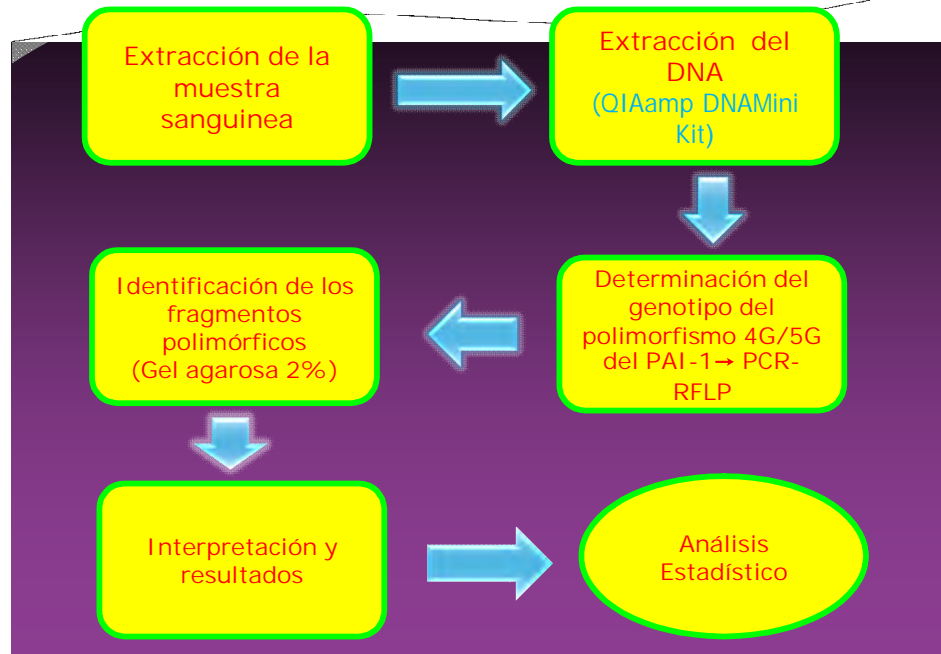


Figura 16. Diagrama de Flujo

### DESCRIPCIÓN DE VARIABLES:

#### Variables Independientes:

##### 1. Hipertensión Arterial Sistémica:

- Definición Conceptual: elevación de la tensión arterial sistólica arriba de 140mmHG o de la tensión arterial diastólica arriba de 90 mmHg en mediciones repetidas.
- Definición Operacional: es la presencia de diagnóstico previo o durante la revisión de cifras tensionales sistólicas igual o mayor a 140mmHg o diastólicas igual o mayor a 90mmHg en mediciones repetidas, o bien cifras de tensión arterial normales pero bajo efecto de tratamiento antihipertensivo.
- Tipo de Variable: cualitativa
- Escala de Medición: nominal, dicotómica
- Unidades de Medición: si/no

##### 2. Diabetes Mellitus:

- Definición Conceptual: elevación de la glucemia sérica igual o mayor de 126 mg/dL en ayuno de al menos 6 horas, o bien 200mg/dl o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas.

- b) Definición Operacional: es la presencia del diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de glucemia igual o mayor de 126 mg/dL en ayuno de al menos 6 horas, o bien 200mg/dl o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas; o bien cifras normales de glucemia bajo tratamiento hipoglucemiante.
- c) Tipo de Variable: cualitativa
- d) Escala de Medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: si/no

### 3. Dislipidemia:

- a) Definición Conceptual: elevación de los niveles séricos de colesterol total arriba de 200mg/dL o de triglicéridos arriba de 160mg/dl, LDL mayor de 130mg/dl o HDL menor de 45 mg/dl en hombres y de 40 mg/dL en mujeres.
- b) Definición Operacional: es la presencia del diagnóstico previo de dislipidemia o durante la revisión de cifras de colesterol total arriba de 200mg/dL o de triglicéridos arriba de 160mg/dl, LDL mayor de 130mg/dl o HDL menor de 45 mg/dl en hombres y de 40 mg/dL en mujeres; o cifras normales pero bajo efecto de medicación hipolipemiente.
- c) Tipo de Variable: cualitativa
- d) Escala de Medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: si/no

### 4. Tabaquismo:

- a) Definición Conceptual: consumo de cigarrillo en cualquier época de la vida de un cigarrillo/día al menos durante un año; o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menos un año.
- b) Definición Operacional: es la presencia del antecedente de haber consumido antes o actualmente cigarrillos en cantidad de uno al día por al menos un año, o bien el antecedente de exposición pasiva al humo producido por la combustión de cigarrillos al menos durante un año.
- c) Tipo de Variable: cualitativa
- d) Escala de Medición: nominal, dicotómica
- e) Unidades de Medición: si/no

### 5. Sobrepeso:

- a. Definición Conceptual: es la presencia de peso corporal mayor al esperado de acuerdo al resto de las características antropométricas.
- b. Definición operacional: es la presencia de un índice de masa corporal >25 pero menor a 30 m<sup>2</sup>SC.
- c. Tipo de variable: cualitativa
- d. Escala de medición: nominal, dicotómica.
- e. Unidades de medición: si/no

### 6. Obesidad:



- a. Definición Conceptual: peso corporal secundario al acúmulo de tejido adiposo que confiere un índice de masa corporal  $>30 \text{ m}^2\text{SC}$ .
  - b. Definición operacional: es la presencia de peso corporal secundario al acúmulo de tejido adiposo que confiere un índice de masa corporal  $>30 \text{ m}^2\text{SC}$ .
  - c. Tipo de variable: cualitativa
  - d. Escala de medición: nominal, dicotómica.
  - e. Unidades de medición: si/no
7. Polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS
- a) Definición conceptual: variación en la secuencia del DNA, en el gen de la eNOS que variación ocurre en más del 5% de la población general, con la sustitución de un Glu por Asp en la posición 298.
  - b) Definición Operacional: es la presencia de la variación en la secuencia del DNA, en el gen de la eNOS que variación ocurre en más del 1% de la población general, con la sustitución de un Glu por Asp en la posición 298, tanto en su variedad homocigota como heterocigota.
  - c) Tipo de Variable: cualitativa
  - d) Escala de Medición: nominal, dicotómica
  - e) Unidades de Medición: si/no

Variable Dependiente:

- 1. Disfunción endotelial:
  - a) Definición conceptual: es la alteración de la función endotelial normal, manifestada por tendencia a la inflamación, aterotrombosis y desregulación del tono vasomotor.
  - b) Definición operacional: de determinó que existe disfunción endotelial cuando a la prueba de medición de reactividad vascular mediada por flujo (técnica de Celermarjer) no se encuentre un aumento de diámetro  $\geq 10\%$  sobre el basal, o bien exista disminución del mismo.
  - c) Tipo de variable: cualitativa, nominal
  - d) Escala de medición: dicotómica (si/no).

Variables Potencialmente confusas:

- 1. Edad:
  - a) Definición conceptual: es el tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de un sujeto hasta el momento actual y que éste permanece con vida.
  - b) Definición operacional: Periodo de tiempo que ha vivido el paciente desde su nacimiento hasta el momento del estudio
  - c) Tipo de variable: cuantitativa, continua.
  - d) Unidades de medida: años
- 2. Genero:
  - a) Definición conceptual: es la expresión fenotípica de la presencia de cromosoma XY o XX (hombre o mujer respectivamente).

- b) Definición operacional: es la expresión fenotípica de la presencia de cromosoma XY o XX (hombre o mujer respectivamente).
- c) Tipo de variable: cualitativa, nominal
- d) Escala de medición: dicotómica, hombre/mujer.

Diseño del Estudio.

Se realizó un estudio de casos y controles:

- Observacional
- Longitudinal-retrospectivo
- Analítico
- Ambilectivo

#### Análisis estadístico:

Se realizó análisis exploratorio en el que se determinó la distribución de las variables cuantitativas continuas con la prueba de Shapiro Wilk para grupos menores de 50 sujetos y con Kolmogorov-Smirnoff para el grupo con menos de 50 sujetos. El análisis descriptivo se muestra con medidas de tendencia central y dispersión (mediana con rango intercuartílico) para las variables cuantitativas continuas; las variables cualitativas (nominales) se muestran con el número absoluto y porcentaje.

El análisis bivariado (contraste entre grupos) se llevo a cabo con  $X^2$  para las variables nominales, y en caso de tener frecuencia observada  $\leq 5$  se realizó Prueba Exacta de Fisher. La prueba estadística U de Mann Whitney se usó para comparar las medianas entre grupos.

Se realizó cálculo de razón de momios con intervalo de confianza al 95%.

Para determinar el efecto de cada una de las variables independientes que se investigaron se realizó análisis multivariado mediante regresión logística binaria, el contraste de modelos se llevó a cabo mediante prueba de Hosmer-Lemeshow.

El nivel  $\alpha$  fue 0.05 mientras que el poder de la muestra estimado a priori fue 0.80.

También se realizó un análisis similar para el subgrupo de enfermos con cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

El criterio de entrada a la regresión fue por antecedentes teóricos sólidos y también por criterio estadístico (entrada  $p \leq 0.20$ , salida  $p > 0.05$ ).

#### Consideraciones Éticas.

Se trata de un estudio observacional (no existe una maniobra impuesta por el investigador).

Los procedimientos que se harán son solamente una obtención de sangre venosa periférica mediante punción de una vena antecubital superficial, y el riesgo del estudio se considera como mínimo de acuerdo a la ley general de salud. El ultrasonido vascular no representa ningún riesgo para el sujeto.

Se habló con los pacientes para firmar una carta consentimiento informado (ver mas adelante), explicando que los resultados genéticos serán otorgados solamente a ellos mismos siempre y cuando así lo soliciten y se buscará que esta información sea bajo consejo de expertos en genética y apoyo psicológico en caso de ser necesario y bajo un estricto régimen de confidencialidad.

También se les explicara que de aceptarlo, el resto de material genético aislado será almacenado en una genoteca.

### Cronograma de Actividades

	Enero 2009	Febrero 2009	Marzo 2009	Abril 2009	Mayo 2009	Junio 2009	Julio 2009	Agosto 2009	Sept 2009	Octubre 2009	Nov 2009	Dic 2009	Enero 2010	Febrero 2010
Corrección de Protocolo														
Reclutamiento de Participantes														
Estandarización de procedimientos														
Análisis de Datos														
Presentación de Resultados y Publicación														

### RECURSOS

FÍSICOS	HUMANOS
1. Expediente clínico	1. Investigador principal
2. Electrocardiógrafo	2. Tutores
3. Kit de PCR y equipo comercial (Qiagen QIAamp DNAMini Kit)	3. Cardiólogos clínicos
4. Equipo de Ultrasonido	4. Personal de laboratorio
5. Hojas de recolección de datos	
6. Material bibliográfico	
7. Material de Oficina	
8. Copiadora	
9. Teléfono y línea telefónica	
10. Computadora e impresora personal	
11. Paquete estadístico SPSS 17.0	



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA  
CONSENTIMIENTO INFORMADO**

El presente instrumento tiene por objeto, formalizar y hacer constar el **CONSENTIMIENTO INFORMADO**, del paciente o representante legal para el protocolo de investigación titulado “Factores de riesgo clásicos y genéticos de disfunción endotelial en sujetos mexicanos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa”.

El Suscrito \_\_\_\_\_  
(Paciente, o en su caso, familiar o representante legal) con número de seguridad social (o identificación oficial) \_\_\_\_\_

1. Expreso mi libre voluntad para participar en el protocolo de estudio titulado Factores de riesgo clásicos y genéticos de disfunción endotelial en sujetos mexicanos con y sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa, para efecto de someterme a la realización de estudios que comprenden la obtención de muestras sanguíneas y ultrasonido de la arteria braquial.
2. El Dr. Gerardo Carreón Balcárcel y los doctores Eduardo Almeida Gutiérrez, Irma Isordia Salas me han proporcionado la información completa sobre el procedimiento a realizar.
  - Que el objetivo fundamental es tratar de mejorar mi salud física y mental, evitando al máximo posibles riesgos y complicaciones derivados de las intervenciones o procedimientos realizados.
  - Que se me ha garantizado la salvaguarda de mi intimidad y confidencialidad de mis resultados.
  - También me han expuesto que de no aceptar mi participación, no afectará en ningún rubro mi atención dentro del sistema de salud al que pertenezco.
  - Que se me ha permitido externar todas las dudas que me han surgido derivadas de la información recibida, por lo que manifiesto estar enteramente satisfecho.
3. Ante la información proporcionada, expreso mi **CONSENTIMIENTO LIBRE, ESPONTANEO Y SIN PRESION** alguna para que se realicen los procedimientos requeridos.

México, Distrito Federal \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2009

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente  
Familiar, o representante legal

\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Carreón Balcárcel

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

## Resultados.

Se incluyeron 100 pacientes, 50 de ellos se obtuvieron de los registros hospitalarios con diagnóstico de cardiopatía isquémica no aterosclerosa y 50 sujetos sin cardiopatía isquémica.

Cuarenta y tres sujetos (43%) presentaron disfunción endotelial diagnosticada mediante la prueba de reactividad vascular mediada por flujo de Celermarjer, mientras que 57% tuvieron función endotelial normal. La mediana de edad de los pacientes con disfunción endotelial fue de 59 años (rango intercuartílico, RI 52-69), mientras que la mediana de edad en los pacientes con función endotelial normal fue de 58 (41-67.5), sin diferencia significativa en ambos grupos con un valor de  $p=0.52$ . En el grupo de los pacientes con disfunción endotelial 26 fueron de género femenino lo que representa un 60.5% y en el grupo de función endotelial normal 34 (59.6%), sin diferencia significativa en los grupos,  $p=0.93$ .

En cuanto a los factores de riesgo cardiovascular clásicos, el tabaquismo actual en los pacientes con disfunción endotelial y los pacientes con función endotelial normal no tuvo diferencia significativa en ambos grupos,  $p=0.25$  (16% vs. 8.8%); sin embargo el antecedente de tabaquismo si mostró asociación con la disfunción endotelial: en los sujetos con disfunción endotelial 18 (41.9%) vs. 3 (5.3%) en el grupo de función normal,  $p<0.001$ . Tabla 1.

Los parámetros antropométricos, no mostraron asociación con la disfunción endotelial: en la grupo de disfunción endotelial se determino la mediana de la talla en 1.62 m(1.54-1.67m) mientras que en aquellos sujetos con función endotelial normal se determino 1.62 (1.56-1.71),  $p=0.30$ ; la mediana del peso en el grupo de disfunción endotelial fue 74.5 kg (68.5-80.5kg) mientras que en el grupo de función endotelial normal fue 78.0 kg (67.5 – 86.0 kg),  $p=0.22$ ; para estudiar el posible efecto sobre la función endotelial de la interacción entre el peso y la talla usamos la determinación del índice de masa corporal (IMC), la mediana encontrada en el grupo de disfunción endotelial fue 27.75 (25.99 – 31.73) vs. 29.21 (26.85 – 31.37) en el grupo de función endotelial normal ( $p=0.35$ ). La presencia de sobrepeso y/o obesidad no se asoció con a disfunción endotelial ( $p=0.41$ ,  $p=0.52$  respectivamente). Tabla 1.

Los factores de riesgo clásicos de aterosclerosis y cardiopatía isquémica mostraron asociación altamente significativa con la disfunción endotelial. Tabla 1. En el grupo de sujetos con disfunción endotelial se encontró una proporción significativamente mayor de sujetos hipertensos (67.4% vs. 28.1%,  $p<0.001$ ), diabéticos (39.2% vs. 7.0%,  $p<0.001$ ) y dislipidémicos (30.2% vs. 10.5%,  $p=0.01$ ) comparado con los sujetos con función endotelial normal. Los hallazgos en durante la prueba de función endotelial muestran que entre ambos grupos el diámetro basal de la arteria braquial fue similar: 0.39 (0.37-0.42) cm en el grupo de disfunción endotelial, y 0.39 (0.34-0.44) en el grupo de función normal ( $p=0.96$ ). En la segunda medición de los diámetros braquiales (después de

liberar el manguito tras haber estado 4 minutos insuflado 50 mmHg arriba de tensión arterial sistólica basal) se demuestra claramente la diferencia entre el grupo con disfunción endotelial 0.38 cm (0.35-0.43 cm) comparado con el grupo de función endotelial normal 0.46cm (0.40-0.51cm.),  $p<0.001$ . Tabla 1, Grafica 1 y 2.

Con éste tamaño de muestra, no encontramos diferencias significativas en la distribución de los genotipos, sin embargo existe clara tendencia hacia el riesgo en sujetos portadores del genotipo GA. El genotipo homocigoto GG se encontró en el 76.7% de los sujetos con disfunción endotelial, comparado con el 82.5% de los sujetos con función normal ( $p=0.32$ ); la presencia de genotipo heterocigoto GA se encontró en 10 sujetos (23.3%) con disfunción endotelial, mientras que solamente estuvo presente en 9 sujetos (15.8%) de los individuos con función normal,  $p=0.24$ . El genotipo homocigoto AA se encontró en 1 (1.8%) de los sujetos con función endotelial normal, mientras que no se encontró algún caso en el grupo de sujetos con disfunción endotelial,  $p=0.57$ . Tabla 1. Gráfica 3.

Se demostró isquemia en 38 pacientes de el grupo de disfunción endotelial (88.4%) y en 12 pacientes en el grupo de función endotelial normal (21.1%) con una  $p<0.001$ . Tabla 1.

El riesgo crudo de tener disfunción endotelial dado que se tiene antecedente de tabaquismo es 11.96 veces más comparado con aquellos que no fuman (intervalo de confianza 95% 2.49 – 48.09,  $p<0.001$ ). Los sujetos que son portadores de hipertensión arterial sistémica tienen 4.30 veces más riesgo de tener disfunción endotelial comparados con quienes no la padecen (intervalo de confianza 2.25 – 12.55,  $p<0.001$ ). Los enfermos de diabetes mellitus tienen riesgo de 8.66 veces de tener disfunción endotelial comparados con aquellos que no son portadores de la misma (intervalo de confianza 2.65 – 28.37,  $p<0.001$ ). Así mismo, los sujetos con dislipidemia tienen 2.68 veces mas posibilidades de tener disfunción endotelial comparados con aquellos con perfil de lípidos normal (1.27 – 10.70,  $p=0.01$ ). Gráfica 4.

Ninguna de las frecuencias alélicas mostró riesgo estadísticamente significativo de tener disfunción endotelial.

La posibilidad de tener cardiopatía isquémica sin lesiones coronarias dado que se tiene disfunción endotelial es 28.50 comparado con quienes no tienen disfunción endotelial (intervalo de confianza 9.12 – 88.15,  $p<0.001$ ). Gráfica 4.

Al realizar un subanálisis de la asociación de los factores de riesgo con disfunción endotelial solamente en pacientes con Cardiopatía Isquémica No Aterosclerosa, encontramos que de los 50 casos, solamente 38 (76%) tuvieron disfunción endotelial y el resto (12, 24%) función endotelial normal.

En éste grupo, la mediana de la edad de los pacientes con disfunción endotelial fue de 59 (51.75-70.5) vs. 66.5 (56.75-69.25), sin diferencia significativa ( $p=0.42$ ). El género femenino se presentó en 23 (60.5%) comparado con 8 (66.7%) de los sujetos con función endotelial normal ( $p=0.49$ ).

Dentro de los Factores de Riesgo Coronario Clásicos no hubo diferencias significativas que demostraran asociación en éste grupo de enfermos: tabaquismo actual 5 (13.2%) en los pacientes con disfunción endotelial y 1 (8.3%) en el grupo con función endotelial normal,  $p=0.53$ ; antecedente de tabaquismo 18 (47.4%) vs 3(25.6%) respectivamente,  $p=0.17$ ; talla 1.62 m (1.54-1.67) en los sujetos con disfunción endotelial vs. 1.57 m (1.47-1.67) en sujetos con función endotelial normal,  $p=0.22$ ; en los enfermos con disfunción endotelial se encontró una mediana de peso de 73 kg (66.5 - 81.0 kg) comparado con la mediana en el grupo de función endotelial normal de 74 kg (63.75 - 80.0 kg),  $p=0.61$ . El IMC fue 27.68 o mas (25.91-31.59) en la mitad de la población con disfunción endotelial, mientras que en el grupo de función endotelial normal fue 28.34 (25.87 - 35.62),  $p=0.86$ . Los sujetos con sobrepeso fueron 18(48.6%) en los enfermos con prueba de disfunción endotelial anormal, mientras que en el grupo de pacientes con función normal fue 6 (50%),  $p=0.93$ ; mientras que para la obesidad tampoco hubo diferencias significativas entre los grupos 13 (35.1%) vs 4 (33.3%) respectivamente,  $p=0.59$ .

La frecuencia de Hipertensión Arterial fue 28(73.7%) en el grupo de disfunción endotelial y 11 (99.7%) en el grupo de función normal,  $p=0.18$ , y la Diabetes Mellitus se presentó en 14 (36.8%) vs. 4(33.3%) respectivamente,  $p=0.56$ . La dislipidemia estuvo presente en 13 (34.2%) del grupo de disfunción versus 3 (25%) del grupo de enfermos con función endotelial normal,  $p=0.41$ .

En los enfermos con cardiopatía isquémica no aterosclerosa, los niveles séricos de Colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, glucosa, y fibrinógeno, no mostraron asociación con la presencia de disfunción endotelial,  $p=no$  significativa para todos. Tabla 2.

Así mismo, la tensión arterial sistólica, la fracción de expulsión medida por angiografía y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo no fue significativamente diferente entre los grupos de disfunción endotelial de enfermos de cardiopatía isquémica no aterosclerosa. Tabla 2.

Nuevamente, en este grupo de sujetos observamos que el diámetro medido después del desinflado del manguito es significativamente mayor en sujetos con función endotelial normal,  $p<0.001$ . Tabla 2.

Entre los enfermos con isquemia de etiología no aterosclerosa la distribución de los genotipos fue similar (Tabla 2), y con este tamaño muestral no se determinó asociación con la disfunción endotelial. El genotipo GG se encontró en 28 (73.7%) del grupo de casos con disfunción endotelial y 11 (91.7%) en el grupo de casos con función endotelial normal,  $p=0.18$ ; el GA en 10 (26.3%) y 1 (8.3%) respectivamente,  $p=0.18$ ; mientras que el genotipo AA no se encontró en ninguno de los enfermos con isquemia sin lesiones, 0 (0%) vs. 0 (0%),  $p=NA$ .



Discusión.

La Enfermedad Arterial coronaria (EAC) representa la primera causa de morbimortalidad en el mundo.(53) En nuestro país el Instituto de Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reporto a la EAC como la responsable del 19.6% del total de fallecimientos en el 2007, por lo que representa un problema de salud pública. (54) La manifestación clínica más importante de la enfermedad arterial coronaria es el Infarto Agudo del Miocardio (IAM), el cual es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales. (55) Entre los factores ambientales o también denominados modificables tenemos a la Diabetes Mellitus, Hipertensión, Sedentarismo, Obesidad, Dislipidemia, Tabaquismo, así como el incremento en la concentración de fibrinógeno. Sin embargo, aproximadamente de 20% a 60% no se identifican alguno de estos factores de riesgo, por lo que también se ha determinado existe la participación de ciertas variantes genéticas denominadas polimorfismos que han sido asociadas al desarrollo de IAM en algunos grupos étnicos en el mundo. (56).

Sin embargo, más del 90% de los pacientes con EAC tienen lesiones aterosclerosas en las arterias coronarias epicárdicas, poca atención se ha puesto al resto de pacientes que no tienen lesiones coronarias en los estudios angiográficos pero desarrollan cardiopatía isquémica demostrado por distintos métodos diagnósticos inductores de isquemia. En nuestro hospital esta población de pacientes representa aproximadamente del 2 al 6% de los pacientes isquémicos, en los cuales se propone que exista una alteración importante en el componente regulatorio de la vasorelajación endotelial como el óxido nítrico (ON). EL ON es una de las principales sustancias vasoactivas en el cuerpo humano y se obtiene de la transformación de L-Arginina y oxígeno a L -Citulina y ON, mediante la acción de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS). Sus principales efectos son como vasodilatadores y anti-inflamatorios. Existen diversos polimorfismos en el gen que codifica para la enzima eNOS, que han demostrado una asociación con el desarrollo de IAM en diversas poblaciones en todo el mundo, destacando el polimorfismo Glu298Asp (57-60)

Es sabido que este tipo de pacientes presentan disfunción endotelial, por lo cual fue nuestra variable dependiente y es aquí donde se encuentra nuestro campo de estudio, ya que en nuestra población y específicamente en grupos étnicos como el nuestro desconocemos que factores de riesgo tenemos para desarrollar disfunción endotelial, cardiopatía isquémica por este mecanismo y finalmente la complicación mas temida que es el infarto de miocardio. En el estudio Framingham, se valoró por categorías los factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria, pero no se discriminó a aquellos que pudieran ser de etiología no aterosclerosa y con disfunción endotelial.

Es un modelo piloto donde empezamos a estudiar la asociación del polimorfismo Glu298Asp de la NOS3 y los factores de riesgo clásicos para cardiopatía isquémica con este tipo de pacientes. Cabe mencionar que tenemos evidencia en la literatura mundial de esta asociación con resultados controversiales, pero en México no contamos con estudios al respecto.

Se hizo un corte al contar con 50 pacientes y 50 controles, dentro de los resultados encontramos que los factores de riesgo clásicos como el antecedente de tabaquismo, hipertensión arterial, Diabetes mellitus y Dislipidemia estuvieron

estadística y biológicamente asociados, considerándolos también factores de riesgo para disfunción endotelial en nuestra población, esto cobra importancia al momento de considerar que los pacientes con estos factores de riesgo pueden presentar disfunción endotelial y flujo lento a nivel de las arterias coronarias epicárdicas, desde antes de que se presenten lesiones aterosclerosas, en comparación con lo que se pensaba en el pasado donde era necesaria una lesión coronaria por placa aterosclerosa para desarrollar flujos menores a TIMI 3 y por consiguiente un Blush miocárdico inadecuado. Del mismo modo la manifestación clínica de cardiopatía isquémica también fue mayor en los pacientes con disfunción endotelial que los de función endotelial normal.

A todos los casos y controles se les realizó prueba ultrasonográfica para disfunción endotelial de acuerdo a la técnica propuesta por el autor Celermajer en las guías del 2002 (37). En los resultados el diámetro final no se incremento de manera significativa es decir mas del 10% en los pacientes con disfunción endotelial en comparación con los que presentaban función endotelial normal con una p estadísticamente significativa de <0.001. Esto nos confirma la utilidad de la prueba para el diagnostico de disfunción endotelial, lo cual puede ser de utilidad en nuestro hospital al ser rápida, económica, no invasiva y sin riesgos mayores como en el caso de la administración de medicamentos intracoronarios para el diagnóstico de vasoespasma.

Las pruebas genéticas del polimorfismo Glu298Asp del NOS3 muestran franca tendencia hacia el riesgo de disfunción endotelial en los portadores del genotipo heterocigoto GA (23.3% vs. 15%), sin embargo no se demostró en nuestro estudio la asociación significativa debido a el tamaño de la muestra, que es insuficiente (1-beta=11.9%), lo que nos condiciona error tipo II, sin embargo al ser un estudio piloto, nos sirve para calcular el numero necesario de pacientes para tener un estudio confiable el cual es de 401 pacientes de acuerdo a la distribución genotípica en nuestra población, de tal modo que se podrá continuar con el estudio para saber si el polimorfismo es un factor de riesgo en nuestra población. Situación similar a la que ha sucedido en otros estudios realizados en poblaciones como los turcos y chilenos (23,25), donde se el tamaño de la muestra fue pequeño con resultados negativos.

En base a lo anteriormente expuesto, la validez interna del estudio en cuanto al análisis del polimorfismo y su posible asociación con la disfunción endotelial está sujeta a hacer el análisis con el tamaño muestral completo, sin embargo aun con este tamaño de muestra, el diseño del estudio y la metodología del mismo son suficientes para aclararla asociación de los factores de riesgo clásicos con la disfunción endotelial. La validez externa se generalizará a la población mexicana que tenga al menos tres generaciones previas mexicanos también con o sin manifestaciones de isquemia, sin embargo también da pie a que otros grupos étnicos con quienes estamos ligados filogenéticamente (por ejemplo los españoles o árabes) también puedan estudiar dicha asociación.

### Conclusiones.

Los factores de riesgo clásicos asociados de forma independiente a la disfunción endotelial en sujetos con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa son el antecedente de tabaquismo, la diabetes mellitus y la hipertensión arterial. Con el tamaño de muestra que se analizó no se encuentra asociación de la frecuencia de genotipos del polimorfismo Glu298Asp con la disfunción endotelial, sin embargo se observa una franca tendencia hacia el riesgo en los portadores del genotipo GA. El riesgo de tener cardiopatía isquémica no aterosclerosa en los sujetos con disfunción endotelial es 28.5 veces mayor (9.12 – 88.15) que en los sujetos sin disfunción endotelial.

Tabla 1. Características clínicas y genéticas de pacientes con prueba de función endotelial con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

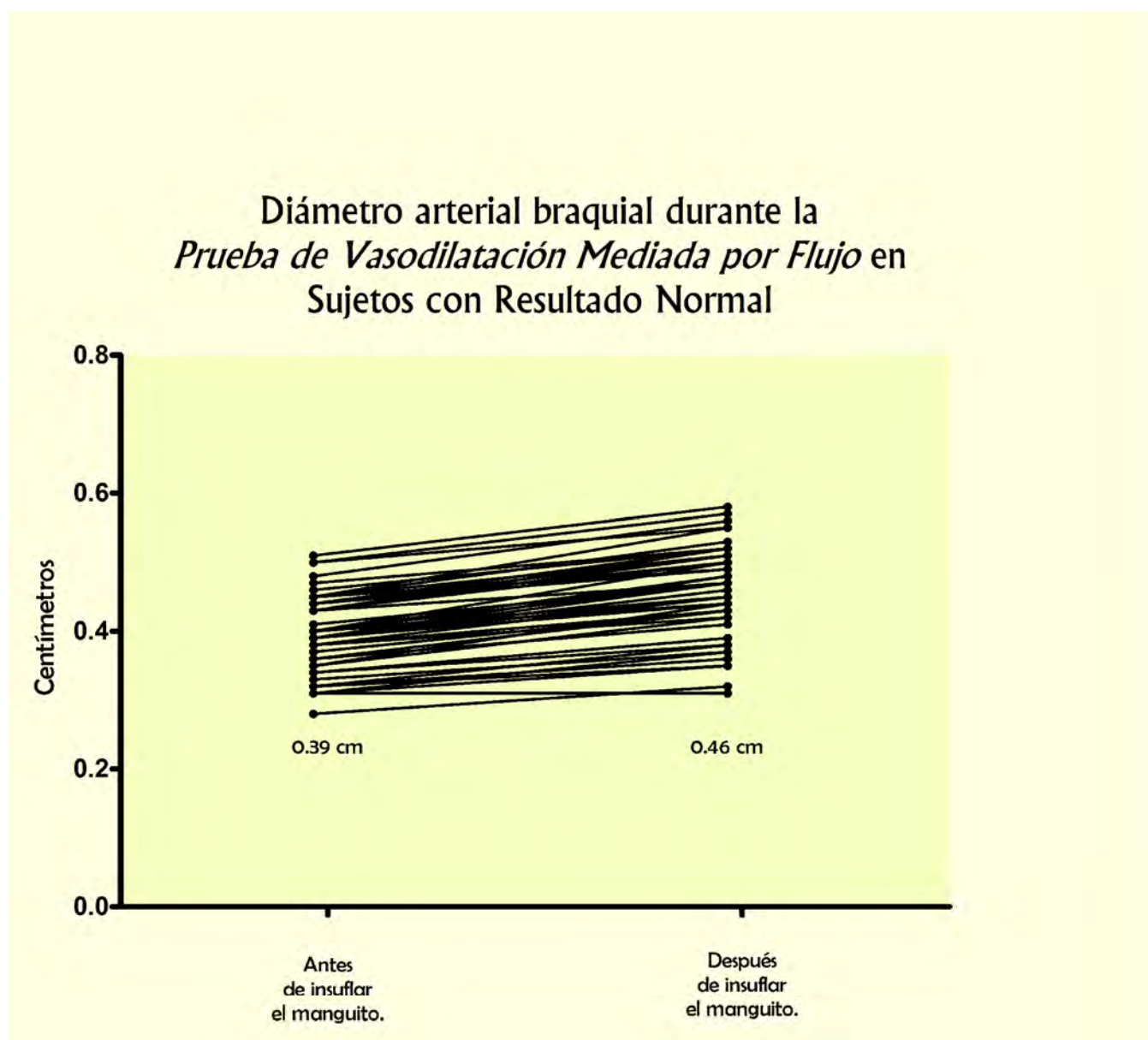
<b>CARACTERÍSTICA CLÍNICA Y GENÉTICA</b>	<b>DISFUNCIÓN ENDOTELIAL n=43</b>	<b>FUNCIÓN ENDOTELIAL NORMAL n=57</b>	<b>p</b>
Edad (años), mediana (RI)	59 (52-69)	58 (41-67.5)	0.57
Género Femenino, n(%)	26 (60.5%)	34 (59.6%)	0.93
<b>FACTORES DE RIESGO CORONARIO CLÁSICOS</b>			
Tabaquismo actual, mediana (RI)	7 (16.3%)	5 (8.8%)	0.25
Antecedente tabaquismo n(%)	18 (41.9%)	3 (5.3%)	<0.001
Talla (metros), mediana (RI)	1.62 (1.59-1.67)	1.62 (1.56-1.71)	0.30
Peso (kilos), mediana (RI)	74.5 (68.5-80.5)	78 (67.5-86)	0.22
Índice de Masa Corporal, mediana (RI)	27.75 (25.99-31.73%)	29.21 (26.85-31.71%)	0.35
Sobrepeso, n(%)	21 (48.8%)	26 (45.6%)	0.41
Obesidad, n(%)	15 (39.4%)	24 (42.1%)	0.56
Hipertensión Arterial, n(%)	29 (67.4%)	16 (28.1%)	<0.001
Diabetes Mellitus 2, n(%)	17 (39.5%)	4 (7%)	<0.001
Dislipidemia, n(%)	13 (30.1%)	6 (10.5%)	0.01
<b>PRUEBA DE FUNCIÓN ENDOTELIAL (37)</b>			
Diámetro Arterial Basal (centímetros) mediana (RI)	0.39 (0.37 - 0.42)	0.39 (0.34 - 0.44)	0.96
Diámetro Arterial Final (centímetros) mediana (RI)	0.38 (0.33 - 0.41)	0.46 (0.40 - 0.57)	<0.001
Cambio en el diámetro arterial (centímetros) mediana (RI)	-0.01 (-0.02 - 0.01)	0.06 (0.04 - 0.07)	<0.001
<b>GENOTIPOS DEL NOS3</b>			
GG, n(%)	33 (76.7%)	47 (52.5%)	0.72
GA, n(%)	10 (23.3%)	9 (15.8%)	0.24
AA, n(%)	0 (0%)	1 (1.8%)	0.57
<b>MANIFESTACIÓN CLÍNICA</b>			
Isquemia demostrada, n(%)	38 (88.4%)	12 (21.1%)	<0.001

Tabla 2. Características clínicas y genéticas de pacientes con prueba de función endotelial con cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

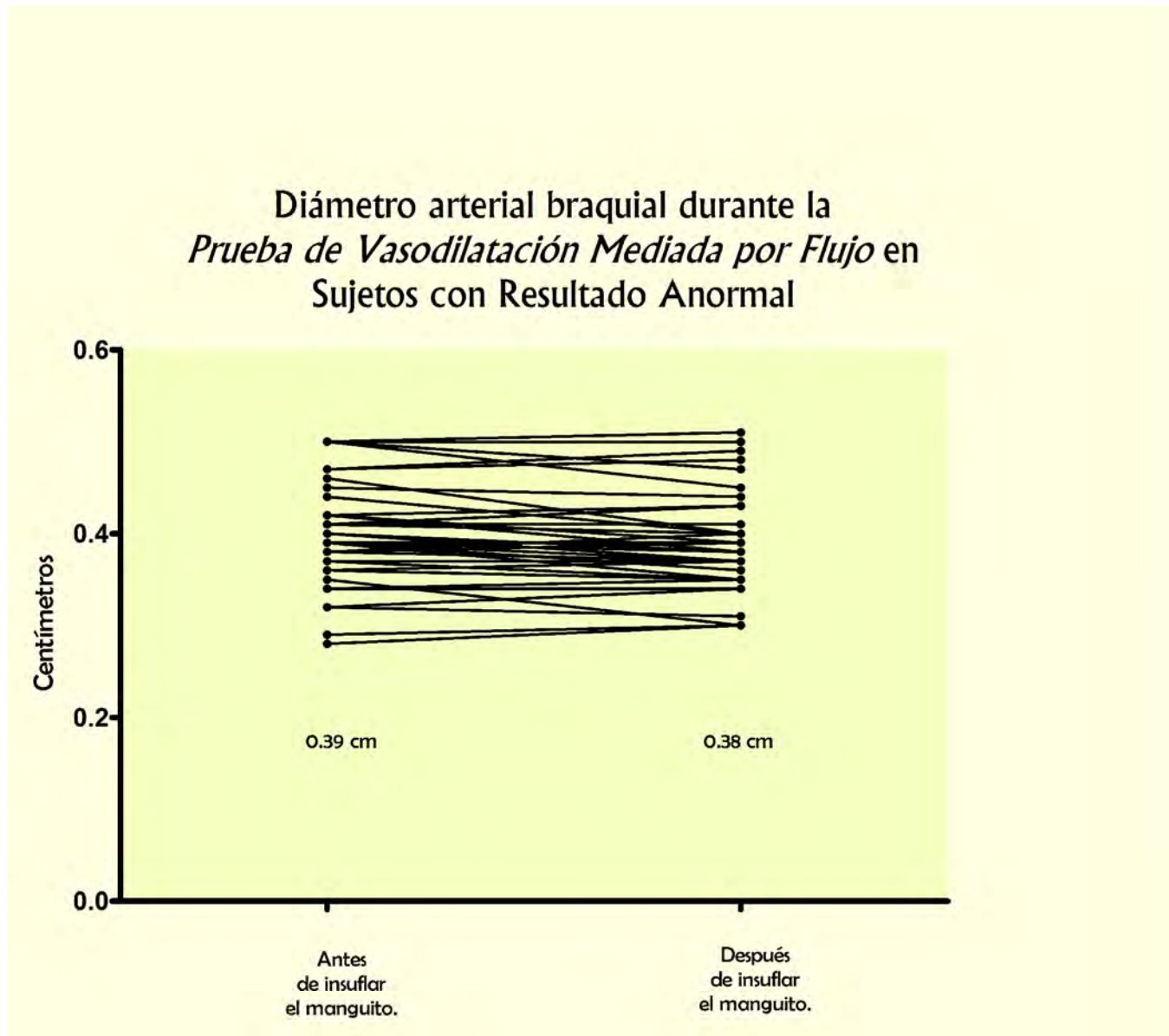
CARACTERÍSTICA CLÍNICA Y GENÉTICA	FUNCIÓN ENDOTELIAL		p
	DISFUNCIÓN ENDOTELIAL N=38	NORMAL N=12	
Edad (años), mediana (RI)	59 (51.75-70.5)	66.5 (56.75-69.25)	0.42
Género Femenino, n(%)	23 (60.5%)	8 (66.7%)	0.49
<b>FACTORES DE RIESGO CORONARIO CLÁSICOS</b>			
Tabaquismo actual, n (%)	5 (13.2%)	1 (8.3%)	0.53
Antecedente tabaquismo, n (%)	18 (47.4%)	3 (25.6%)	0.17
Talla (metros), mediana (RI)	1.62 (1.54-1.67)	1.57 (1.47-1.67)	0.22
Peso (kilos), mediana (RI)	73 (66.5-81.0)	74 (63.75-80.0)	0.61
Índice de Masa Corporal, mediana (RI)	27.68 (25.91-31.59%)	28.34 (25.87-35.62%)	8.86
Sobrepeso, n(%)	18 (48.6%)	6 (50%)	0.93
Obesidad, n(%)	13 (35.1%)	4 (33.3%)	0.59
Hipertensión Arterial, n(%)	28 (73.7%)	11 (91.7%)	0.18
Diabetes Mellitus 2, n(%)	14 (36.8%)	4 (33.3%)	0.56
Dislipidemia, n(%)	13 (34.2%)	3 (25%)	0.41
Colesterol total, mediana (RI)	220.5 (150-245.7)	195 (154-206)	0.53
HDL, mediana (RI)	40 (36-48)	40 (38-47.5)	0.73
LDL, mediana (RI)	130 (116-154)	130 (102-137)	0.61
Triglicéridos, mediana (RI)	220 (179-230.2)	203 (134.5-266.5)	0.36
Glucosa, mediana (RI)	111.50 (98.5-130)	126 (111-180)	0.32
Fibrinógeno, mediana (RI)	477 (416-569)	472 (398-686)	0.98
Tensión arterial sistólica, mmHg mediana (RI)	120 (110-140)	120 (102.5-137.5)	0.57
FEVI, % mediana (RI)	62 (60-70)	65 (60-65)	0.91
Presión diastólica final del Ventrículo Izquierdo, mmHg mediana (RI)	12 (10-15)	11 (10-14)	0.83
<b>PRUEBA DE FUNCIÓN ENDOTELIAL (37)</b>			
Diámetro Arterial Basal, centímetros Mediana (RI)	0.39 (0.36-0.42)	0.38 (0.34-0.42)	0.29
Diámetro Arterial Final, centímetros Mediana (RI)	0.38 (0.35-0.43)	0.43 (0.38-0.48)	<0.01
Cambio en el diámetro arterial, centímetros Mediana (RI)	-0.01 (-0.02-0.01)	0.05 (0.04-0.07)	<0.001
<b>GENOTIPOS DEL NOS3</b>			
GG, n(%)	28 (73.7%)	11 (91.7%)	0.18
GA, n(%)	10 (26.3%)	1 (8.3%)	0.18
AA, n(%)	0 (0%)	0 (0%)	NA

RI: Rango Intercuartil, n: Numero, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad

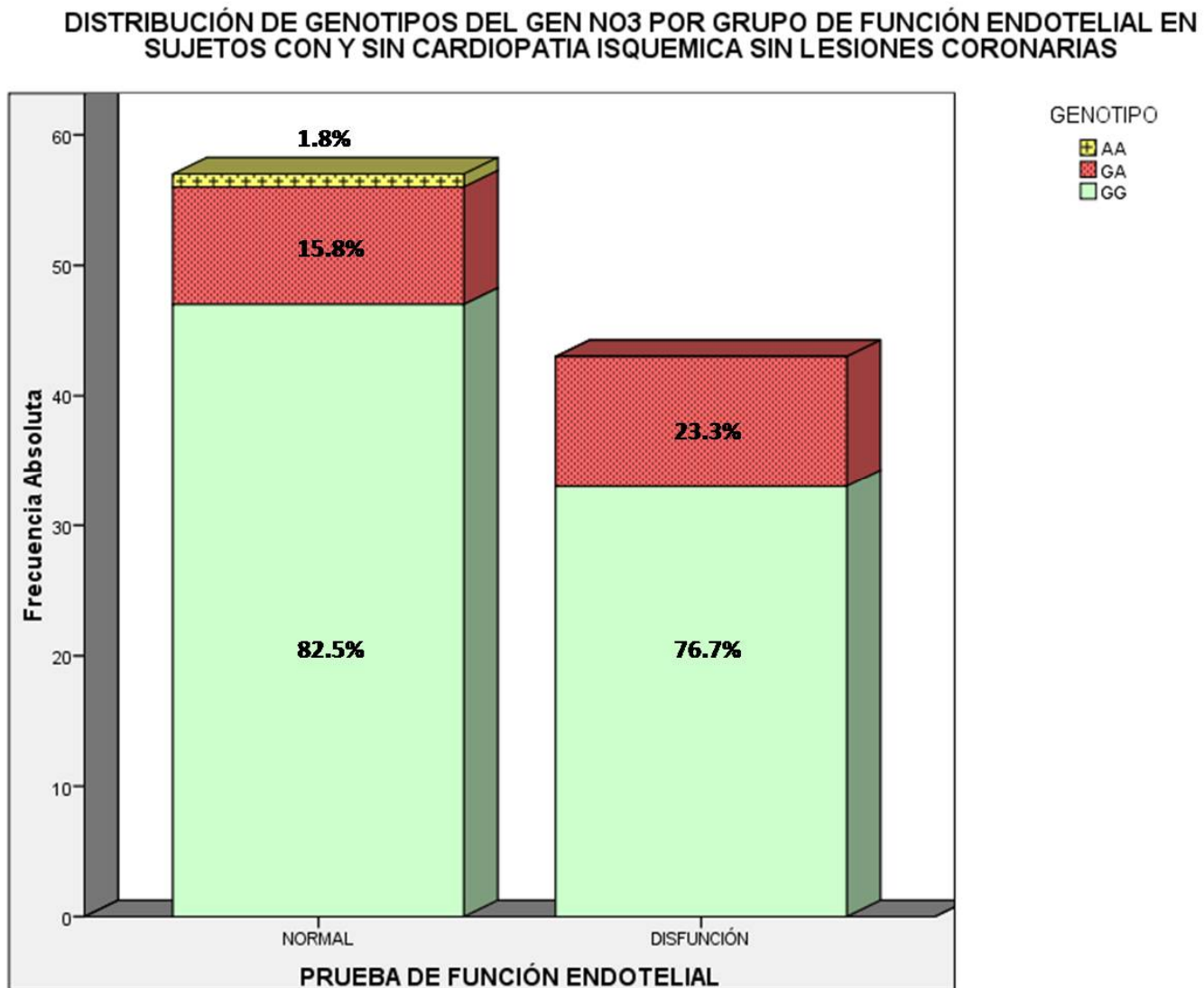
Gráfica 1. Resultados de la prueba de función endotelial con vasodilatación mediada por flujo en el grupo de sujetos con función endotelial normal. (37)



Gráfica 2. Resultados de la prueba de función endotelial con vasodilatación mediada por flujo en el grupo de sujetos con disfunción endotelial. (37)



Gráfica 3. Distribución de Genotipos del NOS3 de acuerdo al resultado de la prueba de vasodilatación mediada por flujo en pacientes con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.



Gráfica 4. Riesgos crudos de disfunción endotelial según los factores de riesgo clásicos y genéticos en sujetos con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.



Razón de Momios en la Asociación de los Factores de Riesgo Clásicos y del Polimorfismo Glu298Asp del gen NOS3.

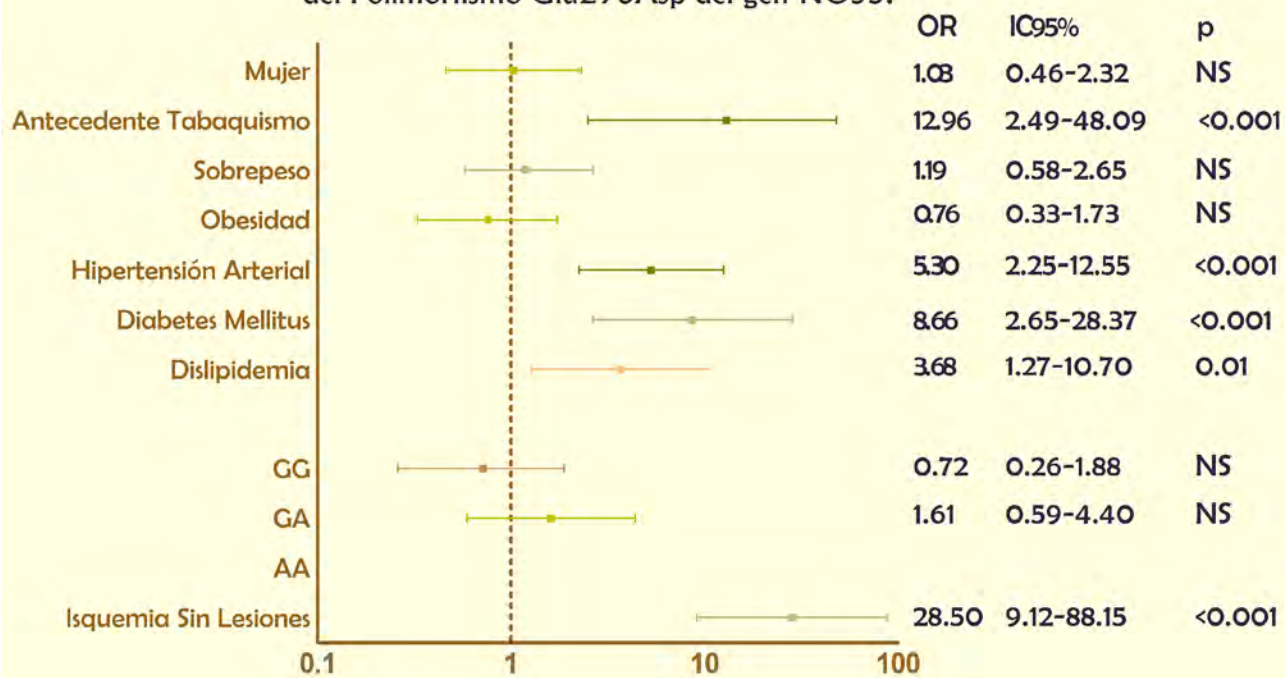


Tabla 3. Análisis multivariado que muestra el efecto de los factores de riesgo para disfunción endotelial en pacientes con o sin cardiopatía isquémica no aterosclerosa.

<b>Variable</b>	<b>Coefficiente Beta</b>	<b>Estadístico de Wald</b>	<b>Valor de P</b>	<b>Odds Ratio (IC 95%)</b>
Constante	-1.71	19.76	<0.001	0.180
Antecedente Tabaquismo	2.24	9.57	0.002	9.43 (2.2-39.09)
Diabetes Mellitus	1.98	8.83	0.003	7.24 (1.96-26.91)
Hipertensión Arterial Sistólica	1.24	5.93	0.015	3.46 (1.27-9.40)

IC: intervalo de confianza

## **Bibliografía.**

1. Bandimón L. Martínez J. Disfunción endotelial Rev. Esp. Cardiol. Supl.2006;6:21-30.
2. Antonia Sambola, Valentín Fuster y Juan José Badimon; Papel de los factores de riesgo en la trombogenicidad sanguínea y los síndromes coronarios agudos; Rev Esp Cardiol 2003; 56: 1001 – 1009.
3. Subodh Verma, Michael R. Buchanan and Todd J. Anderson; Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. Circulation 2003;108;2054-2059.
4. Craig R. Leea B. Kari E. Northc J. Molly S. Braye H. et al. NOS3 polymorphisms, cigarette smoking, and cardiovascular disease risk: The Atherosclerosis Risk in Communities study Pharmacogenet Genomics. 2006 December ; 16(12): 891–899.
5. Tamargo J. Cballero R. Gomez R. Nuñez L, Vaquero M. Delpón E. Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. Rev Esp Cardiol Supl. 2006;6:3-20.
6. Cattaruzza M, Tomasz J. Guzik L. Słodowski W. Pelvan A. Becker J. et. al. Shear Stress Insensitivity of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression as a Genetic Risk Factor for Coronary Heart Disease. Circ. Res. 2004;95;841-847.
7. Mandar S. Chieko M. Philip W. Bauer S. Bauer J. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear FASEB J. 2007. 21, 2655–2663
8. Leng GC, Lee AJ, Fowkes FGR. The relationship between cigarette smoking and cardiovascular risk factors in peripheral arterial disease compared with ischaemic heart disease. The Edinburgh Artery Study. Eur Heart J 1995; 16: 1542-1548.
9. Kool MJF, Hoeks APG, Struijker Boudier HAJ y col. Short- and long -term effects of smoking on arterial wall properties in habitual smokers. J Am Coll Cardiol 1993; 22: 1881-1886.
10. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D y col. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. Circulation 1993; 88 (part 1): 2149-2155.
11. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL. y col. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. JAMA 1998; 279: 119-124.
12. Loscalzo J.; Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. ACC Current Journal Review, 6:2,1997 , pp. 30-31(2).
13. Juan Tamargo; Ricardo Caballero; Ricardo Gómez; Lucía Nuñez Miguel Vaquero; Eva Delpón; Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca; Rev Esp Cardiol. 2006;6(Supl

A):3-20.

14. Seinosuke Kawashima and Mitsuhiro Yokoyama; Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004;24:998-1005.
15. Koh KK; Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease. *N Engl J Med* 2008; 358:976.
16. Endemann DH, Schiffrin EL; Endothelial dysfunction; *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):1983-92.
17. Anne Bouloumié; Johann Bauersachs; Wolfgang Linz; Bernward A. Schölkens; Gabriele Wiemer; Ingrid Fleming; ; Rudi Busse; Endothelial Dysfunction Coincides With an Enhanced Nitric Oxide Synthase Expression and Superoxide Anion Production. *Hypertension.* 1997;30:934-941.
18. Anne L. Taylor, MD; Endothelial Dysfunction and Nitric Oxide Enhancing Therapy: A New Approach to the Treatment of Heart Failure. *Congestive Heart Failure*; 2004; 10:237 – 242.
19. Landmesser U, Drexler H; The clinical significance of endothelial dysfunction; *Curr Opin Cardiol.* 2005 Nov;20(6):547-51.
20. Thomas SR, Witting PK, Drummond GR; Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities; *Antioxid Redox Signal.* 2008 Oct;10(10):1713-65.
21. Giannotti G, Landmesser U; Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz.* 2007 Oct;32(7):568-72.
22. Davignon J, Ganz P; Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32.
23. Aras O, Hanson NQ, Bakanay SM, Tsai MY, Gulec S. Endothelial nitric oxide gene polymorphism (Glu298Asp) is not associated with coronary artery disease in Turkish population. *Thromb Haemost* 2002;87(2):347-9.
24. Dell'Omo G, Penno G, Pucci L, et al. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, microalbuminuria and endothelial dysfunction in hypertensive men. *J Hypertens* 2007;25(7):1389-95.
25. Jaramillo PC, Muñoz M A, Lanas M C, Lanas Z F, Salazar LA. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism in Chilean subjects with coronary artery disease and controls. *Clin Chim Acta* 2006;371:102-6.
26. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006;164(10):921-35.
27. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase

- genotype and ischemic heart disease: meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects. *Circulation* 2004;109(11):1359-65.
28. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-->C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med* 2000;48(5):367-74.
  29. Koh KK; Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease. *N Engl J Med* 2008; 358:976.
  30. Radu D. Rudic and William C. Sessa; Human Genetics '99: The Cardiovascular System Nitric Oxide in Endothelial Dysfunction and Vascular Remodeling: Clinical Correlates and Experimental Links. *Am. J. Hum. Genet.* 64:673–677, 1999.
  31. John E. Deanfield, Julian P. Halcox and Ton J. Rabelink; Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 2007;115:1285-129 5
  32. DS Celermajer, KE Sorensen, C Bull, J Robinson, and JE Deanfield; Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction; *J Am Coll Cardiol*, 1994; 24:1468-1474.
  33. Robert Fathi, MB, BS, Brian Haluska, RDCS, Nicole Isbel, MB, BS, Leanne Short, BSC, Thomas H. Marwick; The Relative Importance of Vascular Structure and Function in Predicting Cardiovascular Events; *JACC Vol. 43, No. 4, 2004;*:616–23.
  34. Michael E. Widlansky, MD\*, Noyan Gokce, MD, FACC\*, John F. Keaney, Jr, MD, FACC\* and Joseph A. Vita, MD, FACC; The clinical implications of endothelial dysfunction; *Am Coll Cardiol*, 2003; 42:1149-1160
  35. Toshimitsu Nozaki, MD\*, Seigo Sugiyama, MD, PhD\*\*, Hidenobu Koga, MD, PhD\*, Et al; Significance of a Multiple Biomarkers Strategy Including Endothelial Dysfunction to Improve Risk Stratification for Cardiovascular Events in Patients at High Risk for Coronary Heart Disease; *J Am Coll Cardiol*, 2009; 54:601-608.
  36. Piero O. Bonetti; Lilach O. Lerman; Amir Lerman; Endothelial Dysfunction A Marker of Atherosclerotic Risk; *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003;23:168.
  37. Corretti M. Anderson T Benjamin E. Celermajer D. Charbonneau F. Creager M. Guidelines for the Ultrasound Assessment of Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilation of the Brachial Artery Report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39: 257–65.
  38. D. H.J. Thijssen, E. A. Dawson, T. M. Tinken, N. T. Cable, and D. J. Green; Retrograde Flow and Shear Rate Acutely Impair Endothelial Function in Humans; Hypertension, June 1, 2009; 53(6): 986 – 992.
  39. M. E. Widlansky; Shear stress and flow-mediated dilation: all shear responses are not created equally; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, January 1, 2009; 296(1): H31 - H32.

40. A. R. Pries, H. Habazettl, G. Ambrosio, P. R. Hansen, J. C. Kaski, V. Schachinger, H. Tillmanns, G. Vassalli, I. Tritto, M. Weis, et al.; A review of methods for assessment of coronary microvascular disease in both clinical and experimental settings; *Cardiovasc Res*, 2008; 80(2): 165 – 174.
41. S. Ashfaq, J. L. Abramson, D. P. Jones, S. D. Rhodes, W. S. Weintraub, W. C. Hooper, V. Vaccarino, R. W. Alexander, D. G. Harrison, and A. A. Quyyumi; Endothelial Function and Aminothioli Biomarkers of Oxidative Stress in Healthy Adults; *Hypertension*, 2008; 52(1): 80 - 85.
42. E. Pyke, V. Poitras, and M. E. Tschakovsky; Brachial artery flow-mediated dilation during handgrip exercise: evidence for endothelial transduction of the mean shear stimulus; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 294(6): H2669 - H2679.
43. M. Juonala, M. Kahonen, T. Laitinen, N. Hutri-Kahonen, E. Jokinen, L. Taittonen, M. Pietikainen, H. Helenius, J. S.A. Viikari, and O. T. Raitakari; Effect of age and sex on carotid intima-media thickness, elasticity and brachial endothelial function in healthy adults: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study; *Eur. Heart J.*, May 1, 2008; 29(9): 1198 - 1206.
44. H. Komai, Y. Higami, H. Tanaka, K. Honda, M. Juri, and Y. Okamura; Impaired Flow-Mediated Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Vasodilation of the Brachial Artery in Patients With Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease; *Angiology*, 2008; 59(1): 52 - 56.
45. R. Maas, E. Schwedhelm, L. Kahl, H. Li, R. Benndorf, N. Luneburg, U. Forstermann, and R. H. Boger; Simultaneous Assessment of Endothelial Function, Nitric Oxide Synthase Activity, Nitric Oxide-Mediated Signaling, and Oxidative Stress in Individuals with and without Hypercholesterolemia; *Clin. Chem*; 2008; 54(2): 292 - 300.
46. D. H. J. Thijssen, M. M. van Bommel, L. M. Bullens, E. A. Dawson, N. D. Hopkins, T. M. Tinken, M. A. Black, M. T. E. Hopman, N. T. Cable, and D. J. Green; The impact of baseline diameter on flow-mediated dilation differs in young and older humans; *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008; 295(4): H1594 - H1598.
47. P. Leeson, S. Thorne, A. Donald, M. Mullen, P. Clarkson, J. Deanfield; Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli; *Heart* 1997;78:22-27.
48. Susan E Aeschlimann, Carol K.C Mitchell, Claudia E Korcarz; Ultrasound brachial artery reactivity testing: technical considerations; 2004; Vol 17: 697-699.
49. Subodh Verma<sup>a</sup>, Chao-Hung Wang<sup>a,f</sup>, Eva Lonn<sup>b</sup>, Francois Charbonneau<sup>c</sup>, Jean Buithieu<sup>d</sup>, Lawrence M. Title<sup>e</sup>, Marinda Fung<sup>c</sup>, Steve Edworthy<sup>c</sup>, Annette C. Robertson<sup>c</sup> and Todd J. Anderson<sup>c,\*</sup> for the FATE Investigators; Cross-sectional evaluation of brachial artery flow-mediated vasodilation and C-reactive protein in healthy individuals; *European Heart Journal* 2004 25(19):1754-1760.
50. Teresa Pellegrino, MD, Giovanni Storto, MD<sup>1</sup>, Pasquale Perrone Filardi, MD, PhD; Anna

Rita Sorrentino, MD, PhD; Antonio Silvestro, MD; Mario Petretta, MD, Gregorio Brevetti, MD, Massimo Chiariello, MD, Marco Salvatore, MD, Alberto Cuocolo, MD; Relationship Between Brachial Artery Flow-Mediated Dilatation and Coronary Flow Reserve in Patients with Peripheral Artery Disease; 2005; Journal of Nuclear Medicine Vol. 46 (12) 1997-2002.

51. K Bhargava,\* G Hansa, M Bansal, S Tandon, RR Kasliwal; Endothelium-Dependent Brachial Artery Flow Mediated Vasodilatation in Patients with Diabetes Mellitus With and Without Coronary Artery Disease; JAPI ; 51; 2003; 355-358.
52. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet 1992;340:1111-5.
53. Heart disease and stroke statistics 2009 update: A report from the American Heart Association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Circulation 2009, 119 e21-e181.
54. Datos demográficos de mortalidad. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Disponible en [www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&s=est&c=14742](http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&s=est&c=14742)
55. Yamada Y, Ichihara S, Nishida T. Molecular genetics of myocardial infarction. Genomic Med. 2008;2;7-22.
56. Voetsch B, Loscalzo J. Genetic determinants of arterial thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:216-229.
57. Yoshimura MH, Yasue M, Nakayama. A Missense Glu298Asp variant in the Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. Hum Genet.103:65-69.
58. Cai H, Wilcken DEL, Wang XL. The Glu298Asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. J Molec Med. 1999; 77: 511-514.
59. Hingorani Ad, Lianf CF, Fatibene J. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery . Circulation. 1999; 100: 1515-1520.
60. Todd Andersen. "Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelium dysfunction". Heart Failure Reviews, 2003;8:71-86