



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**“IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS COMO FACTORES  
DE RIESGO ASOCIADOS A ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL  
ISQUÉMICA EN PACIENTES JÓVENES ADULTOS”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**YESSICA ALEJANDRA RIVERA ARVIZU**

**ASESORES**

**Dr. AURELIO JARA PRADO**

**Q.F.B ROSALBA BONILLA SÁNCHEZ**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a todos los que aportaron algo para hacer posible la culminación de una etapa más en mi vida.

A mis padres Rosa Arvizu y Héctor Rivera por todo el apoyo que recibí, por la paciencia y por el amor incondicional, gracias por todos los sacrificios y por cada muestra de amor, mami eres un gran ejemplo de perseverancia, gracias por enseñarme a esforzarme para lograr mis metas por apoyar y respetar mis decisiones y por confiar en mí, pa gracias por la paciencia que me tenías y por enseñarme tantas cosas. A mis hermanos Cris y Mita por ser parte de mi vida y por esos momentos muy felices que pasamos, por enseñarme que la vida tiene desafíos pero siempre podemos levantarnos y seguir adelante. A mis abuelos Tita y Pancho que siempre se preocupan por la familia que siempre han estado allí para apoyarnos, a mis tías, tíos, primos y primas que me han regalado mucho momentos felices y me han enseñado mucho. A mis abuelos Lilia y Lupe que aunque ya no están aquí son una parte importante en mi vida.

A mis suegros Leti y Angel por su cariño, comprensión y paciencia gracias por todo su apoyo por abrirme las puertas de su casa, por quererme y cuidarme como su hija. A mis cuñados Flor, Gra, Ro, Isra y Oscar gracias por todo su apoyo y ser una parte muy especial en mi vida.

Y esta tesis la dedico especialmente a ti Ángel Ruiz Díaz a mi esposo compañero y amigo, gracias por todo tu apoyo por ayudarme siempre a alcanzar mis metas por ser ese pilar que me sostiene en momentos difíciles, por ser parte de las mayores alegrías de mi vida. Por enseñarme que las penas compartidas son más fáciles de superar y por ser un ejemplo de trabajo, por estar siempre a mi lado y ser mi cómplice, por ayudarme en todo y demostrarme tanto amor. Porque cuando las cosas son muy difíciles tu estas para decirme todo va a estar bien. A mi hijo Emiliano por tantas alegrías y por ser la motivación para poder ser una mejor persona, sin ustedes dos mi vida no sería tan increíble.

A mis amigos los chacales San, Gabo, Incomodo (Christopher), Fer, Rene, Toñito, Mau, Vago (Oscar), Perro (Luis), Guada, Z (Hugo), Bladi, Sam, Mostro (Alonso), Axelin, sin ustedes amigos todo hubiera sido muy aburrido los quiero por sacar cada payasada, especialmente a sarita (Sara Enríquez) por ser una gran amiga por estar conmigo siempre por darme consejos y escuchar mis penas gracias por ayudarme a que todo esto fuera más fácil y por tener un muppet a mi lado te quiero mucho nena, a mi súper amigo tantomán (Ivan Cazares) gracias amigo por todo por hacerme reír como nadie por enseñarme tanto por ser un amigo incondicional y aguantar mis cambios de humor y aunque no traes nada te quiero muchote, gracias amigos por tantos momentos felices.

A mis amigos con los que compartí el laboratorio de biología molecular, los Termocicladores, las cámaras de electroforesis y tantas cosas Ambar Gómez, Gaby Sedante, conejito (Araceli), sarita, gabo gracias por estar presente durante mi experimentación, con ustedes pase momentos muy divertidos, aprendí mucho con ustedes, fue un placer conocerlos, gracias por hacer este proceso muy ameno.

Al departamento de biología molecular parte alta del INNN Adri, Lety, Yorch, David, Doc Jara, Gina, Vato, gracias por tratarme bien.....

Gracias por hacer mi estancia tan divertida, por enseñarme tantas cosas, por la paciencia y por todos los buenos momentos y por preocuparse por los estudiantes que llegan con ustedes.

A mis tutores Dc. Aurelio Jara y Q.F.B Rosalba Bonilla gracias por su paciencia y por sus consejos por ayudarme a concluir una meta más en mi vida y por ser gran parte de mi formación académica.

## AGRADECIMIENTOS

Proyecto apoyado parcialmente por CONACYT FONSEC 18135

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 Enfermedad Vascular Cerebral Hemorrágica .....	7
1.2 Enfermedad Vascular Cerebral Isquémica .....	7
1.3 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) .....	10
1.3.1 <i>Metabolismo de la Metilentetrahidrofolato reductasa</i> .....	10
1.3.2 <i>Genética de la Metilentetrahidrofolato reductasa</i> .....	12
1.4 Generalidades de la coagulación sanguínea .....	14
1.4.1 Protrombina .....	15
1.4.2 <i>Estructura de la protrombina</i> .....	15
1.4.3 <i>Genética de la protrombina</i> .....	19
1.5 Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1).....	21
1.5.1 <i>Estructura del Inhibidor del activador del plasminógeno 1</i> .....	21
1.5.2 <i>Genética del Inhibidor del activador del Plasminógeno 1 (PAI-1)</i> .....	22
1.6 Factor V de Leiden (FVL) .....	25
1.6.1 <i>Genética del Factor V de Leiden</i> .....	26
1.6.2 <i>Estructura del Factor V</i> .....	27
1.7 Apolipoproteína E .....	30
1.7.1 <i>Generalidades de los lípidos</i> .....	30
1.7.2 <i>Metabolismo de las apolipoproteínas</i> .....	32
1.7.3 <i>Apolipoproteína E (ApoE)</i> .....	35
1.7.4 <i>Genética de Apolipoproteína E</i> .....	36
1.8 Óxido Nítrico Sintasa (eNOS) .....	38
1.8.1 <i>Generalidades del óxido nítrico</i> .....	38
1.8.2 <i>Biosíntesis del óxido nítrico</i> .....	40
1.8.3 <i>Genética de la óxido nítrico sintasa</i> .....	42
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	43
3. HIPÓTESIS .....	43
4. OBJETIVO GENERAL .....	44
4.1 <i>Objetivos particulares</i> .....	44
5. METODOLOGÍA.....	45

5.1	Material, equipo y reactivos.....	45
5.2	Diagrama general .....	47
5.3	Criterios de selección de pacientes .....	48
5.4	Obtención de controles sanos .....	48
5.5	Extracción de DNA .....	48
5.6	Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría .....	49
5.7	Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida .....	49
5.8	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	51
5.9	Enzimas de restricción .....	52
5.10	Determinación de polimorfismos .....	54
5.11	Análisis estadístico.....	58
5.11.1	Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	58
5.11.2	Cálculos de odds ratio (OR).....	59
6.	RESULTADOS .....	60
6.1	Pacientes y controles .....	60
6.2	Toma de muestra y extracción de DNA .....	62
6.3	Gradientes de temperatura .....	63
6.4	Reacción de PCR .....	64
	Amplificación de fragmentos por PCR .....	64
6.2	Metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR.....	65
6.3	Apolipoproteína E (ApoE).....	66
6.4	Factor V de Leiden .....	67
6.5	Protrombina .....	68
6.6	Activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1) .....	69
6.7	Óxido Nítrico Sintasa (eNOS).....	71
6.7	Frecuencias Genotípicas y alélicas .....	72
7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	81
9.-	CONCLUSIONES .....	86
10.-	REFERENCIAS .....	87

## RESUMEN

La enfermedad vascular cerebral (EVC) se presenta con mayor frecuencia en personas adultas mayores de 70 años, últimamente ha aumentado el interés en el estudio de esta enfermedad, ya que se han incrementado los casos de EVC en pacientes jóvenes (15 a 45 años) con una prevalencia del 4 al 5%. La EVC se puede presentar de dos maneras EVC hemorrágica e isquémica con un 85% de incidencia. Se ha sugerido que la EVC puede ser la presentación de un número de trastornos de ciertos genes que han sido propuestos como factores de riesgo para desarrollar EVC, como son los polimorfismos C677T del gen de la MTHFR, 4G/5G del gen de PAI-1, G20210A del gen protrombina, Arg506Gln del factor V (FVL), la presencia del alelo 4 del gen ApoE, y la inserción/delección en el exón 4 (4ab) del gen NOS III. Se estudiaron 36 pacientes (21 mujeres y 15 hombres) con EVC isquémica a los cuales se les descartó cualquier factor de riesgo conocido. De igual manera se seleccionaron 144 controles (84 mujeres y 60 hombres) aparentemente sanos. Ambos grupos estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg y firmaron carta de consentimiento informado. Se extrajo DNA, se realizó PCR de punto final y RFLP's para la determinación de los 5 genotipos, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas, el OR con IC 95% y análisis de asociación mediante haplotipos. En la determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno de los 5 polimorfismos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Se realizó un análisis de asociación mediante haplotipos, obteniéndose 30 posibles con resultados estadísticamente no significativos. Cuando se analizó por género, para la MTHFR (genotipo TT) se obtuvo una ligera tendencia hacia la significancia ( $P=0.0446$ ,  $OR=2.47$ .  $IC=0.8046-7.304$ ). La determinación de los polimorfismos asociados con EVC ha sido controversial y parece estar determinado por la diferencia étnica. En este grupo de pacientes mexicanos con EVC de tipo idiopático no se encontró asociación con 5 polimorfismos más estudiados en otras poblaciones y la EVC isquémica idiopáticos en pacientes jóvenes adultos. Se encontró una ligera tendencia a la significancia en la MTHFR en hombres. Por lo cual, es necesario aumentar el número de pacientes.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La Enfermedad Vascul ar Cerebral (EVC) en México se encuentra dentro de las primeras cinco causas de muerte, esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en pacientes adultos mayores de 70 años. (Fortuna A, et.al., 2008). Se ha convertido en un problema de salud pública por su alta mortalidad y discapacidad física, lo que ocasiona grandes costos y pérdidas de productividad. (Uribe C., et al., 2002)

La EVC se define como un episodio súbito de déficit neurológico focal o global producido por un evento isquémico o hemorrágico. Esto es una interrupción brusca del flujo sanguíneo hacia el cerebro, y esto como consecuencia conduce a la pérdida de la función cerebral, al faltar el oxígeno las células cerebrales (neuronas) dejan de funcionar y comienzan a morir, estas células muertas se llaman células infartadas. (Jones B., 2010)

Esta patología puede clasificarse en dos grandes grupos EVC isquémica y hemorrágica.

### **1.1 Enfermedad Vascul ar Cerebral Hemorrágica**

La Enfermedad Vascul ar Cerebral hemorrágica hace referencia a la ruptura de la pared vascular. (Rozo Uribe, Alvarado 2003), ésta constituye cerca del 10% de todos los casos y ocurre como resultado de un sangrado en el interior del encéfalo, lo cual provoca la formación de un coágulo que oprime el tejido cerebral, cuando este tejido se comprime la sangre oxigenada no logra entrar en esta zona y las células aledañas comienzan a morir. (Jones, 2010)

### **1.2 Enfermedad Vascul ar Cerebral Isquémica**

La Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica se refiere a la obstrucción del flujo sanguíneo hacia una parte específica del cerebro, debido a un bloqueo en el interior de un vaso sanguíneo lo cual puede ser ocasionado por una trombosis



causada por un coágulo que se formó en algún otro lugar y que se alojó en el cerebro o por una embolia que es un bloqueo por aire o grasa. (Jones, 2010). A diferencia de la EVC hemorrágica aquí no se presenta ninguna ruptura de la pared vascular.

En relación con el tipo de EVC un 70% se debe a una trombosis, un 10 a 20% a hemorragia cerebral y aproximadamente un 10% a embolismo. (Gil, 2011). La Enfermedad Vascular Cerebral isquémica tiene una mayor incidencia que la hemorrágica.

Cuando esta enfermedad se presenta en individuos menores de 45 años (jóvenes adultos) se considera un evento raro en general y tiene una frecuencia de 4 a 5 %, sin embargo últimamente ha aumentado el interés en estudiar esta enfermedad ya que se han incrementado los registros de EVC isquémica en este sector de la población. (Pérez, 2011)

A pesar de que la Enfermedad Vascular Cerebral en pacientes jóvenes es de poca frecuencia su causalidad es variada por lo que arriba del 20% de los casos no se encuentra causa alguna, mientras que un 4% corresponde a causas hemorrágicas. En ancianos la aparición de esta enfermedad se vincula con daño vascular intrínseco o de origen cardiaco relacionado con la edad. Esto nos lleva a que en pacientes jóvenes adultos se deben buscar otras etiologías que no estén relacionadas con la edad. (Hernández, 2011)

La Enfermedad Vascular Cerebral es de origen multifactorial y los factores de riesgo pueden clasificarse en dos grandes grupos; factores de riesgos modificables y no modificables.

**TABLA 1 FACTORES DE RIESGO PARA EVC** (Ricardo Rozo Uribe, 2003)

<b>FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES</b>	<b>FACTORES DE RIESGO NO MODIFICABLES</b>
Obesidad	Edad
Anticonceptivos orales	Etnia
Folato disminuido	Género
Hipertensión arterial	Historia familiar
Homocisteína elevada	Genética
Fibrinógeno elevado	
Consumo de alcohol	
Tabaquismo	
Dislipidemia	
Diabetes Mellitus	
Enfermedad Cardíaca	
Adenomatosis aórtica	

Los factores de riesgo más importantes que se han asociado a esta patología en jóvenes son el tabaquismo, la dislipidemia, cardiopatías, diabetes mellitus, hipertensión arterial y antecedentes familiares. (Hernández, 2011)

En esta patología la participación tanto de factores ambientales como genéticos puede llevar a su desarrollo, muchos de los casos no pueden ser explicados por la clínica sobre todo aquellos casos que son esporádicos, por esta razón Hassan y colaboradores sugieren que la Enfermedad Vascul ar Cerebral puede ser la presentación de un número de trastornos de ciertos genes que han sido propuestos como factores de riesgo para el desarrollo de EVC. Evidencias recientes sugieren la importancia de estudiar los factores genéticos de riesgo para desarrollar EVC. (Hassan y Hugh 2000).

La identificación de genes de susceptibilidad para la enfermedad y la cuantificación de riesgos asociados ha sido difícil por los resultados contradictorios que se han reportado a partir de estudios de casos y controles. (Casas JP et. al., 2004). Una explicación para esto es la heterogeneidad de los mecanismos patofisiológicos causantes de la EVC, el tamaño de muestra, la población estudiada y el análisis estadístico empleado.

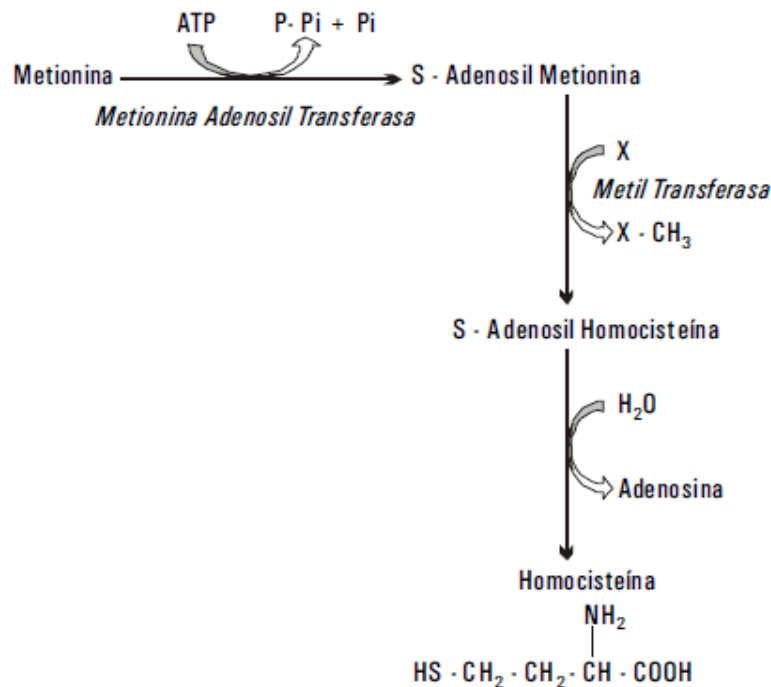
El polimorfismo *C677T* del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), la variante *G20210A* en el gen que codifica para la protrombina, el cambio de Arginina por Glutamina en la posición 506 (Arg506Gln) en el gen que codifica para el factor V (factor V de Leiden), la inserción/delección *4G/5G* del gen que codifica para el Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), la presencia del alelo 4 en el gen que codifica para la apolipoproteína E (ApoE), y la inserción/delección del gen que codifica para la óxido nítrico sintasa son algunos de los polimorfismo que han sido asociados con el desarrollo de esta enfermedad. (Szonolki Z, et. al., 2003). Es por esto que es de suma importancia el estudio de factores genéticos que pudieran estar asociados con el desarrollo de la Enfermedad Cerebral Vascular en nuestra población.

### **1.3 Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)**

#### *1.3.1 Metabolismo de la Metilentetrahidrofolato reductasa*

La Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es la enzima que cataliza la conversión del 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF) a 5-metilentetrahidrofolato (5-metil-THF) que es la forma primaria de folato sérico, co-sustrato para la remetilación de homocisteína a metionina. La homocisteína es un aminoácido azufrado originado metabólicamente de la metionina, que además de ser precursor y componente de péptidos y proteínas, desempeña una importante función metabólica al participar en un sistema de transferencia de grupos metilos. (Méndez A., Fernández J., 1999) La homocisteína se forma como paso intermedio en el metabolismo de la metionina que es un aminoácido esencial. (Rivera Maria, et al, 2006)

La metionina luego de ser activada, cede un grupo metilo en una reacción catalizada por una metil transferasa y da lugar a la S-adenosilhomocisteína, la cual por hidrolisis se separa de la adenosina dando como resultado homocisteína libre. (Méndez A., Fernández J., 1999)



**Figura 1: Formación de homocisteína a partir de Metionina.** La primera etapa en la síntesis de homocisteína es la formación de S-adenosilmetionina (AdoMet), que es luego convertida a S-adenosilhomocisteína (AdoHcy), siendo esta luego hidrolizada para dar lugar a homocisteína y adenosina. (Méndez Arturo, 1999)

La homocisteína se metaboliza principalmente mediante dos vías; la remetilación y la transulfuración. La vía de remetilación permite la recuperación de metionina, mientras que la vía de transulfuración se lleva a cabo cuando existe un exceso de metionina y esto permite la síntesis de cisteína.

La homocisteína se produce por la desmetilación de la metionina esto ocurre intracelularmente, posteriormente la homocisteína es exportada al plasma, por donde circula principalmente en su forma oxidada, unida a proteínas de plasma, sin embargo, en condiciones normales la mayor parte de la homocisteína es remetilada nuevamente para formar metionina mediante la metionina sintasa,

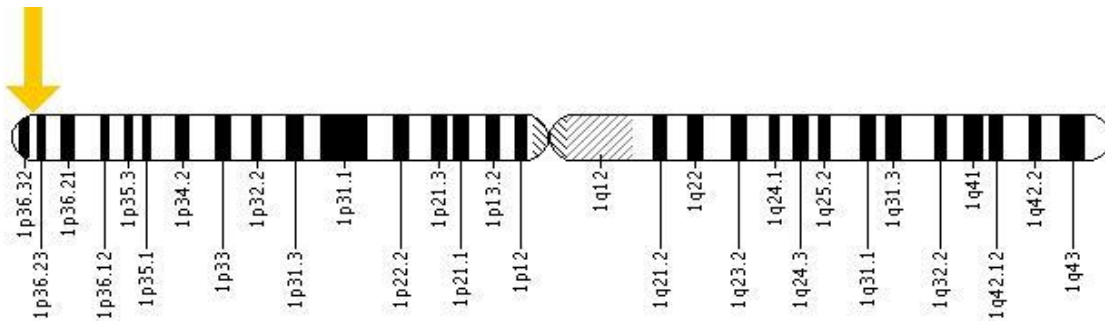
enzima que depende de la cobalamina y del folato, cuando este proceso se ve alterado la homocisteína se acumula y se exporta hacia la circulación sanguínea, de esta manera las concentraciones de homocisteína aumentan, este aumento de homocisteína con una disminución de folatos y/o vitamina B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub> podrían alterar la metilación del DNA, obteniéndose una disminución en la metilación lo que ocasionaría una hipometilación de DNA (disminución en la metilación del DNA), afectando la expresión de algunos genes . (Cordona H, et al, 2008)

La MTHFR cataliza la transformación de homocisteína a metionina, una disminución en la actividad de esta enzima produce un aumento en la concentración de homocisteína (concentración mayor a 15 µmol/Lt) conocida como hiperhomocisteinemia. (Sában J, Fuster V., 2009) (Rivera M. et al, 2006). La falta de metionina resulta en una carencia de grupos metilo, que son necesarios para llevar a cabo reacciones de metilación tales como la síntesis de DNA, carnitina, creatina, purinas etc.

### *1.3.2 Genética de la Metilentetrahidrofolato reductasa*

El gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) contiene 2.2 kilobases y 11 exones, está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3) y codifica para una proteína de 77 KDa. La alteración más común de la MTHFR fue reportada en 1988 por Kang y colaboradores y se trata de la sustitución de citosina (C) por timina (T) en la base 677 del exón 4, que genera el polimorfismo C677T, el cual origina una sustitución de valina por alanina en el aminoácido 222 de la enzima. (Sabán, 2012), (Ayala C., et al, 2010). La presencia de este polimorfismo genera tres genotipos CC (homocigoto normal), CT (heterocigoto) y TT (homocigoto anormal). (Kang SS, et al, 1988)

## Gen MTHFR



**Imagen 2: Cromosoma 1 Gen MTHFR** El gen que codifica para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.3) (Medicine N. L., 2013)

Este polimorfismo (*C677T*) genera una enzima (MTHFR) termolábil a 37°C, lo que provoca una menor actividad enzimática generando así el incremento de la concentración plasmática de homocisteína, por tanto los individuos con genotipo homocigoto anormal *TT* y una baja ingesta de folatos muestran concentraciones más elevadas de homocisteína (hiperhomocisteinemia) y disminución de la metilación del DNA genómico.

Estudios recientes han asociado la hiperhomocisteinemia con enfermedad arterial coronaria, trombosis vascular, desarrollo de aterosclerosis prematura y complicaciones tromboembólicas como derrames cerebrales. En los últimos años niveles elevados de homocisteína se han considerado como un factor de riesgo en varias enfermedades neurológicas y cerebrovasculares como daño vascular, hemorragia cerebral y trombosis venosa, esta asociación podría explicarse por los mecanismo de neurotoxicidad que la hiperhomocisteinemia ocasiona como son generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), efectos protromboticos, promoción del estrés oxidativo, formación de derivados de homocisteína como tiolactona de homocisteína, efectos pro-inflamatorios, activación de apoptosis por mecanismos de aumento citoplásmico de calcio, activación de caspasas, disfunción mitocondrial, desintegración nuclear y daño en DNA, acumulación de la proteína  $\beta$ -mieloide, hiperactivación de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), acción mitogénica sobre células vasculares, alteración en el metabolismo de óxido nítrico y la acción sinérgica del aminoácido con cobre. (Sánchez C. M., et al, 2009)

En 1969 Mc Cully publicó el hallazgo en una necropsia de trombosis arterial y aterosclerosis en 2 niños con hiperhomocisteinemia encontrando alteraciones anatomopatológicas que incluían la proliferación de células de músculo liso, estenosis arterial progresiva y trastornos hemostáticos. Propuso que el incremento moderado y sostenido de homocisteína podría contribuir al desarrollo de aterosclerosis y relacionó por primera vez la concentración elevada de homocisteína plasmática con la enfermedad vascular. (Rivera M. et al., 2006) (Rodríguez R. et al., 2004)

Guzmán y colaboradores hacen referencia que niveles elevados de homocisteína alteran el proceso hemostático produciendo hipercoagulabilidad sanguínea, lo que constituye un factor de riesgo para trombosis venosa. (Guzmán Neftali, 2011)

Los niveles elevados de homocisteína afectan negativamente a las células endoteliales, se produce una coagulación anómala y se aumenta la agregación plaquetaria, al generar estos fenómenos se aumenta el riesgo de formación de trombos y según Rodak los niveles de homocisteína se asocian con un riesgo relativo de 2.5 veces más riesgo de padecer EVC. (Requejo Ana, 2000) (Rodak, 2002)

#### **1.4 Generalidades de la coagulación sanguínea**

La coagulación de la sangre es un proceso complejo, multifactorial y dinámico, si este proceso se ve alterado se pueden ocasionar fenómenos hemorrágicos o trombóticos, y en ocasiones ambos simultáneamente. Se han descubierto aproximadamente 50 sustancias diferentes que afectan la coagulación de la sangre las cuales se encuentran presentes en ella y en los tejidos, unas estimulan la coagulación llamadas procoagulantes, y otras que la inhiben denominadas anticoagulantes, depende de un equilibrio entre estos dos tipos de sustancias que la sangre se mantenga como un líquido o forme trombos (coágulos) (Merino, 2000). La coagulación plasmática consiste en la transformación del fibrinógeno en fibrina por acción de la trombina, enzima proteolítica que se forma por la activación de la protrombina.

En el plasma sanguíneo los factores de la coagulación circulan en exceso en forma de zimógenos (enzimas inactivas), los cuales se activan de forma sucesiva transformándose en enzimas. (Merino, 2000) De igual manera este equilibrio de la coagulación tiene mecanismos inhibidores, este procesos se conoce como fibrinólisis.

Algunas moléculas que participan en el proceso fibrinolítico son: TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), Antitrombina III (AT III), Proteína C (PC) y PAI-1.

El principal efector de la cascada de coagulación es la Protrombina, mientras que el Activador del Inhibidor del Plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y la proteína C (PC) son claves en el proceso de fibrinólisis. Es por eso que la presencia de ciertos polimorfismos en los genes de PAI-1, Factor V (FVL) y Protrombina son probables factores de riesgo para el desarrollo de la Enfermedad Vascular Cerebral isquémica.

#### **1.4.1 Protrombina**

En 1996 Poort y colaboradores realizaron una investigación donde el gen de la protrombina fue candidato para estudiar posibles mutaciones que predisponían a padecer trombosis. (JP Miletich, 1993) (Poort SR, 1996). Este estudio se basó en analizar el gen de la protrombina de sujetos seleccionados con historia familiar de trombosis de los cuales se extrajo sangre periférica, se realizó la extracción de DNA y mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se amplificaron los segmentos deseados para después secuenciar las regiones codificadas y los extremos 5' y 3' (no traducidas) ya que estas parecen tener un papel importante en la regulación de la expresión de este gen. (Degen SJ, 1987). Fue así como se describió un polimorfismo en el gen de la protrombina.

#### *1.4.2 Estructura de la protrombina*

La protrombina o factor II es una glicoproteína con un PM de 72.000 Daltons, es un zimógeno vitamina K-dependiente (necesita de vitamina K para actuar



adecuadamente) que es producido por el hígado, se encuentra en la sangre en una concentración aproximada de 1.5  $\mu\text{Mol}$  y tiene una vida media de alrededor de 3 días. (WJ Williams, 1990) (Escrig, 2003). Estructuralmente puede ser dividida en dos partes, la parte de amino-terminal, denominada fragmento 1,2 (F1+2), contiene 273 aminoácidos y dos cadenas de oligosacáridos unidas a los residuos Asn 78 y 100. Este fragmento presenta dos estructuras en forma de lazo o "kringle". La función de esta estructura kringle no está clara aun, pero podría ser importante para la formación del complejo de la proteína con el FV. El otro extremo denominado protrombina 2, que corresponde al extremo carboxiterminal, es la precursora de la trombina, se compone de unos 306 aminoácidos y una cadena con residuos de Asn. (JS Rosenberg, 1975).



**Figura 3: Protrombina** La trombina se sintetiza como un zimógeno llamado protrombina, esta molécula inactiva (protrombina) comprende cuatro dominios principales con el dominio serínproteasa en su extremo carboxiterminal, al primer dominio se le conoce como dominio Gla, mientras que el segundo y tercer dominio se les llama dominio Kringle, estos dos dominios actúan coordinadamente para mantener la protrombina en su forma inactiva. La activación se inicia por escisión del enlace entre la arginina 274 y la treonina 275, liberándose un fragmento que contiene los dos primeros dominios, la posterior escisión del enlace arginina 323 y la isoleucina 324, producen trombina activa. (Berg Jeremy, 2007)

La protrombina es el efector final de la cascada de coagulación que conduce a la formación del coágulo de fibrina. La protrombina es una enzima clave en el equilibrio entre procoagulación y anticoagulación porque promueve la coagulación por retroalimentación positiva y también promueve la anticoagulación mediante la activación de la vía de la proteína C. (Poort SR, 1996)

La protrombina no tiene actividad coagulante en su forma de zimógeno y debe ser transformada a trombina (FIIa), esta conversión esta mediada por el complejo protrombinasa:

- **Vía extrínseca:** cuando se produce daño tisular se libera un factor fosfolipoproteico (factor tisular) capaz de interactuar con el factor VII para generar FVIIa, este factor en presencia de calcio y fosfolípidos activa el factor X (Xa), el factor Xa con los fosfolípidos y con el FVa forman el complejo protrombinasa.
- **Vía intrínseca:** se activa el Factor XII (FXIIa) y se liberan los fosfolípidos por las plaquetas, el FXIIa actúa sobre el FXI activándolo (FXIa), y a su vez este factor (XIa) activa al factor IX (FIXa), el factor IXa y el factor VIIIa más fosfolípidos activan al factor X (Xa) y el factor Xa con fosfolípidos y FVa forman el complejo protrombinasa.

Por lo tanto el complejo protrombinasa es el factor Xa más fosfolípidos más factor Va. (Ruza, 2002). Este complejo (protrombinasa) transforma la protrombina en trombina.

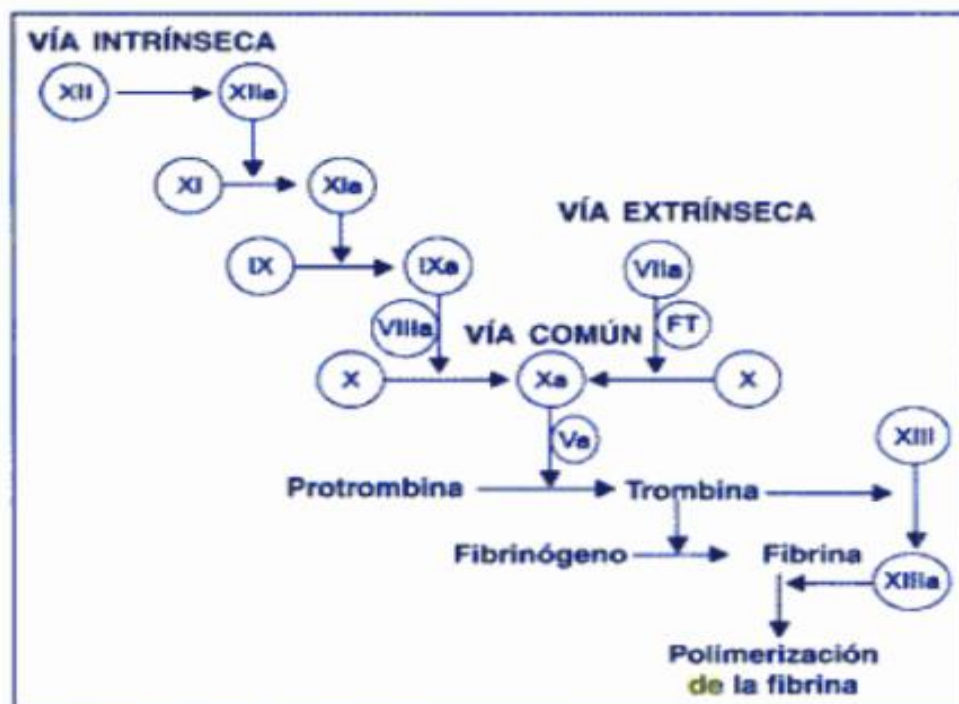


Figura 4: Modelo de la cascada de coagulación (Ferrer, 2010)

Al principio el factor V es inactivo, pero una vez iniciada la coagulación la acción proteolítica de la trombina activa al factor V (Va), que se convierte a continuación en un acelerador adicional poderoso de la activación de la protrombina. Por lo tanto en el complejo activador de protrombina, el FXa es la proteasa real que produce desdoblamiento de la protrombina en trombina, y el FVa con los fosfolípidos aceleran esta actividad de proteasa. (Merino, 2000)

La trombina es una potente serín-proteasa, que con su aparición acelera el proceso de coagulación, que termina con la formación de fibrina estabilizada. El fibrinógeno es una proteína plasmática que se produce en el hígado, cuya principal propiedad es la de ser coagulable por acción de la trombina. La trombina libera cuatro péptidos de bajo peso molecular llamados fibrinopéptidos A y B de las moléculas de fibrinógeno, dando lugar al monómero de fibrina. Los monómeros se unen entre sí pero con uniones poco estables por lo que esta fibrina es soluble hasta que el factor XIII es activado por trombina para que de esta manera el factor XIIIa actúe como estabilizador, y esto lo hace estableciendo puentes disulfuro entre los monómeros de fibrina haciéndola más estable. En este proceso son indispensables el factor V y el factor II, es por eso que alguna alteración en estos factores afecta de manera directa el equilibrio en este proceso ocasionando un estado de hipercoagulabilidad o viceversa.

La protrombina presenta complejas funciones en los sistemas coagulante, anticoagulante y fibrinolítico.

- Coagulante: por ser la enzima capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina
- Anticoagulante: la trombina se une a su cofactor celular trombomodulina, esta unión permite la activación de la proteína C (Wayne Ch, 2003), la cual inhibe la acción coagulante del FVa y del FVIIIa
- Acción fibrinolítica porque la PCa forma complejos con PAI-1 (activador del inhibidor del plasminógeno 1), además de activar al TAFI (inhibidor de la fibrinólisis por impedir la formación acelerada de plasmina ). (Merino, 2000).

- Efectos procoagulantes al participar en la retroalimentación positiva mediante la activación de los factores V, VIII, XI y XIII,

#### *1.4.3 Genética de la protrombina*

El gen que codifica para la protrombina se localiza en el cromosoma 11 en la región p11-q12, este gen está compuesto por 14 exones y 13 intrones tiene una longitud de 21 Kb. (Greer P., 2009). En 1996 se describió un polimorfismo en el gen de la protrombina el cual se conoce como G20210A este polimorfismo consiste en el cambio de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 20210 en la región 3' no traducida. (Frosst P, 1995) (González Ordóñez A, 1999), la presencia de este polimorfismo nos da la posibilidad de tener tres genotipos G/G (homocigoto normal), A/G (heterocigoto) y A/A (homocigoto anormal). Como el polimorfismo G20210A se encuentra en la región 3' no traducida la proteína traducida (protrombina) de un individuo homocigoto anormal (A/A) es estructuralmente y funcionalmente igual a la de un individuo homocigoto normal (G/G), sin embargo Poort y colaboradores comprobaron que este polimorfismo parecía estar presente en pacientes con Trombosis Venosa que en la población control, al investigar este fenómeno encontraron diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de protrombina en individuos con genotipo normal G/G (1.05 U/ml) y los individuos con genotipo A/A y A/G (1.32 U/ml), el grupo de estudio observó un aumento en la concentración de protrombina en los individuos portadores del polimorfismo, concluyendo que este aumento en la concentración podría ser un factor de riesgo para desarrollar trombosis venosa El mecanismo de acción no está claro pero probablemente el incremento en la concentración ocasiona un desequilibrio entre los sistemas procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolítico debido a la elevación en los niveles de trombina que sería la causante de un aumento en la generación de fibrina y esto ocasionaría el riesgo de trombosis. (Merino, 2000) Se ha descrito que la elevación plasmática de la protrombina se asocia con la inhibición de la proteína S, cofactor de la proteína C activada (PCa). (Salazar Sanchez L., 2007).

La causa de la asociación entre el polimorfismo G20210A y los elevados niveles de la proteína en plasma no se conocen completamente, pero parece ser que el cambio de una base en la región 3' no traducida podría suponer mayor eficiencia de transcripción o una superior estabilidad del RNAm transcrito. (Poort SR, 1996)

La mutación G20210A en el gen de la protrombina además de suponer que es un riesgo para desarrollar trombosis venosa, se han realizado estudios que sugieren que podría ser un factor de riesgo de infarto agudo al miocardio (IAM) en fumadores jóvenes (Arruda, 1997), y de infarto de miocardio en mujeres jóvenes.

La prevalencia de la mutación G20210A parece depender de la etnia y distribución geográfica, Poort y colaboradores, observaron que la prevalencia de la mutación en la población en general era del 2.3%, sin embargo en estudios posteriores se comprobó que varía según el área geográfica considerada. (Poort SR, 1996). Varios estudios apoyan la hipótesis de que este polimorfismo no se encuentra presente entre las razas no caucásicas. No se ha observado entre asiáticos, indios americanos ni raza negra. (Franco RF, 1998).

Sin embargo los estudios realizados en Europa oscilan entre 1% y un 4% de prevalencia entre la población control. (Poort SR, 1996), (Cumming AM, 1997) Rossendal y colaboradores observan una mayor tendencia a portar el polimorfismo en el sur de Europa (3%) que en el norte (1.7%). (Rosendaal FR, 1998). En otros estudios se ha encontrado esta mutación entre 1% y 2% en individuos sanos, 6.2% en individuos con un primer episodio de trombosis venosa y 18% en pacientes con trombofilia familiar no explicada. Los estudios caso control permitieron establecer un riesgo relativo de trombosis para la presencia de este alelo de 2.8 %. (Poort SR, 1996).

Los portadores heterocigotos para este polimorfismo (A/G) presentan un riesgo entre 2 y 4 veces superior al de los individuos no afectados, y en ocasiones presentan otros factores de riesgo asociados. (Hillarp A, 1997) No existen muchos estudios publicados sobre portadores homocigotos, Poort o colaboradores calcularon que la prevalencia esperada de casos homocigotos (A/A) era de

0.014%, por lo que es difícil encontrar estudios con pacientes homocigotos. (Poort SR, 1996).

Debido a lo descrito anteriormente se cree que el polimorfismo G20210A del gen de protrombina puede ser un factor de riesgo para desarrollar Enfermedad Vasculare Cerebral isquémica (EVC) en pacientes jóvenes adultos.

## **1.5 Inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1)**

### *1.5.1 Estructura del Inhibidor del activador del plasminógeno 1*

El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) es una glicoproteína de 379 aminoácidos y de unos 52 kDa, esta glicoproteína tiene actividad enzimática e interviene de manera central en varias funciones celulares como angiogénesis, ovulación, la remodelación del tejido, homeostasis, invasión y metástasis de células tumorales. Es miembro de la superfamilia de las serpinas inhibidores de proteinasas, de sus siglas en Ingles (*Serin proteinase inhibitor; serpins*), están compuestas por aproximadamente 40 miembros, las serpinas se dividen en inhibidoras a las cuales pertenece PAI-1 y no inhibidoras. (Torres L. et al., 2002) (Ciszek A. et al., 2007)

Es sintetizado y secretado por diferentes células como las plaquetas, células endoteliales, matriz subendotelial, hepatocitos, fibroblastos y adipocitos, siendo las plaquetas las únicas células que lo almacenan de forma latente. (Pérez S. et al., 2004) (Torres L. et al., 2002)

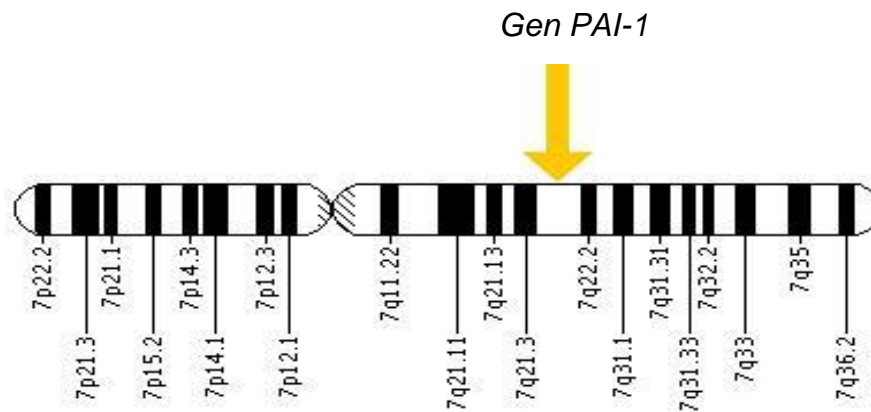
PAI-1 presenta tres conformaciones diferentes, las cuales además son interconvertibles entre sí

1. Una conformación activa con propiedad inhibitoria (forma un complejo con u-PA)
2. Una conformación de sustrato
3. Una conformación latente no reactiva.

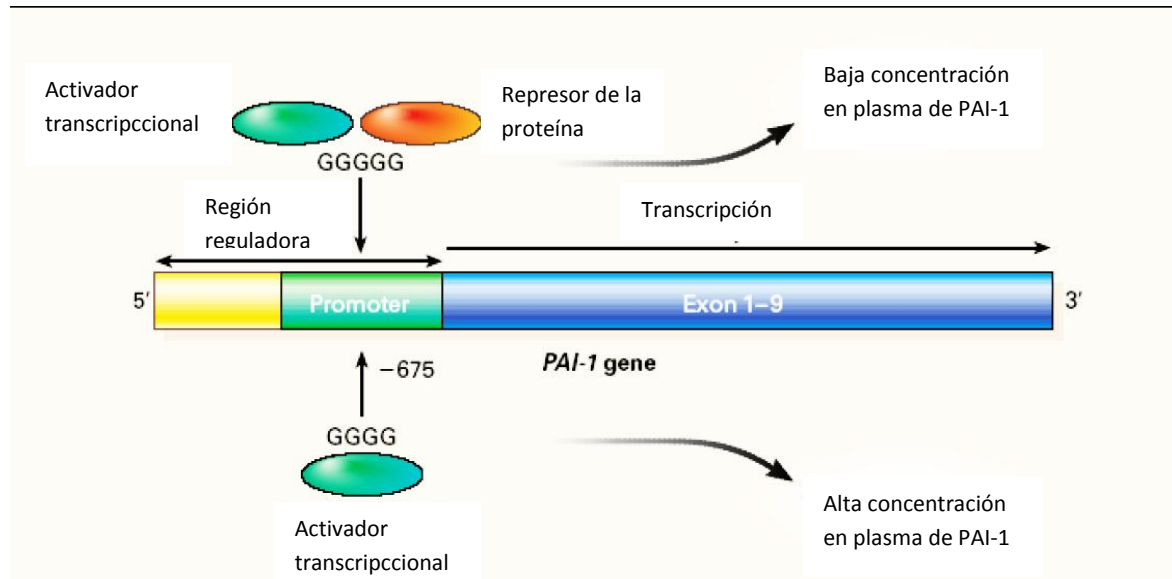
Inicialmente PAI-1 es sintetizado en su conformación activa pero cambia espontáneamente a su conformación latente, tiene una vida media de 1 a 2 horas. (Velásquez J. et al., 2011). Una gran parte del Inhibidor del activador del plasminógeno 1 se encuentra unido a vitronectina, esta glicoproteína se encarga de estabilizar la acción inhibidora.

### 1.5.2 Genética del Inhibidor del activador del Plasminógeno 1 (PAI-1)

El gen de PAI-1 está localizado en el cromosoma 7 (q21.3-q22), consta de 16 Kb, está conformado por 9 exones y 8 intrones, se han reportado 8 polimorfismo en este gen, uno de ellos es el polimorfismo 4G/5G localizado a 675 pares de bases río arriba del codón de inicio, en la región promotora del gen; este polimorfismo consiste en la inserción/delección de una guanina y resulta en dos tipos de alelos que pueden ser 4G o 5G, dando como resultado tres genotipos posibles 4G/4G, 4G/5G y 5G/5G. (Madrigal D., 2010)



**Figura 5:** Cromosoma 7, localización del gen que codifica para PAI-1 (Ferrau V. et al., 2011)



**Imagen 6: Estructura del gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), sitio del polimorfismo 4G/5G, que se encuentra en la región del promotor.** El polimorfismo 4G/5G en la posición 675 incrementa la transcripción, y por lo tanto la concentración plasmática de PAI-1. El alelo 4G con 4 Guaninas (G) se asocia a un incremento en la transcripción del gen resultando en la unión a un activador de la transcripción, mientras que el alelo 5G cinco Guaninas está unido a un represor de la proteína y disminuye su unión al activador. (Kohler HP, 2000)

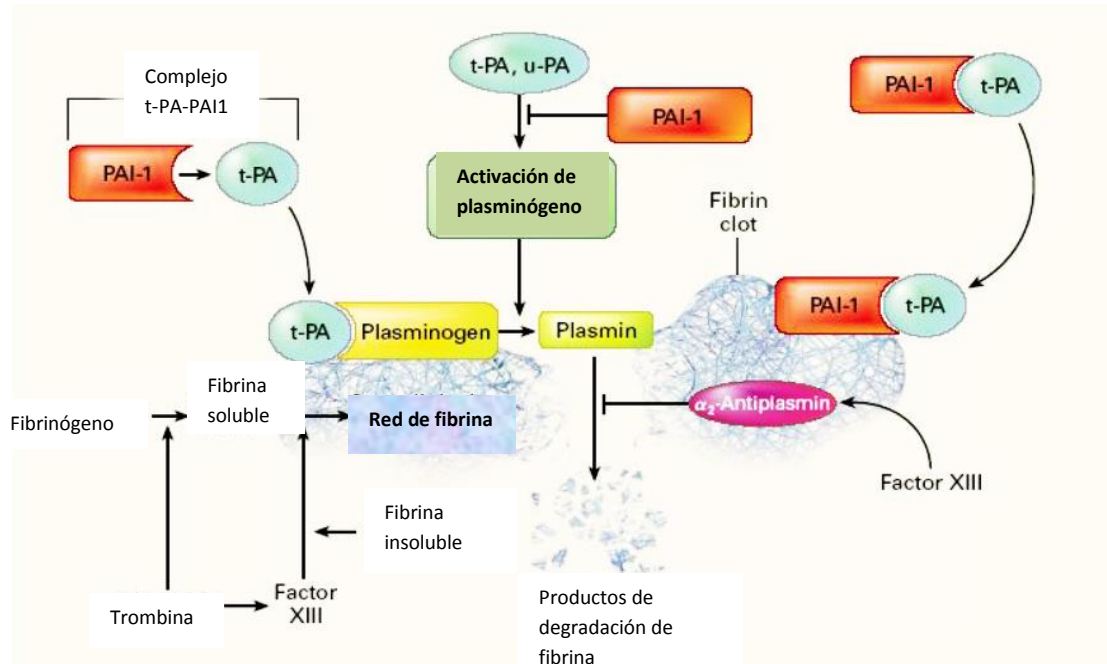
PAI-1 es el principal inhibidor del plasminógeno, mediante la inhibición del t-PA y por lo tanto una enzima esencial para activar el proceso de fibrinólisis.

El mecanismo por el cual se degradan los coágulos de fibrina es mediante la acción del sistema fibrinolítico, este sistema está constituido por un zimógeno conocido como plasminógeno. El plasminógeno mediante la acción del activador del plasminógeno tipo tisular (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA) se convierte en su forma activa denominada plasmina, la plasmina es una enzima que tiene por función degradar el coágulo sanguíneo una vez que este ha cumplido su función hemostática. La plasmina lleva a cabo la degradación de la fibrina transformándola en productos solubles de fibrina. (Madrigal, 2010)

Una vez que las plaquetas son estimuladas por trombina PAI-1 es liberado sobre la superficie plaquetaria de esta manera se protege el coágulo de una lisis prematura, este mecanismo causa un rápido incremento en la concentración local de PAI-1 en circulación el cual se une rápidamente a u-PA y a t-PA.



PAI-1 inhibe al u-PA y al t-PA, formando un complejo reversible el cual es eliminado de la circulación por las células hepáticas, gracias a la formación de este complejo se evita que el plasminógeno se convierta en plasmina. (Ruíz Q. et al., 2005) (Madrigal, 2010)



**Imagen 7: Esquema de la activación e inhibición del sistema fibrinolítico.** En condiciones normales el activador del plasminógeno tisular (t-PA) circula en plasma como complejo con el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en forma estequiométrica 1:1. Estas reacciones se llevan a cabo sobre la superficie del coágulo de fibrina. El plasminógeno es activado por el activador del plasminógeno tisular (t-PA) o tipo urocinasa (u-PA). El complejo plasminógeno t-PA también se une a la fibrina logrando retener su actividad inhibitoria sobre t-PA. (Kohler HP, 2000)

De esta manera es como PAI-1 interviene en el sistema fibrinolítico, así que cuando se presentan alteraciones en este gen la concentración de esta glicoproteína se ve afectada y por lo tanto el equilibrio de este sistema de degradación de fibrina.

El polimorfismo 4G/5G tiene relación como factor de riesgo para trombosis arterial, su fenotipo resulta en la elevación de la concentración de los niveles séricos de PAI-1 y por tanto en un tiempo más prolongado de degradación del coágulo de fibrina.

Kain K. y colaboradores demostraron que existía un incremento en los niveles antigénicos de PAI-1 en sujetos con isquemia cerebral, los cuales eran portadores del polimorfismo 4G/5G.

Los individuos homocigotos para el alelo 4G (4G/4G) presentan niveles mayores de PAI-1 que los individuos homocigotos para el alelo 5G (5G/5G) ya que se especula que el alelo 5G tiene un sitio de unión con una proteína represora la cual reduce la transcripción como se observa en la imagen número 6.

Debido a la importancia del sistema fibrinolítico como un regulador del depósito de fibrina en la pared del vaso sanguíneo, un desequilibrio en dicho sistema favorece el desarrollo de la enfermedad vascular, por eso el polimorfismo 4G/5G de PAI-1 es considerado un factor de riesgo para Evento Vascular Cerebral isquémico. (Madrigal, 2010) (Ciszek A. et al., 2007)

### **1.6 Factor V de Leiden (FVL)**

En 1993 Dahlback presento un trabajo en el que tras realizar un sencillo ensayo *in vitro* con plasmas de individuos con historia familiar de trombosis, observaba una pobre respuesta anticoagulante tras la adición de PCa (Proteína C activada). El estudio se basaba en la prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). El TTPA consiste en añadir activadores de la vía intrínseca (fosfolípidos y  $Ca^{2+}$ ) al plasma *in vitro* y cronometrar el tiempo que tarda en formarse el coagulo de fibrina, la modificación de Dahlback consistía en calcular un cociente a partir de dos TTPA, uno en presencia y otro en ausencia de PCa. La PCa degrada proteolíticamente a los factores Va y VIIIa, por lo que se esperaba que al añadir PCa el tiempo de coagulación se alargara, sin embargo en estos pacientes no fue así el tiempo de TTPA no aumentaba, esta respuesta fue denominada resistencia a la proteína C activada (RPCa) (Dahlback B. et al., 1993)

El siguiente objetivo era aislar y caracterizar el factor responsable de esa escasa respuesta anticoagulante a la PCa y fue en 1994 que Dahlback y su equipo de investigación demostraron que ese factor causante de la RPCa era el factor V

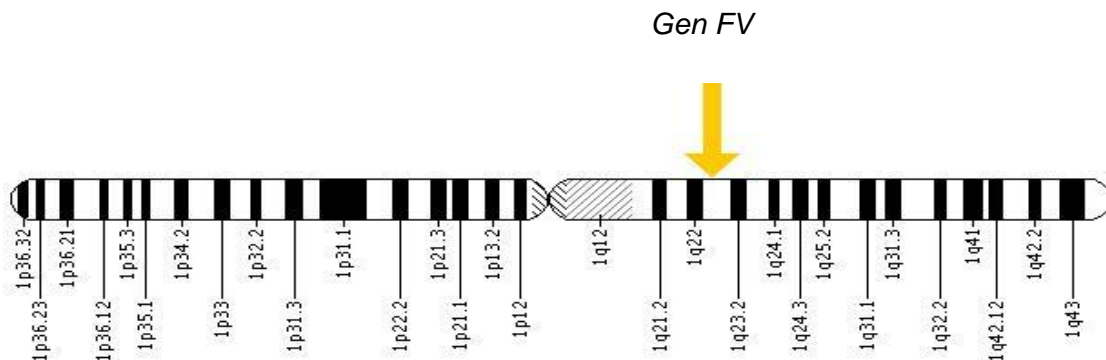
(FV), que en esos pacientes se mostraba más resistente a la acción proteolítica de la PCa. (Bertina R. et al., 1994)

La proteína C es una proteína dependiente de vitamina K, que circula en el plasma como Zimógeno (enzima inactiva) de una serín proteasa, se encuentra en una concentración entre 3 y 5  $\mu\text{g/ml}$ , presenta gran afinidad por el calcio y por los fosfolípidos cargados negativamente, la PC es sintetizada en el hígado. (Kisiel, 1979)

### 1.6.1 Genética del Factor V de Leiden

Bertina y colaboradores en 1994 localizaron una mutación puntual en el exón 10 del gen que codifica para el factor V, la mutación consiste en el cambio de una Guanina (G) por una Adenina (A) en la posición 1961, esto provoca un cambio en la proteína de una arginina (Arg) en la posición 506 por una glutamina (Gln). Esta mutación en el factor V se conoce como factor V de Leiden (FVL). (Bertina R. et al., 1994)

El FV de Leiden (FVL) corresponde a una mutación puntual en el gen del factor V de la coagulación, el gen que codifica para el factor V es un gen largo (>80 Kb) que se localiza en el cromosoma 1 en la región q21-q25, este gen posee 25 exones y 24 intrones más los extremos 5' y 3' no traducidos. (Wang H. et al., 1988) Los exones presentan tamaños variados que se encuentran en un rango entre 72-2820 pares de bases. (Ivvone, 2007).



**Figura 8: Cromosoma donde se localiza el gen del FV.** El gen que codifica para el FV se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 en la región q21-q25 (Medicine U. N., 2013)

### 1.6.2 Estructura del Factor V

El factor V es una glicoproteína plasmática larga y asimétrica, es un componente esencial de la cascada de coagulación, que puede actuar como proteína procoagulante o anticoagulante, esto quiere decir que el FV juega un papel importante en la hemostasia como encargado de mantener de forma delicada el equilibrio anticoagulante y procoagulante de la sangre. (Dahlback, 1994).

El Factor V activado (FVa) fue purificado a partir de plasma humano, lo que permitió conocer perfectamente su estructura, está formado por una cadena pesada (PM=105.000) que mantiene el extremo terminal NH<sub>2</sub> del procofactor (residuos 1-709 y dominios A1-A2) y una cadena con el extremo COOH terminal de la molécula del FV ligera (PM= 74.000) (aa 1546-2196, dominios A3-C1-C2), las cuales no están unidas de forma covalente.

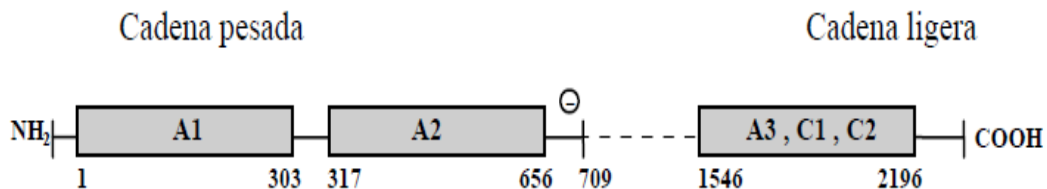


Figura 9: Estructura del factor V (Merino, 2000)

El FVa es inactivado por la acción proteolítica de la PCa, a niveles de la cadena pesada, proteólisis que de manera secuencial rompe los enlaces Arg<sup>506</sup>, Arg<sup>306</sup> y Arg<sup>679</sup>. La inactivación del FVa es una proteólisis ordenada y secuencial en el que la rotura a nivel de Arg<sup>506</sup> es necesaria para llevar a cabo las proteólisis siguientes (Arg<sup>306</sup> y Arg<sup>679</sup>) (Kalafatis M., Mann K., 1993). Tras la proteólisis de la cadena pesada a nivel de la Arg<sup>506</sup> se generan dos fragmentos, posteriormente se lleva a cabo la incisión del aminoácido Arg<sup>306</sup> y Arg<sup>679</sup> de esta manera se generan tres fragmentos de PM= 45.000, PM=30.000 y PM=22/20.000, este es el proceso normal de inactivación del factor V activado. ( Kalafatis M., et al., 1995)

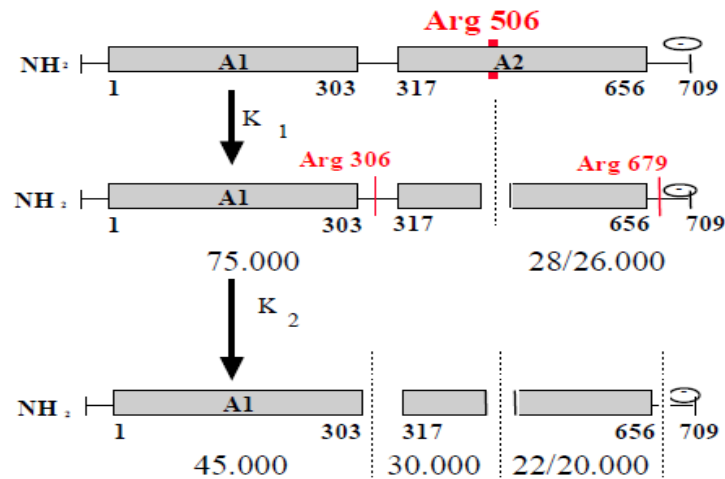
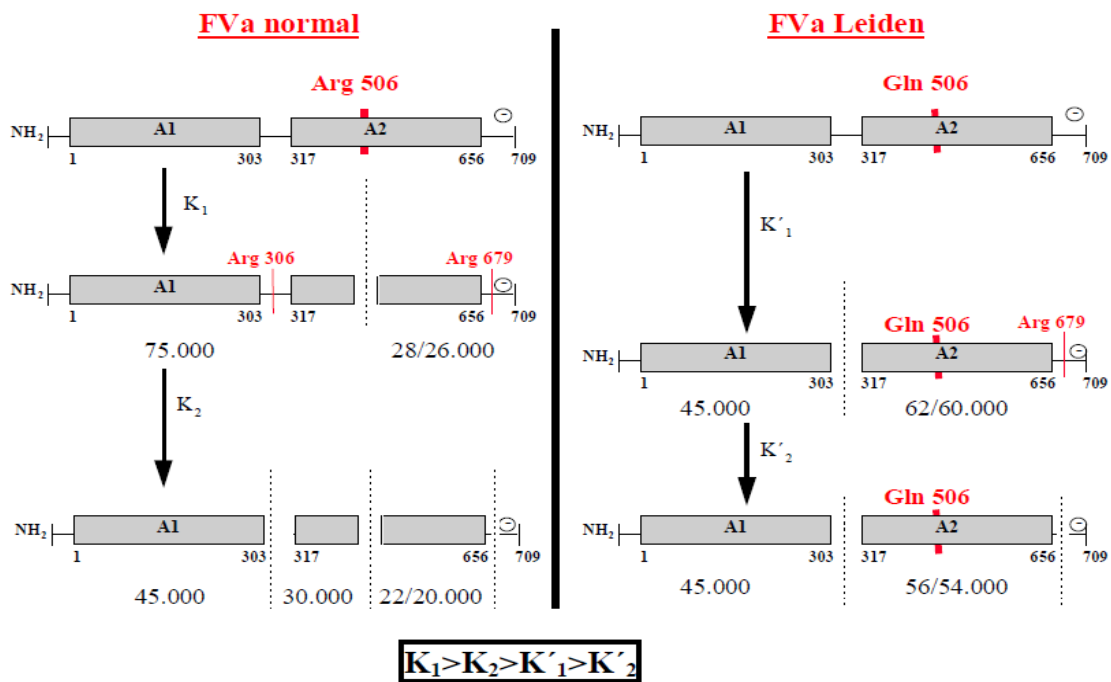


Figura 10: Lisis de la cadena pesada del FVa Arg<sup>506</sup>. (Merino, 2000)

La PCa es altamente específica, ya que no actúa sobre los factores V y VIII en sus formas inactivas. La PCa tiene una larga vida media de 6 a 8 horas y una alta especificidad por los FVa y FVIIIa estos son dos requisitos muy importantes para el perfecto funcionamiento de la PCa como anticoagulante. (Dalhback, 1995)

Como se mencionó anteriormente la mutación del FV (FVL) consiste en la sustitución de una guanina por una adenina en la posición 1691, esto genera un cambio en la proteína, en el caso del FV normal da lugar al triplete CGA que codifica para arginina (Arg, R), para el FVL (FV mutado) el triplete que se obtiene es CAA y codifica para el aminoácido glutamina (Glu, Q), en esta nueva sustitución la proteína C activada (PCA) no reconoce el sitio de corte de la Arg<sup>506</sup> por lo que se sigue a los sitios de corte siguientes (Arg<sup>306</sup> y Arg<sup>679</sup>). La trascendencia fisiológica de esta mutación reside en que la velocidad de inactivación en estas condiciones es 10 veces más lenta que en condiciones normales lo que ocasiona el fenómeno de resistencia a la actividad anticoagulante de la PCa (Lens Daniela, 2000) , esto ocasiona que el FVa permanezca más tiempo en circulación y resulta en un aumento de la generación de trombina y un estado de hipercoagulabilidad. (Whizar Victor, 2008).

En resumen, la característica primordial del FVL es la resistencia a la proteína C activada donde la modificación en el gen del factor V hace que el factor V activado se haga resistente a la inactivación por la PCa, resultando en un estado de hipercoagulabilidad (estado trombofílico). (Whizar Victor, 2008)



**Figura 11: Acción de la PCA sobre el FV normal y el FV Leiden (FV)** La velocidad de inactivación del FVL es 10 veces más lenta que la velocidad de inactivación del FV normal, K hace referencia a la velocidad de inactivación. (Merino, 2000)

La prevalencia de este polimorfismo (FVL) es de aproximadamente 5% en la población caucásica europea y en la norteamericana, mientras que hay razas en las que el polimorfismo no se ha encontrado como la población africana, asiática e indígena americana (Arruda V. et al., 1995) (Rees, 1996). La más alta prevalencia se reportó en Suecia (15%), en Alemania también la prevalencia reportada fue alta del 10%, Holanda, Reino Unido y Estado Unidos presentaron una prevalencia entre 3 y 5%, mientras que en España e Italia se reportó una prevalencia de 2%. En países sudamericanos se ha descrito una prevalencia similar a la hallada en población caucásica accidental: Venezuela (1.6%), Argentina (5.1%), Costa Rica

(2%), Brasil (2%), Chile (3.8%). Es importante recalcar que la mayoría de estos estudios se realizaron mediante estudio funcional, no habiéndose realizado un análisis genotípico para demostrar la presencia del FV mutado. (Lens Daniela, 2000).

## **1.7 Apolipoproteína E**

### *1.7.1 Generalidades de los lípidos*

Los lípidos constituyen un grupo muy heterogéneo de moléculas que desempeñan funciones biológicas importantes como fuente de energía, producción de hormonas esteroideas, estructura y formación de ácidos biliares entre otras.

El tránsito de los lípidos en el plasma está influenciado por su insolubilidad en medios acuosos. Así, excepto los ácidos grasos no esterificados que se asocian a la albúmina, los lípidos forman con ciertas proteínas unas partículas conocidas como lipoproteínas. Estas partículas tienen una estructura micelar con un interior apolar marcadamente hidrófobo y una cubierta externa polar hidrófila. Las proteínas que forman parte de las lipoproteínas, junto con los lípidos polares (colesterol no esterificado y fosfolípidos), se disponen en la cubierta externa, favoreciendo la solubilidad de la partícula, mientras que los lípidos apolares (triglicéridos y colesterol esterificado) se disponen en el interior. Las propiedades fisicoquímicas de las lipoproteínas se determinan por su composición y proporción de lípidos y proteínas. Cuanto mayor sea la proporción de lípidos, especialmente los apolares, mayor será el tamaño de las micelas y menor será la densidad de las lipoproteínas. Según estas propiedades fisicoquímicas, las lipoproteínas se clasifican en: quilomicrones de origen intestinal y derivados de la absorción de la grasa de la dieta, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, very low density lipoprotein) derivadas de la exportación de triacilgliceroles por el hígado, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) son los primeros derivados del catabolismo de las VLDL, lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoprotein) derivadas de la etapa final del catabolismo de las VLDL y lipoproteínas de alta densidad (HDL high density lipoprotein) involucradas en el

metabolismo de las VLDL, quilomicrones y colesterol (Hernández M., Sastres, 1999) (Fuentes A. et al., 1998).

Las apolipoproteína son las proteínas que participan en la estructura de las lipoproteínas (son la parte proteica de las lipoproteínas), algunas de estas apolipoproteína son integrales y no pueden ser transferidas, mientras que otras si pueden ser transferidas entre las distintas clases de lipoproteínas (Hernández Rodríguez M., 1999). Estas proteínas (apoproteínas) tienen diferentes funciones como son facilitar la solubilidad de las lipoproteínas, sirven de estructura para unir lípidos, son indispensables en su metabolismo ya que confieren selectividad tanto en su reconocimiento por parte de los receptores celulares (sirven de ligando para unir a las lipoproteínas con su receptores) como cuando operan como cofactores de las enzimas que actúan sobre ellas, son moduladores de la actividad enzimática en el metabolismo de las lipoproteínas (Zabala, 2000).

Las apolipoproteína ejercen un importante papel en el transporte y en la homeostasis de los lípidos plasmáticos (Arrigo M, 2006).

Se han aislado y caracterizado distintos tipos de apolipoproteína formadas por polipeptidos monocatenarios sintetizadas y secretadas todas ellas en el hígado y en el intestino: Apo A I,II y III, Apo B B48 y B100, Apo C, Apo D, Apo E, Apo F y Apo G (Arrigo M, 2006).

Las apolipoproteína mayoritarias en las HDL son las denominadas AI y AII, en las LDL es la apoB, que también se encuentra en VLDL y quilomicrones, sin embargo la ApoB de quilomicrones es más pequeña (ApoB-48) que la de LDL y VLDL (ApoB-100). La ApoB-48 es sintetizada en intestino y la ApoB-100 en el hígado. La ApoB-100 actúa como ligando para el receptor ApoB-100,E de las LDL. Las apolipoproteína CI, CII y CIII son péptidos pequeños que son transferidos libremente entre las distintas lipoproteínas. La ApoC-II es un activador importante de la lipoproteína lipasa extrahepática involucrada en la retirada de triacilgliceroles de la circulación. La ApoA-I de las HDL es una activadora de la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) responsable de la formación de ésteres de colesterol en el



plasma y es además ligando para el receptor de HDL. Existen otras apolipoproteína distintas a ApoA, ApoB y ApoC como la ApoE que ha sido aislada de las VLDL, HDL y quilomicrones (Hernández M., Sastre G., 1999).

**Tabla 2 CARACTERISTICAS DE LAS APOLIPOPROTEINAS** (Fuentes Arderiu, 1998)

	<b>Lugar de Síntesis</b>	<b>Lipoproteínas</b>	<b>Función</b>
A-1	Intestino, Hígado	HDL, VLDL y quilomicrones	Estructural y cofactor de la fosfatidilcolina-esterol-acil-transferasa
A-II	Hígado, Intestino	HDL y quilomicrones	Desconocida
A-IV	Intestino	Quilomicrones y HDL	Transferencia de apolipoproteína entre HDL y quilomicrones
B-48	Intestino	Quilomicrones	Estructural
B-100	Hígado	VLDL,IDL y LDL	Estructural y confiere la especificidad de unión a receptores celulares B y E
C-I	Intestino, Hígado	VLDL, IDL, HDL y quilomicrones	Cofactor de la fosfatidil-colina-esterol-acil-transferasa
C-II	Intestino, Hígado	VLDL,IDL,HDL y quilomicrones	Cofactor de la lipoprotein-lipasa
C-III	Intestino, Hígado	VLDL,IDL,HDL y quilomicrones	Inhibe a la lipoprotein lipasa, inhibe la unión a los receptores B y E
D	Hígado, intestino, páncreas y riñón	HDL, VLDL, IDL y LDL	Transferencia de esterés de colesterol entre estas lipoproteínas
<b>E</b>	<b>Hígado, intestino y otros tejidos</b>	<b>VLDL, IDL, HDL y quilomicrones</b>	<b>Confiere la especificidad de unión a los receptores celulares.</b>

### 1.7.2 Metabolismo de las apolipoproteínas

Tras la digestión y absorción de la grasa por el intestino, los quilomicrones son sintetizados y exportados vía linfática al torrente sanguíneo circulatorio. El ensamblaje de las partículas ocurre en el retículo endoplásmico del enterocito. Los quilomicrones recién sintetizados poseen las ApoB-48 y ApoA, y al incorporarse al torrente circulatorio, recogen las ApoC y ApoE de las HDL. El hígado capta primero los quilomicrones remanentes y posteriormente los quilomicrones

intestinales o nacientes y las VLDL. Los quilomicrones y las VLDL poseen la apoC-II que activa la lipoproteína lipasa anclada al endotelio de los capilares sanguíneos, esta enzima con fosfolípidos que son su cofactor hidroliza sucesivamente los triacilgliceroles hasta ácidos grasos libres y glicerol. Los ácidos grasos libres pueden regresar a la circulación y son transferidos a la albúmina sérica, pero la mayoría son transportados a los tejidos. El marcaje de ácidos grasos de los triglicéridos de los quilomicrones demuestra que el 80% de los triacilgliceroles son metabolizados en el tejido adiposo, corazón y músculo y el resto por el hígado. Tras la pérdida de estos triacilgliceroles los quilomicrones remanentes reducen su diámetro a la mitad, pierden ApoC-II y se enriquece de colesterol y colesterol esterificado. Finalmente los quilomicrones son captados y asimilados por el hígado mediante el reconocimiento de la ApoE por un receptor específico (Hernández M., Sastre G., 1999).

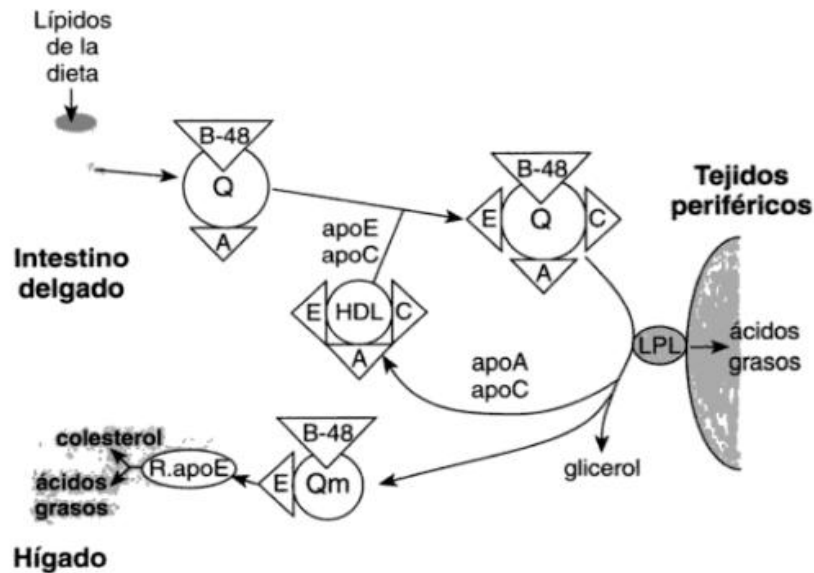
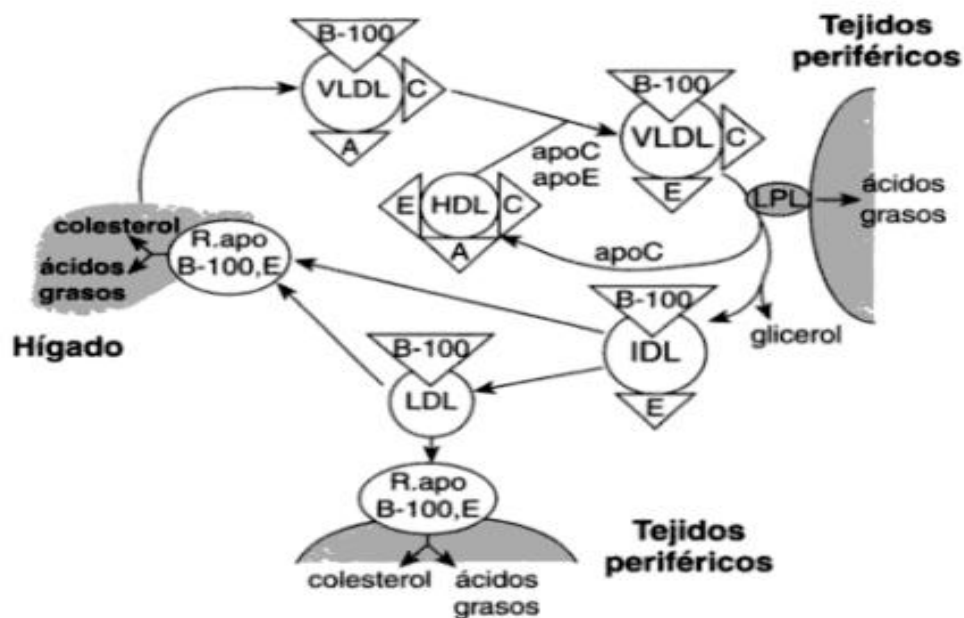


Figura 12: Destino metabólico de los quilomicrones (Q), ApoA, ApoB-48, ApoC y ApoE (Hernández Rodríguez M., 1999)

En el hígado las VLDL son sintetizadas y secretadas al torrente circulatorio. Las VLDL nacientes portan las apoproteínas B-100 y ApoE, y captan la ApoC-II de las HDL. Los ácidos grasos empleados para la síntesis de los triacilgliceroles constituyentes de las VLDL tienen dos orígenes 1) síntesis de novo de acetil-CoA y 2) los ácidos grasos libres captados de la circulación.

Estudios realizados con ApoB-100 marcadas han mostrado que las partículas de VLDL son las precursoras de IDL, y estas de las LDL. Las IDL tienen dos posibles destinos metabólicos, pueden ser captadas por los hepatocitos o son catabolizadas a LDL en el torrente sanguíneo. Las LDL tienen una vida media aproximada de dos días y medio y son degradadas en los tejidos periféricos y una parte en el hígado. Las HDL son sintetizadas y secretadas por el intestino e hígado, la función principal de las HDL es retirar el colesterol excedente de los tejidos y transportar las ApoC y ApoE necesarias para el metabolismo de quilomicrones y VLDL, por tanto las ApoC y ApoE son sintetizadas en el hígado y transferidas de las HDL hepáticas a las HDL intestinales.

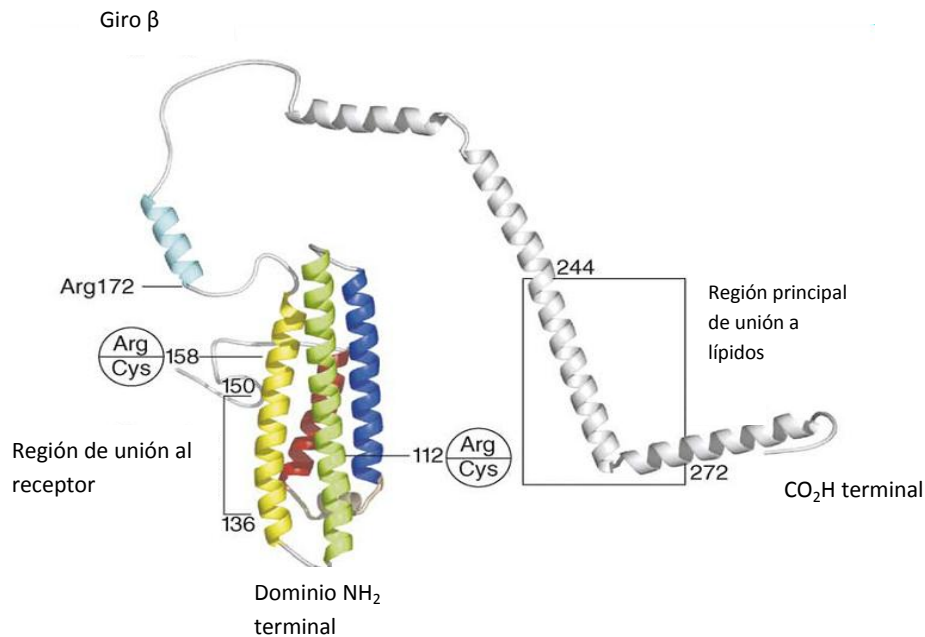


**Figura 13: Metabolismo de lipoproteínas** destino metabólico de las lipoproteínas VLDL, LDL e IDL, ApoA, ApoB-100, ApoC, ApoE. (Hernández Rodríguez M., 1999)

### 1.7.3 Apolipoproteína E (ApoE)

La apolipoproteína E (ApoE) en estudios recientes ha sido considerada como un posible factor de riesgo para desarrollar EVC isquémica, por lo que más específicamente nos centraremos en el estudio de esta apolipoproteína (ApoE).

Inicialmente la ApoE se llamó apolipoproteína rica en arginina y fue identificada por primera vez en 1973, como una apolipoproteína constituyente de las VLDL. La secuencia de aminoácidos obtenida en 1981 mostró que se trataba de un polipéptido de 299 aminoácidos que posee 8 secuencias consecutivas repetidas (in tandem) de 22 residuos de aminoácidos con naturaleza helicoidal antipática, características que sugieren una relación con unión a lípidos. (García A., 2003). La estructura secundaria de ApoE consta de 62% de hélices  $\alpha$ , 9% de hojas  $\alpha$ , 11% de vueltas  $\beta$  y 18% de estructura aleatoria. Posee además hélices  $\alpha$  antipáticas (una cara con residuos polares y otra con residuos apolares), característica de todas la apolipoproteína y que es fundamental para la unión a lípidos. La proteína posee dos dominios estructurales separados por la estructura aleatoria, la región amino terminal (entre los aminoácidos 1 a 191) en la cual se encuentra el sitio activo, y la región carboxi-terminal con estructura típica de apolipoproteína, en donde se encuentra el sitio de unión a lípidos. (García, 2003)



**Figura 14: Estructura de la apolipoproteína E** (Hatters M.D., 2006)

Las funciones de la ApoE incluyen el mantenimiento de la estructura de las lipoproteínas, regulación del metabolismo de lipoproteínas a través de uniones de alta afinidad (García, 2003), interacción con los receptores de las lipoproteínas de baja densidad (R-LDL) y el receptor relacionado al R-LDL (LRP); de esta forma contribuye a la depuración de lipoproteínas ricas en triglicéridos y a definir los niveles plasmáticos de triacilglicéridos y colesterol total. (Ney Callas, et al., 2007).

#### 1.7.4 Genética de Apolipoproteína E

El gen de la apolipoproteína E (ApoE) está localizado en los brazos largos del cromosoma 19 en la región 19q13.2 cerca de la región donde se codifican los genes de ApoC-I y ApoC-II (García, 2003), este gen está formado por cuatro exones y tres intrones, con una extensión de 3.597 nucleótidos (Shajith Anoop, 2010). El gen de ApoE es un gen polimórfico con 3 alelos diferentes  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  y  $\epsilon 4$ , estos alelos generan tres isoformas de la proteína llamados E2, E3 y E4. Estos tres alelos son heredados de forma codominante dando como resultado la opción de 6 genotipos: E2/2, E2/3, E3/3, E3/4, E4/4 y E4/2. (García, 2003). La isoforma más frecuente de esta proteína es E3, esta se caracteriza por tener en la posición 112 un residuo de cisteína y un residuo de arginina en la posición 158 en la región

de unión a receptores. La isoforma E4 tiene arginina en la región 112 y arginina en la región 158, E4 está relacionada con colesterol elevado y es considerado un factor que eleva el riesgo de sufrir demencia tipo Alzheimer (DavignonC, 1988), la isoforma E2 tiene cisteína en el residuo 112 y cisteína en el residuo 158 y está relacionada a hiperlipidemias tipo III (Aslanidis C, 1999).

**TABLA 3 ISOTIPOS DE APO E** (García, 2003)

Isoformas	Aminoácidos	% unión al receptor	Frecuencia y defecto
E3	112 Cys y 158 Arg	100%	75%, presenta un fenotipo normal en cuanto a expresión de proteína
E2	112 Cys y 158 Cys	Es 2% de la afinidad de E3	10%, relacionada con hiperlipidemia III, aterosclerosis ,TG
E4	112 Arg y 158 Arg	Más del 100%, afinidad muy alta	15% aterosclerosis , Alzheimer, TG

Las LDL poseen dos tipos de receptores para ApoE unos específicos y otros que reconocen también a ApoB. La unión de las isoformas de ApoE al receptor se da de manera diferente, de manera que ApoE4 se une con mayor afinidad que ApoE3 al receptor, mientras que la afinidad de ApoE2 es menor. Esta interacción diferencial con los receptores de lipoproteínas específicos, produce una variación de los niveles lipídicos y de lipoproteínas circulantes.

La isoforma E4 tiene alta afinidad con las lipoproteínas ricas en triglicéridos e induce que el hígado tome estas partículas más rápidamente, esto tiene como consecuencia el aumento del colesterol en los hepatocitos y el número de receptores LDL es regulado negativamente, disminuyendo su número, esto resulta en la disminución del catabolismo de la LDL plasmática y en el aumento de los niveles de colesterol unido a LDL (LDL-c), esto se ha demostrado en individuos caucásicos homocigotos (E4/E4) y heterocigotos (E3/E4) para este alelo y se asocian niveles altos de colesterol total y LDL comparados con el alelo más común que es  $\epsilon$ 3. El alelo de  $\epsilon$ 2 tiene el defecto metabólico opuesto al descrito para el alelo  $\epsilon$ 4, ya que la afinidad de E2 con los receptores es reducido, hay decremento

en los niveles de colesterol contenido en los hepatocitos e incremento de los receptores LDL por una regulación positiva, resultando en un aumento del catabolismo de las LDL del plasma y bajando el nivel del colesterol unido a LDL, este alelo se asocia entonces a bajas concentraciones de LDL y colesterol total y al aumento en la concentración de triglicéridos, comparados con los niveles obtenidos con el alelo  $\epsilon 3$  (García, 2003).

También se ha asociado a la ApoE2 y ApoE4 como factores de riesgo para hemorragia cerebral relacionada con antipatía amiloide , describiéndola como factor acelerador del proceso que conduce a este evento, la ApoE4 asociada a un incremento en el deposito vascular de péptidos  $\beta$ -amieloides y la ApoE2 promoviendo cambios degenerativos en la pared vascular.

Existen cuatro estudios de caso control y cuatro de cinco metanálisis en donde se reporta un incremento en la frecuencia del alelo  $\epsilon 4$  en pacientes con EVC isquémica (Bersano A, 2008).

## **1.8 Óxido Nítrico Sintasa (eNOS)**

### *1.8.1 Generalidades del óxido nítrico*

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del endotelio vascular era de naturaleza pasiva y que consistía en separar la sangre de las estructuras adyacentes (Martinez Augustin, 2004), se pensaba que era una simple barrera, pero ahora se conocen varias funciones desempeñadas por el endotelio vascular (Duarte Mote Jesus, 2008).

Un endotelio sano regula la función plaquetaria, el sistema de coagulación sanguínea, modula el tono vascular, controla la proliferación de células musculares lisas locales y recluta células sanguíneas (Duarte Mote Jesus, 2008), en contrario estas funciones se pierden cuando existen alteraciones del endotelio vascular y se refleja en numerosas patologías entre las que destaca la aterosclerosis. (Martinez Augustin, 2004). En los últimos años ha quedado

establecido que la disfunción endotelial constituye una de las primeras etapas en el desarrollo de la aterosclerosis y contribuye también a la progresión de la placa aterosclerótica y a la aparición de las complicaciones clínicas correspondientes. En estas condiciones el endotelio pierde sus características antiagregantes, anticoagulantes y fibrinolíticas, pasando a favorecer la aparición de trombos y coágulos (Martinez Augustin, 2004).

Las causas de la disfunción endotelial son muy numerosas infecciones, hipercolesterolemia, dislipidemia, desequilibrio del estado de óxido-reducción local entre otras. (Duarte Mote Jesus, 2008) (Martinez Augustin, 2004).

En 1980 Furchgott y Zawadzki demostraron la necesaria presencia del endotelio vascular para producir relajación de un anillo de aorta torácica de conejo inducida por la acetilcolina, y concluyeron que esta la producía una sustancia difusible liberada por el endotelio que se denominó *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) (Furchgott R, 1980). En 1987 Palmer y colaboradores identificaron el EDRF como óxido nítrico (NO), el cual mediaba indirectamente la acción vaso-relajante de la acetilcolina (Palmer RM, 1987). A partir de esos trabajos y en los últimos años se ha identificado al óxido nítrico en procesos fisiológicos y fisiopatológicos del organismo y las secuencias para la salud.

El óxido nítrico (NO) es uno de los productos más importantes en la síntesis del endotelio (Duarte Mote Jesus, 2008), el óxido nítrico es un gas simple, que actúa en la señalización de diferentes procesos biológicos, es un radical libre que presenta un electrón desapareado en la última capa, lo que lo hace muy reactivo y una vida media ultracorta de milisegundos (Concalves Díaz Rodrigo, 2011).

La producción de óxido nítrico es uno de los principales mecanismos implicados en el funcionamiento del endotelio (Martinez Augustin, 2004), el óxido nítrico es el principal responsable de mantener un estado de vasodilatación regulado. (Duarte Mote Jesus, 2008). Este compuesto químico es un gas que difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células de músculo liso de la pared vascular. (Martinez Augustin, 2004).



### *1.8.2 Biosíntesis del óxido nítrico*

El óxido nítrico es un gas que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina (grupo guanidilo) en L-citrulina mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintasa, para la síntesis de NO además de L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de oxígeno molecular y calmodulina (CaM) y de coenzimas como flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) y grupo hemo. (Martínez Augustin, 2004).

El óxido nítrico se forma a partir del grupo guanidilo que se encuentra en la L-arginina en el endotelio vascular, por medio de la óxido nítrico sintasa. Después que se forma el óxido nítrico, este se difunde a través del endotelio a las células del músculo liso de la pared vascular (Martínez Augustin, 2004), principalmente se une al grupo Hemo de la guanilato ciclasa (Duarte Mote Jesus, 2008), una enzima soluble que favorece la conversión de guanosintrifosfato (GTP) a guanosinmonofosfato cíclico (GMPc). El GMPc desencadena entonces la vasodilatación. (Martínez Augustin, 2004), por tanto podemos decir que la síntesis de óxido nítrico y su efecto vasodilatador se basa en la generación de GMPc (Duarte Mote Jesus, 2008).

Las funciones de NO son muy diversas, el óxido nítrico tiene una participación importante en el control de la presión arterial, controla el tono vascular, contribuye al mantenimiento de la estructura de la pared arterial ya que reprime la proliferación de las células musculares lisas, también tiene acción antiagregante sobre las plaquetas e inhibe la adhesión de los leucocitos al endotelio. (Moncada S, 1991)



**Imagen 15: Síntesis de óxido nítrico** La síntesis de óxido nítrico se da a partir de arginina FAD: flavina adenilnucleotido, FMN flavinmononucleotido, NADPH nicotinamida adenilnucleotido, NOS THB<sub>4</sub> tetrahidrobiopterina.

Actualmente se han identificado tres isoformas de la enzima (óxido nítrico sintasa), dos isoformas constitutivas dependientes de calcio; la endotelial (eNOS) o tipo III y la neural (nNOS) o tipo I, presentes en diferentes tejidos y una forma calcio independiente o tipo II (iNOS), esta es estimulada principalmente por el factor de necrosis tumoral (FNT) y diferentes interleucinas.

**TABLA 4 ISOFORMAS DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA** (Ferrer Viant Dora, 1998)

Isoforma	Otro nombre	Peso Molecular	Regulación	Localización
NOS tipo I	nNOS o bNOS	155 kDa	Ca <sup>2+</sup> y Calmodulina	Neuronas del SNC y SNP, neuroglías, islotes de páncreas.
NOS tipo II	iNOS	125 KDa	Expresión inducida por citosinas y endotoxinas	Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas neutrófilos y otros.
<b>NOS tipo III</b>	<b>eNOS</b>	<b>135 kDa</b>	<b>Ca<sup>2+</sup> y Calmodulina</b>	<b>Endotelio vascular, riñón y plaquetas.</b>

### *1.8.3 Genética de la óxido nítrico sintasa*

El gen que codifica para la óxido nítrico sintasa neuronal o NOS I (nNOS) se localiza en el cromosoma 12 en la región q24.2, mientras que el gen que codifica para la NOS II o iNOS se localiza en el cromosoma 17cen-q12 y el gen que codifica para la NOS III o eNOS se localiza en el cromosoma 7 en la región q35-36. (Concalves Díaz Rodrigo, 2011)

La enzima constitutiva del endotelio (eNOS o NOS III) es la responsable de la formación habitual del óxido nítrico (Martinez Augustin, 2004) y la que se encuentra en mayor cantidad y en la cual nos enfocaremos más a detalle.

En este gen que codifica para la eNOS se han identificado algunos polimorfismos que se han asociado con alteraciones del tono vascular e hipertensión arterial, uno de los polimorfismos relacionados (Wayne Ch, 2003) es el Glu298Asp este polimorfismo genera un cambio de glutamato por aspartato en la posición 298 en el exón 7, y ha sido asociado con espasmo coronario enfermedad arterial coronaria e infarto al miocardio (Colombo MG, 2002). Otro polimorfismo asociado con enfermedades vasculares se encuentra en la región 5' del promotor de este gen (eNOS) este polimorfismo se denomina T786C, el cual consiste en un cambio de timina por citosina en la posición 786 de este gen, este polimorfismo ha sido relacionado con desarrollo de enfermedad coronaria (Yoshimura M, 2000), existe otro polimorfismo el 4ab de la eNOS que es una inserción/delección de 27 pares de bases en el exón 4 de este gen, este polimorfismo con elevadas concentraciones de homocisteína se ha relacionado con el desarrollo de enfermedad coronaria. (Chavarria, 2006)

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La EVC es una enfermedad multifactorial la cual está asociada a diversas causas, dentro de estas se encuentran las enfermedades como: Diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedades coronarias, así como la obesidad, el tabaquismo, alcoholismo y antecedentes familiares con EVC. Existen enfermedades con alteraciones genéticas como Síndrome de Marfan, Telangiectasia hemorrágica hereditaria, riñones poliquísticos que han sido asociadas a casos de EVC. Por lo que en personas que presenten uno o más de estos factores de riesgo esta patología puede ser explicada. Sin embargo existen persona que no presentan ningún factor de riesgo conocido y desarrollan la enfermedad, esto nos lleva a plantear nuevos posibles factores de riesgo, entre ellos los factores de riesgo genéticos, tales factores de riesgo genéticos se encuentran localizados en diferentes genes y están involucrados en varios sistemas y vías relacionadas con el riesgo de desarrollar EVC isquémica; estos genes están asociados con factores de coagulación y trombofilia, función endotelial y metabolismo de lípidos.

## **3. HIPÓTESIS**

Si el riesgo de desarrollar Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica se debe a la presencia de uno o más de los siguientes polimorfismos: C677T del gen de la MTHFR, 4G/5G de PAI-1, G20210A del gen de la Protrombina, Arg506Gln del factor V (FVL), el alelo 4 del gen de ApoE y la inserción/delección (4ab) del gen de la óxido nítrico sintasa, se espera que estos polimorfismos estén presentes en los pacientes en estudio.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar sí los polimorfismos C677T del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR), 4G/5G del gen del el Activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1), G20210A del gen que codifica para la Protrombina (PTH), Arg506Gln del gen del factor V conocido como Factor V de Leiden (FVL), la inserción/delección (4ab) en el exón 4 de la óxido nítrico sintasa III (eNOS) o la presencia del alelo 4 en el gen de la apolipoproteína E (ApoE) son factores de riesgo genéticos, solos o en conjunto para desarrollar Evento Vascular Cerebral isquémico (EVC) en pacientes jóvenes adultos que no presenten factores de riesgo clásicos como hipertensión, diabetes, antecedentes de EVC, tabaquismo y obesidad, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's).

### 4.1 *Objetivos particulares*

- Realizar un análisis estadístico comparando el resultado de los polimorfismos obtenidos de pacientes y controles sanos, para determinar si son factores de riesgo para desarrollar la enfermedad.
- Obtener datos de prevalencia de estos polimorfismos en pacientes población mexicana.
- Realizar un análisis de haplotipos para determinar si existe riesgo de padecer EVC si se presenta uno o más de estos polimorfismos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Material, equipo y reactivos

- **Material**

- Probetas 100 y 250 ml
- Matraz aforado 1 y 2 litros
- Vaso de precipitado 50, 250 ml y 1 y 2 litros
- Micropipetas 10, 20 100, 200 y 1000 microlitros
- Matraz Erlenmeyer 250 ml
- Tubos eppendorf
- Espátula
- Agitador magnético

- **Equipo**

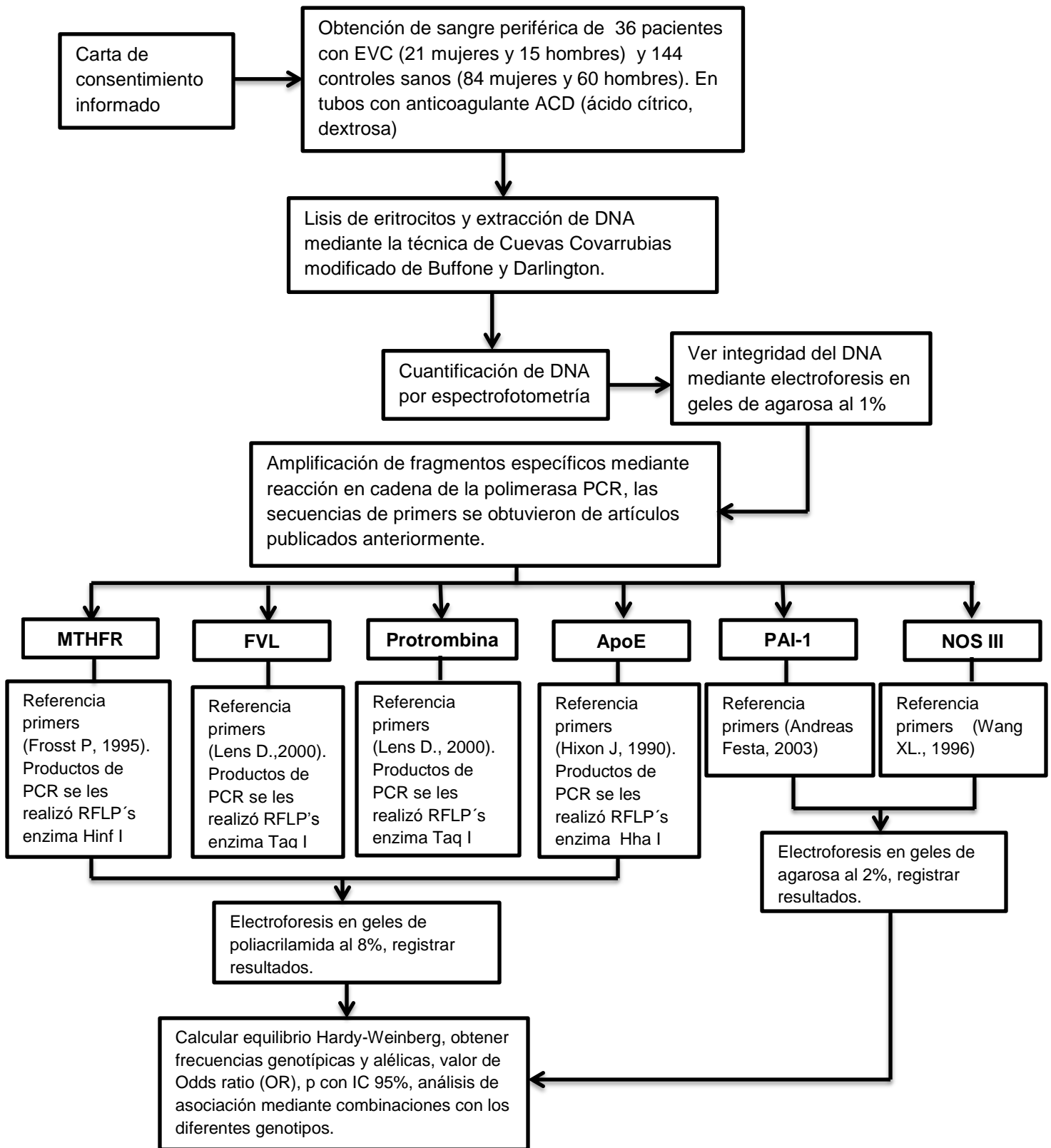
- Centrífuga SORVALL MC 12V
- Espectrofotómetro JENWAY Genova Nano
- Centrífuga 5804 R Eppendorf
- Centrífuga de vacío Heto VR-1
- Termociclador AXIGEN MAXYGEN
- Termociclador eppendorf Martercycler gradient
- Balanza analítica Sartorius BP2105
- Agitador orbit Shaker Lab-line
- Cámaras horizontales electroforesis Labnet
- Fuente de poder Labnet Power Station 300
- Vortex Genie 2
- Termoblok LAB-LINE
- Cámaras verticales de electroforesis
- Transiluminador Dual Intensity UV Labnet

- **Reactivos**

- TTS (Tris-Tritón-Sacarosa)
- NaCl 5µm y saturado
- SDS 10% (dodecil sulfato de sodio)
- Cloroformo/alcohol isoamílico (49:1)
- Etanol absoluto

- Etanol al 70%
- Agarosa
- TBE (Tris-Acido Bórico-EDTA)
- Colorante de carga (Xilencianol, azul de bromofenol y glicerol )
- Bromuro de etidio
- Acrilamida
- Persulfato de amonio
- N,N,N,N-Tetrametiletildiamina SIGMA
- Master Mix
- Agua inyectable
- Agua bidestilada estéril
- Hipoclorito de sodio

## 5. 2 Diagrama general





### *5. 3 Criterios de selección de pacientes*

Los pacientes fueron reclutados por la clínica de enfermedades vasculares del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, con un diagnóstico de EVC isquémico con una edad entre 45 y 55 años. Se les proporcionó una carta de consentimiento informado donde aceptaban participar en este estudio. El protocolo fue aceptado por el comité de Bioética de este Instituto, siguiendo los lineamientos del acuerdo de Helsinki.

Los pacientes no presentaban factores clásicos de riesgo como edad, antecedentes familiares de EVC, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes mellitus y obesidad.

Se obtuvieron aproximadamente 20 ml de sangre periférica en tubos vacutainer, que contenían ácido cítrico dextrosa, el ácido cítrico tiene acción anticoagulante mientras que la dextrosa tiene la función de preservar células (leucocitos).

### *5. 4 Obtención de controles sanos*

Los controles fueron proporcionados por el banco de sangre de este Instituto de forma anónima y los cuales cumplían con los criterios de inclusión, esto es edad, no antecedentes familiares de EVC, hipertensión, diabetes, obesidad y tabaquismo.

### *5. 5 Extracción de DNA*

La extracción de DNA a partir de muestras de distinta naturaleza constituye la etapa previa de todo análisis molecular. La extracción se divide en dos partes la primer parte es la lisis, y la segunda parte es la extracción, que en este caso se realizó mediante la técnica de Cuevas Covarrubias modificado de Buffone y Darlington.

La lisis consiste en romper las membranas de las células para que el contenido celular pueda quedar expuesto, esto se logra con detergentes como el SDS, la

eliminación de proteínas por medio de precipitación con sales, ya que las proteínas constituyen el principal contaminante del DNA además de ayudar a su degradación. Una vez que se han eliminado las proteínas es necesario precipitar el DNA, el cual es insoluble en etanol por lo que se puede precipitar utilizando etanol absoluto frío y centrifugación, para finalizar se realizó un lavado con etanol al 70%, se centrifugo, el botón obtenido y se secó en una centrifuga de vacío y se disolvió en agua a 50° C.

### *5.6 Cuantificación y pureza del DNA por espectrofotometría*

Una vez que se extrajo el DNA se cuantifico mediante espectrofotometría, esto se puede realizar ya que las purinas y las pirimidinas tienen la propiedad de absorber luz UV a una longitud de onda de 260 nm, mientras que la lectura a 280 nm nos proporciona la cantidad de proteínas de la muestra. **Fuente especificada no válida.**

Para determinar la concentración de DNA se utiliza la siguiente relación:

$$DNA \text{ ng}/\mu l = \text{absorbancia } 260 \text{ nm} \times \text{factor de dilución} \times 50 \text{ ng}/\mu l$$

La determinación de la pureza del DNA se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280 nm.

$$Pureza \text{ DNA} = \text{absorbancia } 260 \text{ nm} / \text{absorbancia } 280 \text{ nm}$$

Una relación entre 1.8 y 2 nos indica una alta pureza.

### *5.7 Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida*

La concentración e integridad del DNA extraído, así como el tamaño de distinto fragmentos (productos de PCR), se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz como matriz utilizamos agarosa y poliacrilamida. La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos el grupo fosfato es el responsable de la carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo). (Possos, 2009)

La resolución y velocidad de separación de fragmentos de DNA por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa o poliacrilamida en el gel y por el voltaje aplicado. La agarosa y la poliacrilamida funcionan como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente que los de mayor tamaño. Al aumentar la concentración la migración de los fragmentos se dificulta permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud, el incremento de voltaje aumenta proporcionalmente a la velocidad de migración de los fragmentos en el gel. (Possos, 2009).

El DNA separado mediante electroforesis puede visualizarse mediante tinción con colorantes fluorescentes como el bromuro de etidio el cual funciona intercalándose entre los pares de bases que conforman el ácido nucleico, el bromuro de etidio emite fluorescencia cuando es expuesto a la luz UV. (Possos, 2009)

Una vez extraído y cuantificado el DNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, el gel se tiñó con bromuro de etidio, esto nos permitió obtener de forma cualitativa la cantidad de DNA que se tuvo en las muestras así como la integridad del mismo.

Evaluar la integridad es un paso importante ya que nos permitió determinar que cantidad de DNA se utilizó para la reacción de PRC. Por lo que cuando se observaba degradación se aumentaba la cantidad de DNA para la PCR.

## 5.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar fragmentos de DNA específicos, el proceso requiere una serie de repeticiones de tres pasos que definen un ciclo.

### 1. Desnaturalización

Consiste en separar la doble cadena, esto se logra con temperaturas entre 90 y 95°C.

### 2. Alineación

La temperatura disminuye entre 55 y 65°C para permitir que los primers se unan al DNA de cadena sencilla. Los primers sirven de punto de iniciación para la síntesis de nuevas cadenas complementarias al DNA diana.

### 3. Elongación

En este punto la taq polimerasa extiende los primers añadiendo nucleótidos en dirección 5'-3', haciendo una copia de doble cadena del DNA diana, esto ocurre a temperaturas entre 70 y 75°C.

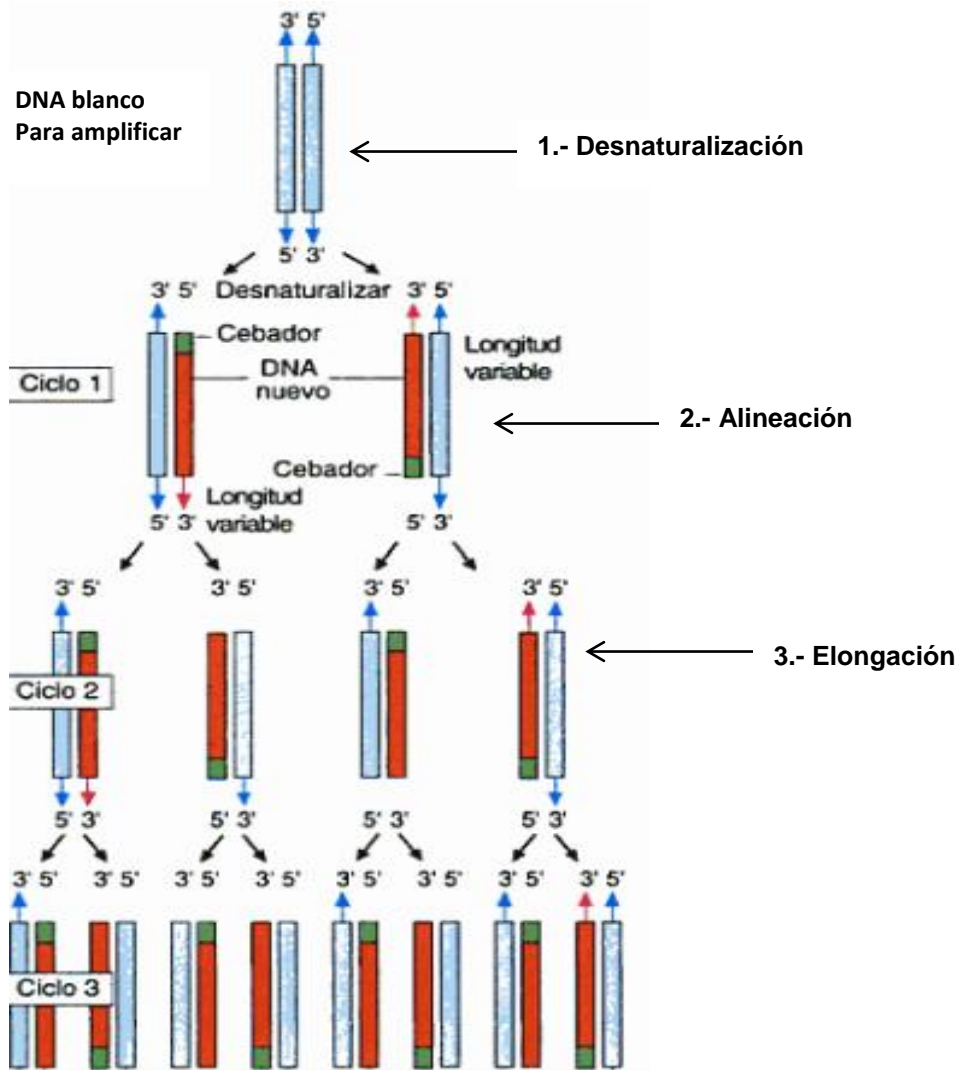


Figura 16 Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Passarge E. , 2007)

### 5.9 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan o restringen sitios específicos del DNA (secuencia de reconocimiento). Las secuencias de reconocimiento tienen un tipo de simetría en el que la secuencia nucleotídica se lee igual en ambas cadenas en dirección 5'-3' llamadas palíndromos. Estas enzimas son producidas por bacterias como un mecanismo de defensa.

Actualmente se utilizan formas purificadas para llevar a cabo técnicas de biología molecular como RFLPs (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción).

A los productos de PCR que se obtuvieron se les realizó RFLP's, de esta manera se determinaron los genotipos, ya que al existir los polimorfismos (C677T, A/A, 3/4 y a/a) se creó un sitio de corte para la enzima de restricción, esto se pudo visualizar mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida.

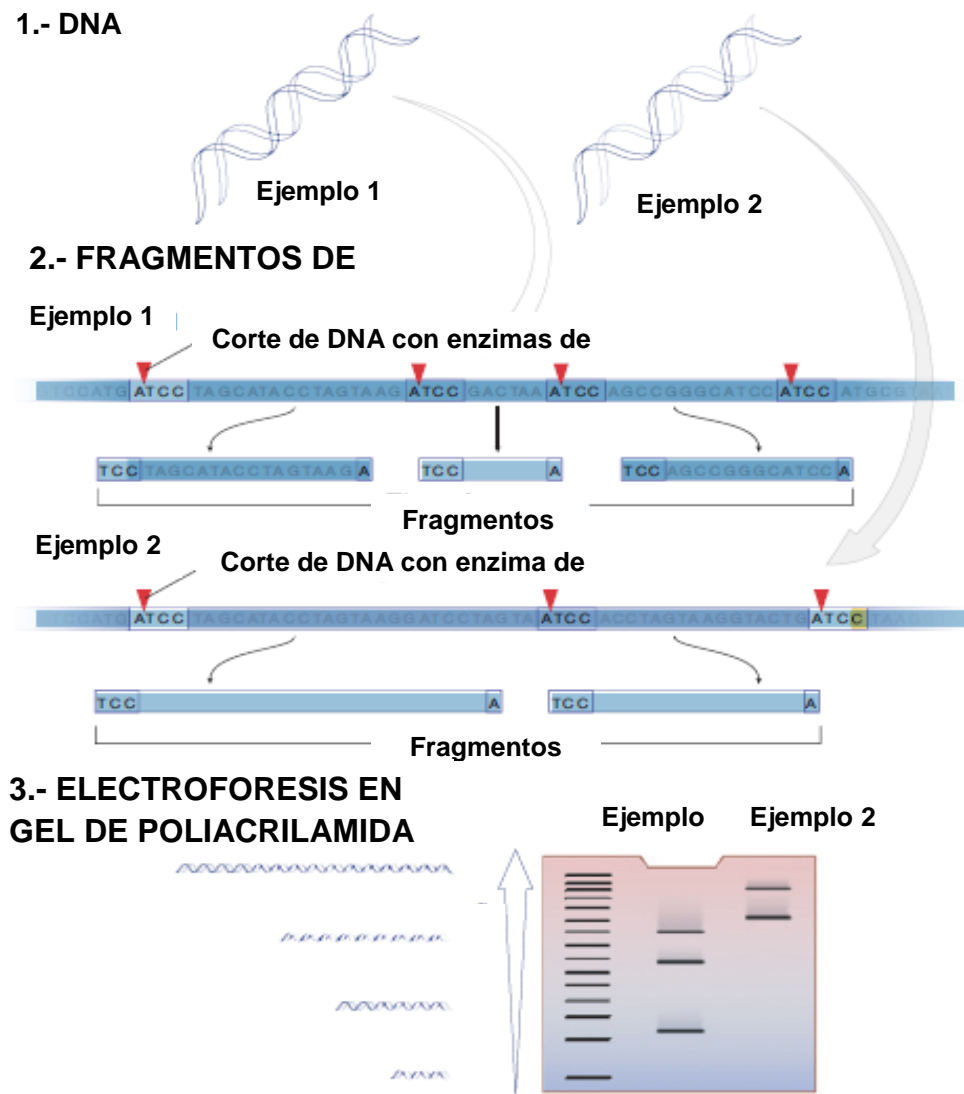


Figura 17: Esquema general de la técnica de RFLP's (Tortora Gerard, 2007)

### 5.10 Determinación de polimorfismos

Una vez extraído el DNA se llevó a cabo la amplificación mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las siguientes condiciones.

- *C677T de la Metilentetrahidrofolato reductasa*

Para la determinación del polimorfismo *C677T* del gen de la *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos, *forward 5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGGA 3'* y *reverse 3' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 5'* (Frosst P, 1995), la reacción de PCR consta de 35 ciclos con temperaturas de 96°C por 5 minutos, 93°C 50 segundos con una temperatura de alineación de 55°C por 50 segundos, 72°C 30 segundos y 10 minutos. Para esta reacción se utilizó 1 µl de DNA (100 ng/µl), 1 µl de cada primer, 9 µl de agua y 8 µl de Master mix que es una mezcla que contiene MgCl<sub>2</sub> (15 mM), dNTP's (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) 100 ng/µl y Taq DNA Polimerasa (4 U/µl) obtenido un volumen total de reacción de 20 µl. Se obtuvo un producto de PCR de 197 pb, el cual se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, al producto de PCR se les realizó RFLPs con la enzima Hinf I a 37°C por 3 horas, si existía el polimorfismo se generaba un sitio de restricción (GANTC; CTNAG), que proporcionaba dos bandas una de 172 pb y otra de 25 pb. Al terminar la digestión se realizó una electroforesis en geles de acrilamida al 8%, los fragmentos obtenidos fueron comparados con un marcador de peso molecular de 100 pb (100pb a 1000 pb).

- *G20210A del gen de Protrombina*

Para determinar el polimorfismo *G20210A* del gen de *Protrombina (PTH)* los oligonucleótidos que se utilizaron fueron primer forward *5' CAATAAAAGTGACTA 3'* y *reverse 3' AGGTGGTGGATTCTTAAGTC 5'*, (Lens Daniela, 2000) las condiciones de reacción utilizadas fueron 35 ciclos

con temperaturas de 94°C 2 minutos, 94°C 20 segundos, una temperatura de alineación de 55°C 30 segundos, 72°C 20 segundos y 72°C 3 minutos, el volumen final de esta reacción fue de 20 µl de los cuales fue 1 µl de DNA (100ng/µl), 8 µl de Master Mix, 1 µl de primer forward y 1 µl de primer reverse y 9 µl de agua, se verificaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, se realizó la técnica de RFLP's a 37°C por 4 horas con la enzima Taq 1 y se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%.

- *Arg506Gln Factor V de Leiden*

Para el gen del Factor V de Leiden (*FVL*) se utilizaron dos oligonucleótidos que flanquean un fragmento de 147 pares de bases que codifican el sitio de clivaje de la proteína C activada y presentan la siguiente secuencia forward 5' CATGAGAGACATCGCCTCTG 3' y reverse 3' GAC CTA ACA TGT TCT AGC CAG AAG 5' (Lens Daniela, 2000) , las condiciones de reacción fueron 35 ciclo con temperaturas de 94°C 2 minutos, 94°C 20 segundos temperatura de alineación de 55°C 30 segundos 72°C 20 segundos y 72°C 3 minutos, el volumen final de esta reacción fue de 20 µl; 1 µl de DNA (100 ng/µl), 8 µl de Master mix, 1 µl de primer Forward y Reverse y 9 µl de agua. Se aseguró la amplificación de los fragmentos deseados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente se realizó la digestión enzimática (RFLPs) a 37°C por 4 horas con la enzima Taq I (TCGA; AGCT), se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, los fragmentos fueron comparados con un marcador de peso molecular.

- *Alelo 4 del gen Apolipoproteína E*

En el caso del gen de la *apolipoproteína E (ApoE)* los oligonucleótidos usados fueron forward 5' TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA 3' y



*reverse 3' ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC 5'* (Hixon J.E, 1990), se utilizaron 15 µl de Master mix, 1 µl de cada primer, 3.5 µl de agua, 3 µl de DNA y 1.5 µl de DMSO (dimetilo sulfóxido). El DMSO es un líquido orgánico altamente polar con una alta constante dieléctrica que se agrega a la reacción de PCR ya que tiene la facilidad de romper las estructuras secundarias del DNA templado o blanco. El DMSO rompe los puentes de hidrógeno desestabilizando la doble hélice de DNA, así evita la formación de estructuras secundarias y de esta manera los oligonucleótidos tienen una mejor unión a la cadena de DNA que se desea amplificar, lo que ayuda a la especificidad a la hora de amplificar fragmentos de DNA. El DMSO tiene mayor eficacia cuando el DNA templado tiene una alta cantidad de G y C.. La reacción consta de 39 ciclos con temperaturas de 94°C 5 minutos, 94°C 30 segundos, la temperatura de alineación es de 65°C por 30 segundos, 70°C 1:30 y 70°C 10 minutos. Posteriormente se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% y RFLPs con 4U de la enzima Hha I, que reconoce la secuencia GCGC y se incubó a una temperatura de 37°C con un tiempo de incubación de 4 horas, Una vez terminada la digestión enzimática, se realizó una electroforesis en geles de acrilamida al 8% donde se compararon los fragmentos con un marcador de peso molecular que va de 8 a 587 pb.

- *4G/5G del Inhibidor del activador del plasminógeno 1*

En el caso del *activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1)* por tratarse de una inserción/delección se realizaron dos reacciones de PCR por separado una para el alelo 4G y otra para el alelo 5G. Para determinar la presencia del alelo 4G se utilizaron 3 primers, el downstream (común), el upstream (control) y el primer específico para el alelo 4G (delección) ; para determinar la presencia del alelo 5G se utilizaron el primer downstream, el upstream y el primer específico para el alelo 5G (inserción) Los oligonucleótidos para el primer downstream son 5'

*TGCAGCCAGCCACGTGATTGTCTAG* 3' y para el primer Upstream 3' *AAGCTTTTACCATGGTAACCCCTGGT* 5', para el alelo 4G los oligonucleótidos son 5' *GTCTGGACACGTGGGGA* 3' y para el alelo 5G 5' *GTCTGGACACGTGGGGG* 3' (Andreas Festa, 2003), las condiciones de reacción son 1 µl de DNA 1 µl de los primers 4G o 5G y Primer downstream, 0.5 µl de primer Upstream, 10 µl de Master mix y 6.5 µl de agua. Las temperaturas son 95°C 5 minutos, 94°C 35 segundos, la temperatura de alineación es de 60°C 35 segundos 72°C 1:10 minutos y 72°C 7 minutos esto por 30 ciclos. Al producto de PCR obtenido se le realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% el cual se tiñó con bromuro de etidio y se comparó con un marcador de peso molecular, de acuerdo al patrón de bandas obtenido es el resultado.

- *Inserción/delección a/b de la óxido nítrico sintasa*

Para el gen de la óxido nítrico sintasa los oligonucleótidos empleados fueron Forward 5' *AGGCCCTATGGTAGTGCCCTT* 3' y Reverse 3' *CTCCTTAGTGCTGTGGTCAC* 5' (Wang XL., 1996). La reacción consta de 35 ciclos con las siguientes temperaturas 94°C 2 minutos, 94°C 20 segundos, la temperatura de alineación fue de 55°C 30 segundo, 72 °C 20 segundos y 72° C 3 minutos. Se utilizó 1 µl de DNA, 1 µl de cada primer, 5 µl de Mater Mix y 2 µl de agua, obteniendo un volumen total de 10 µl. A los productos de PCR se les realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% para obtener resultados se compararon los fragmentos amplificados con un marcador de peso molecular.

### 5.11 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los resultados de los genotipos mediante PCR y RFLP's se llevó a cabo:

1. El cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg
2. En cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas para cada gen de pacientes y de controles.
3. Se determinó el riesgo relativo, se compararon frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles calculándose el Odds ratio (OR) mediante tablas de 2X2.
4. Se obtuvo el valor de p con Intervalo de Confianza del 95%
5. Se realizó un análisis de asociación mediante las combinaciones que se obtuvieron con los diferentes genotipos, se calculó el valor de OR con Intervalo de Confianza del 95%.

#### 5.11.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La ley de Hardy-Weinberg o equilibrio de Hardy-Weinberg establece que bajo ciertas condiciones en una población, las frecuencias de alelos entre una generación y la siguiente permanecen constantes. Este principio asume que cualquier alelo que causa una enfermedad genética severa incompatible con la reproducción será reemplazado por un alelo con una mutación nueva, mientras la tasa de mutaciones en este locus permanece constante. (Passarge E. , 2009)

El concepto de equilibrio en modelo de Hardy-Weinberg se basa en las siguientes hipótesis:

- la población es panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar)
- la población es suficientemente grande (para minimizar la diferencias existentes entre los individuos)

- la población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos)
- las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

El no cumplimiento de cualquiera de estas hipótesis puede determinar que la población se aleje del equilibrio Hardy-Weinberg. (Oliva Rafael, 2008).

El equilibrio de Hardy-Weinberg se puede calcular con el siguiente binomio

$$(p+q)^2$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dónde:

p= número de homocigotos silvestres

q= número de homocigotos mutados

pq= número de heterocigotos

Una vez resuelto este binomio, se calcula  $X^2$ , si el valor de  $X^2$  es mayor a 3.84, se dice que la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg.

El cálculo del Equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó con un Software:

<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html> (Santiago Rodriguez, 2009)

### 5.11.2 Cálculos de odds ratio (OR)

La razón de momios (OR), es una medida estadística utilizada en estudios epidemiológicos transversales y de casos y controles, y se utiliza para evaluar la asociación entre posibles factores de riesgo de una enfermedad.

El cálculo de OR se realizó mediante un Software:

<http://www.openepi.com/v37/TwoByTwo/TwoByTwo.htm> (Kevin Sullivan, 2013).

. El Software utiliza las siguientes fórmulas para el cálculo correspondiente

### Calculo de Odds ratio

### CALCULO DE X<sup>2</sup>

		CASOS	CONTROLE	
EXPOSICIÓN N	+	a	b	m <sub>1</sub>
	-	c	d	m <sub>0</sub>
		n <sub>1</sub>	n <sub>0</sub>	n

$$uncorr\chi_1^2 = \frac{(n)(ad - bc)^2}{n_1 n_0 m_1 m_0}$$

### P de Mantel Haenszel

Riesgo estimado para =  $\hat{R}_e = a/n_1$

Riesgo estimado para =  $\hat{R}_u = b/n_0$

Riesgo estimado para la población =  $\hat{R} = m_1/n$

$$mh\chi_1^2 = \frac{(n-1)(ad - bc)^2}{n_1 n_0 m_1 m_0}$$

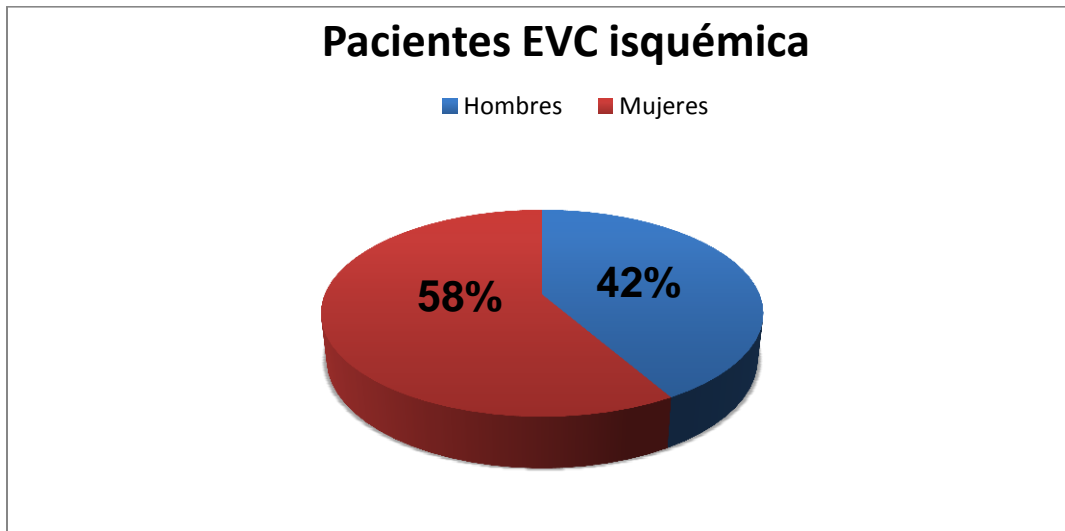
(Kevin Sullivan, 2013)

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Pacientes y controles

Se estudiaron 36 pacientes con evento vascular cerebral isquémico de la Clínica de Enfermedades Vasculares del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (Prom. 40.3 años, rango de 18 a 57 años D.E. 9.2 años, 40.3±9.2), 15 hombres y 21 mujeres, a los cuales se les descartó cualquier factor de riesgo conocido. De igual manera se seleccionaron 144 controles aparentemente sanos, los cuales fueron proporcionados por el banco de sangre de este Instituto para aparearlos 4:1 por género y edad, (promedio de 38 años, rango de edad entre 19 y 58 años, D.E. de 10 años 38±10), 60 hombres y 84 mujeres En ambos grupos el género que predominó fué el femenino.

**Gráfica 1 Frecuencia de pacientes por género con Enfermedad Vascolar Cerebral isquémica**



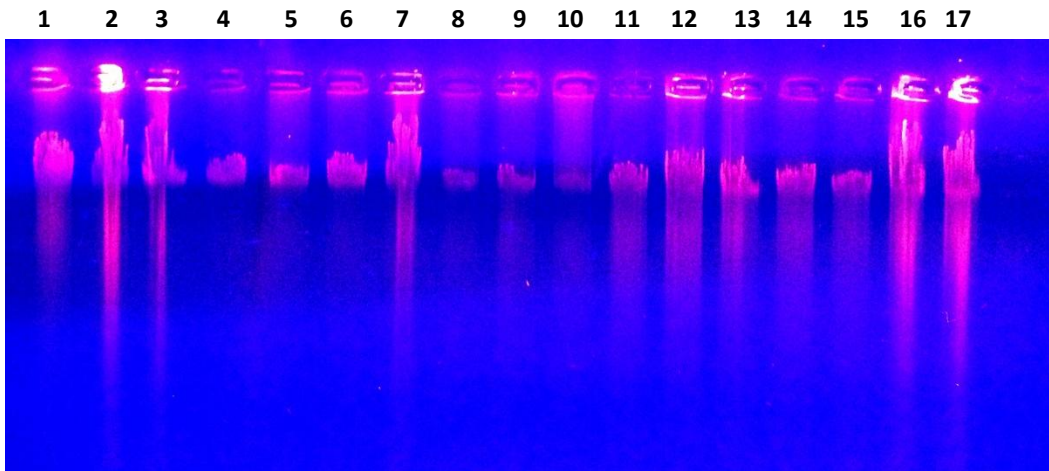
Tanto los pacientes como los controles firmaron una carta de consentimiento informado. Y se les realizó un cuestionario para descartar antecedentes heredofamiliares.

## 6.2 Toma de muestra y extracción de DNA

Se tomaron 15 ml de sangre periférica a ambos grupos para extracción de DNA en tubos tipo Vacutainer con Citrato/Dextrosa.

El DNA se cuantificó mediante espectrofotometría obteniéndose valores desde 500 ng/μl, se realizaron diluciones para obtener una concentración por muestra de 100 ng/μl.

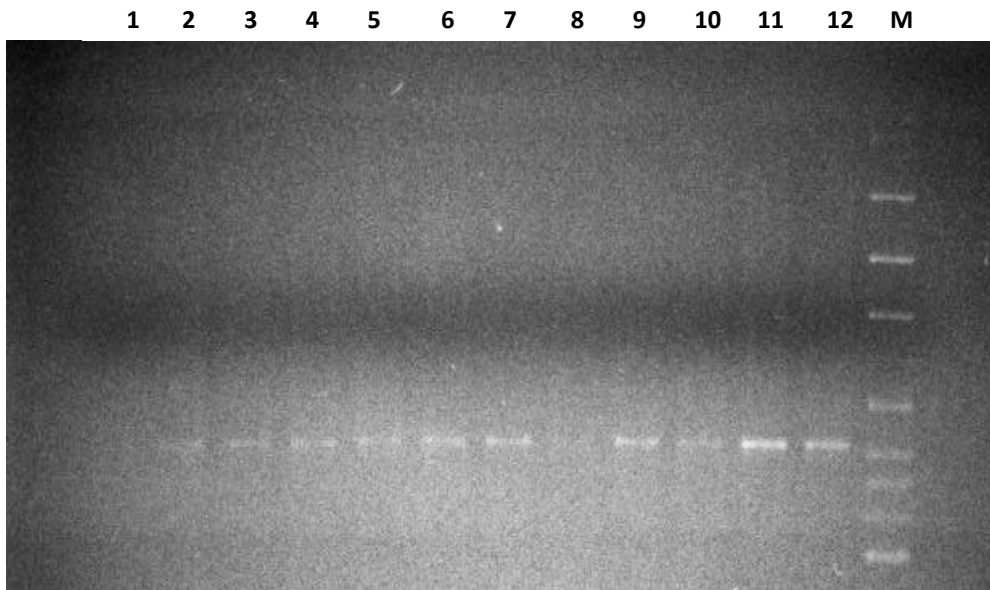
Posteriormente se verificó la integridad del DNA en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. (Figura 18)



**Figura 18: INTEGRIDAD DEL DNA.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se verificó la integridad del DNA, se observa DNA íntegro en los carriles 4,5,6,8,9 y 10 y DNA degradado en los carriles 1,2,3,7,11-17, la intensidad de las bandas está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente en la muestra.

### 6.3 Gradientes de temperatura

Para determinar las temperaturas de alineación de los primers para la PCR, se realizó un gradiente de temperaturas para cada gen, la cual se describe en la metodología. (Figura 19)



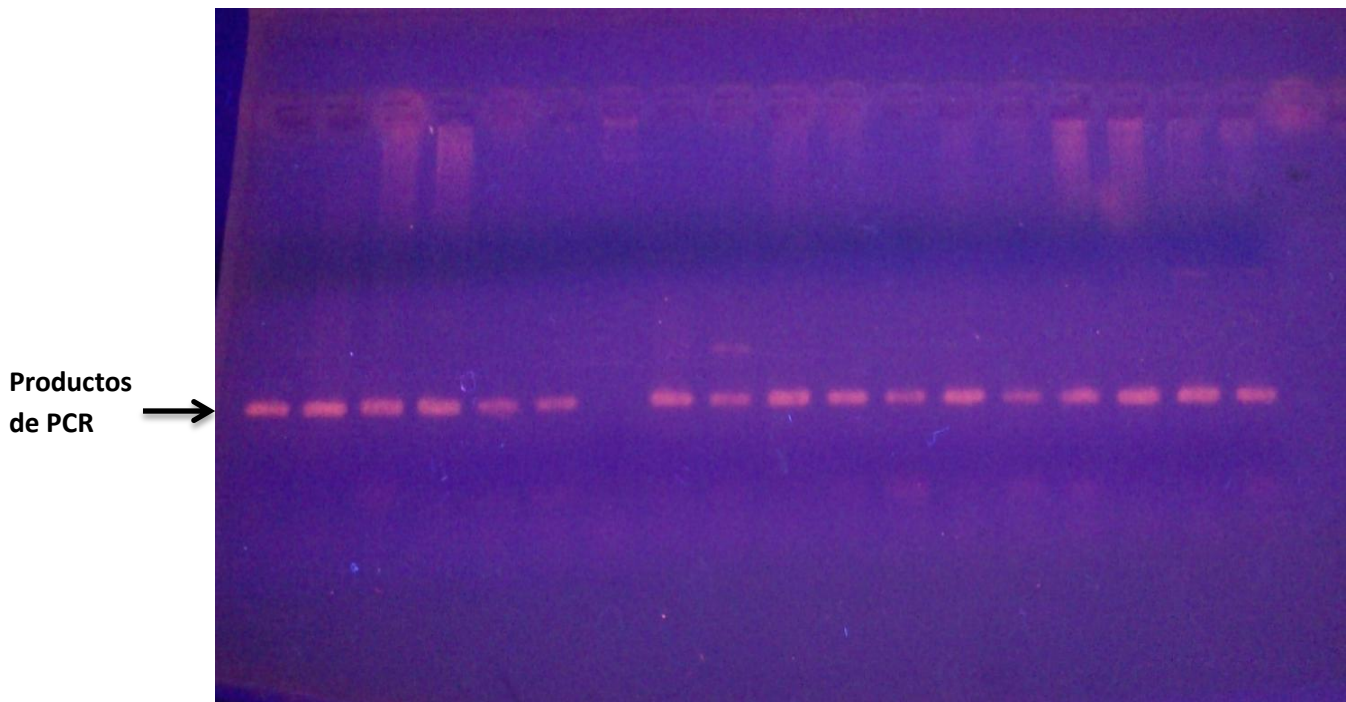
**Figura 19: GRADIENTE.** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestra el gradiente de temperaturas, se observan 12 muestras con temperaturas desde 49°C a 57°C (cada carril corresponde a una temperatura), donde se observa que la temperatura 12 es la temperatura óptima de alineación, ya que muestra una banda más intensa. Esta fotografía es representativa para todos los genes, ya que de la misma manera se obtuvo la temperatura de alineación para cada polimorfismo estudiado.



#### 6.4 Reacción de PCR

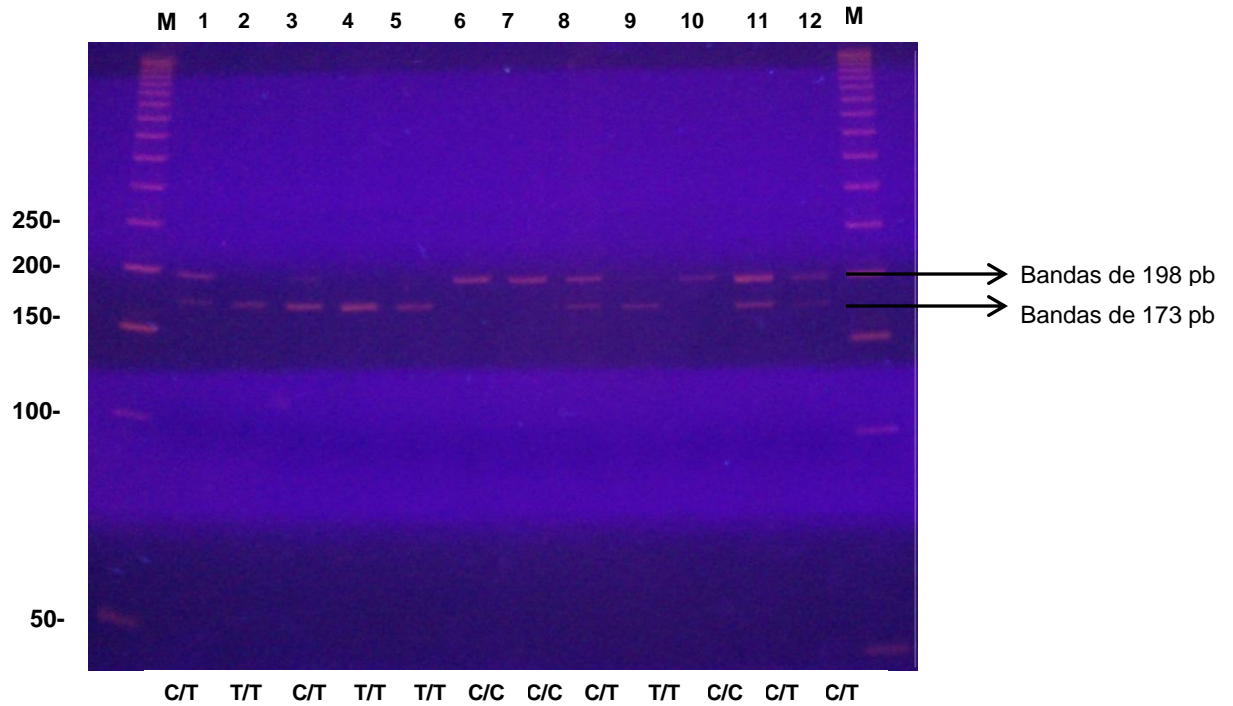
Posterior a esto se llevó a cabo el análisis molecular, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para cada gen (MTHFR, PAI-1, eNOS, ApoE, PTH y FVL).

#### Amplificación de fragmentos por PCR



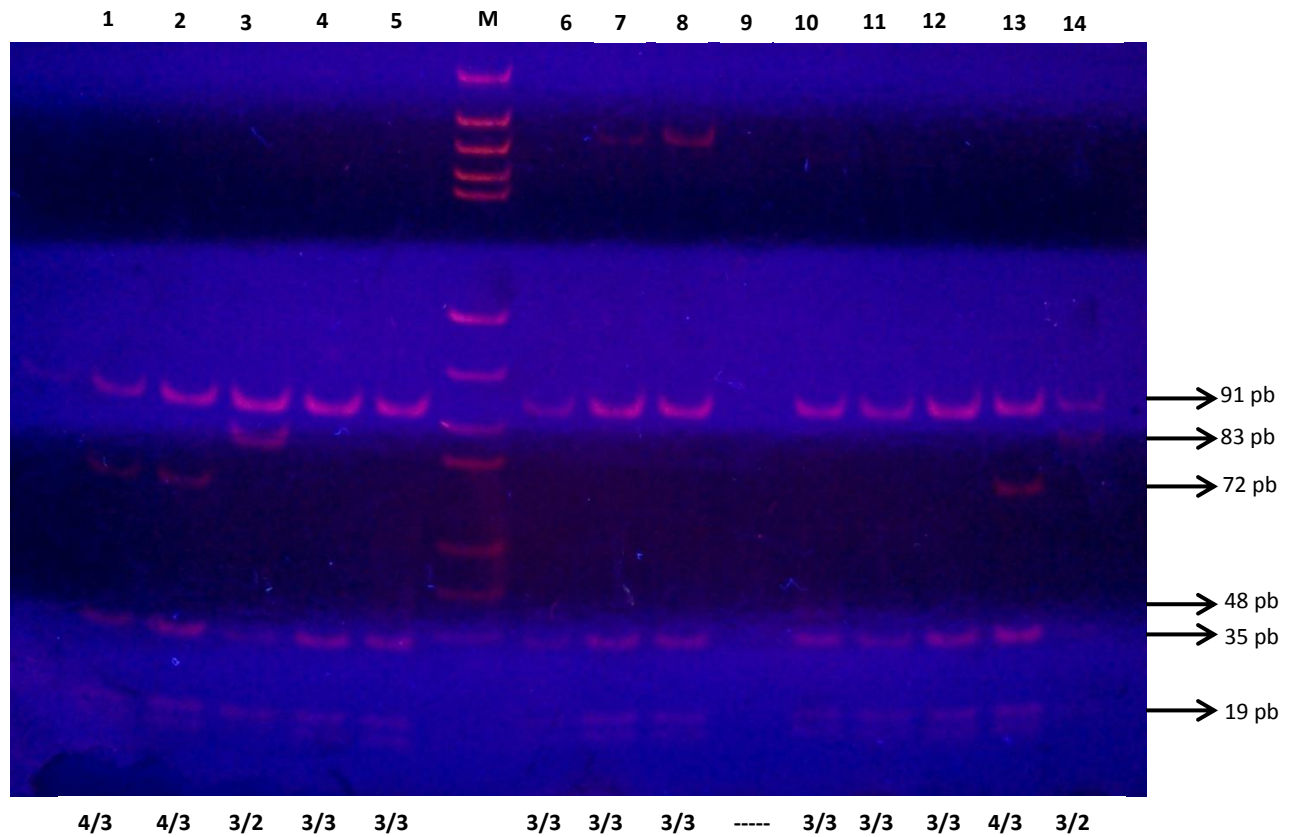
**Figura 20:** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el que se verificaron los productos de PCR. Esta fotografía es representativa para cada gen.

## 6.2 Metilentetrahidrofolato reductasa *MTHFR*



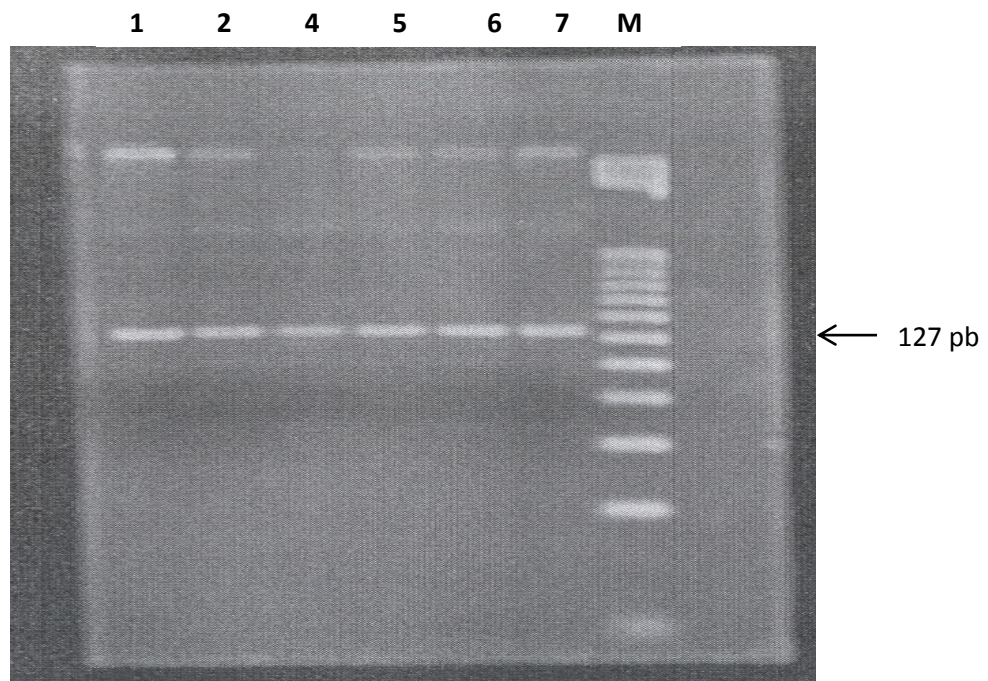
**Figura 21:** Gel de poliacrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los tres posibles genotipos del polimorfismo C677T del gen de la *MTHFR*. El producto de PCR genera una banda de tamaño de 198 pb. El cambio de una citosina por una timina en la posición 677 genera un sitio de restricción Hinf I, generando una banda de 173 pb y una de 25 pb que no se alcanza a visualizar en el gel. Para el genotipo C/C se distingue una banda de 173 pb (Homocigoto normal), para el genotipo C/T se observa una banda de 173 pb y otra banda de 198 pb (Heterocigoto) y para el genotipo T/T se observa una banda de 198 pb (Homocigoto anormal)

### 6.3 Apolipoproteína E (ApoE)



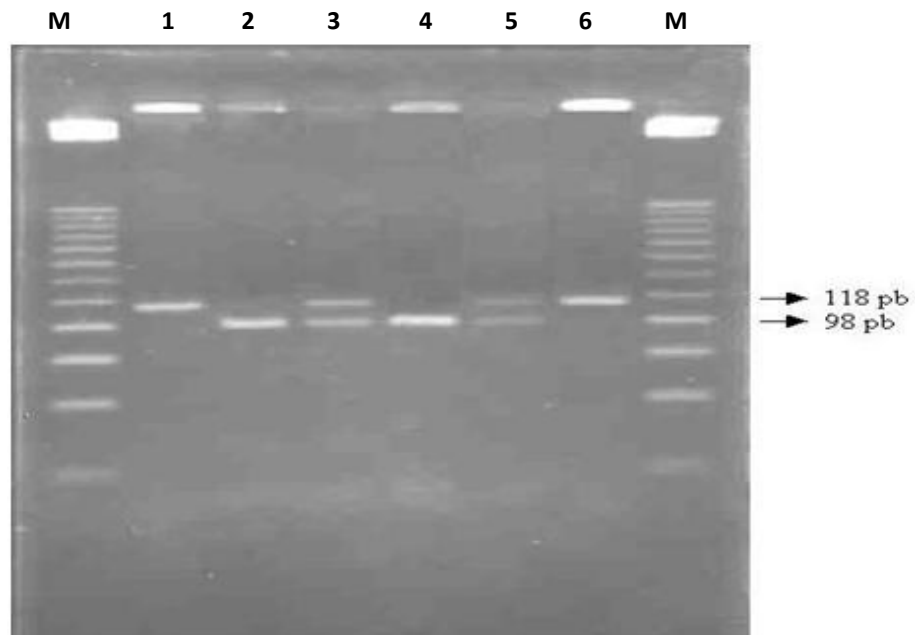
**Figura 22:** Gel de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los genotipos de ApoE. Los productos de PCR obtenidos se digieren por 3.5 horas con la enzima de restricción Hha I que reconoce la secuencia GCGC como sitio de corte. Los cortes de la enzima difieren de acuerdo al alelo expresado; para el genotipo 4/3 se presentan bandas de 91, 72, 48, 35 y 19 pb, para el genotipo 3/3 las bandas que se obtienen son de 91, 48 y 35 pb, para el genotipo 3/2 las bandas resultantes son 91, 83, 48 y 35 pb, para el genotipo 2/2 las bandas obtenidas son de 91 y 83 pb, para el genotipo 4/4 (Homocigoto de riesgo) se obtienen bandas de 72, 48, 35 y 19 pb y para el genotipo 4/2 las bandas obtenidas son de 91, 83, 72, 45, 35 y 19 pb.

#### 6.4 Factor V de Leiden



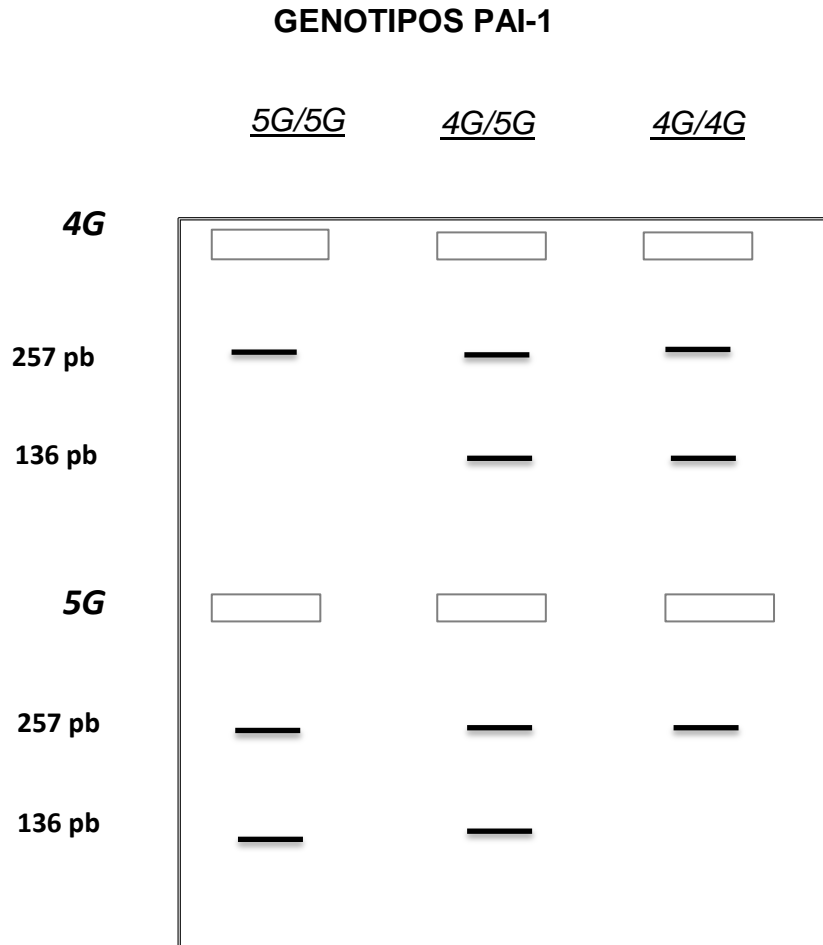
**Figura 23:** Gel de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran los genotipos del gen FVL, en esta fotografía se observa el genotipo G/G (homocigoto normal) que está dado por una banda de 127 pb y una banda de 20 pb que no se alcanza a visualizar.

## 6.5 Protrombina



**Figura 24** gel de acrilamida al 8% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los genotipos del gen de Protrombina. Los productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción Taq 1 a 37°C por 4 horas. Los cortes de la enzima generan una banda de 98 pb para el genotipo G/G (Homocigoto normal), una banda de 118 pb para el genotipo A/A (Homocigoto anormal), para el genotipo heterocigoto se generan 2 bandas una de 118 y una de 98 pb.

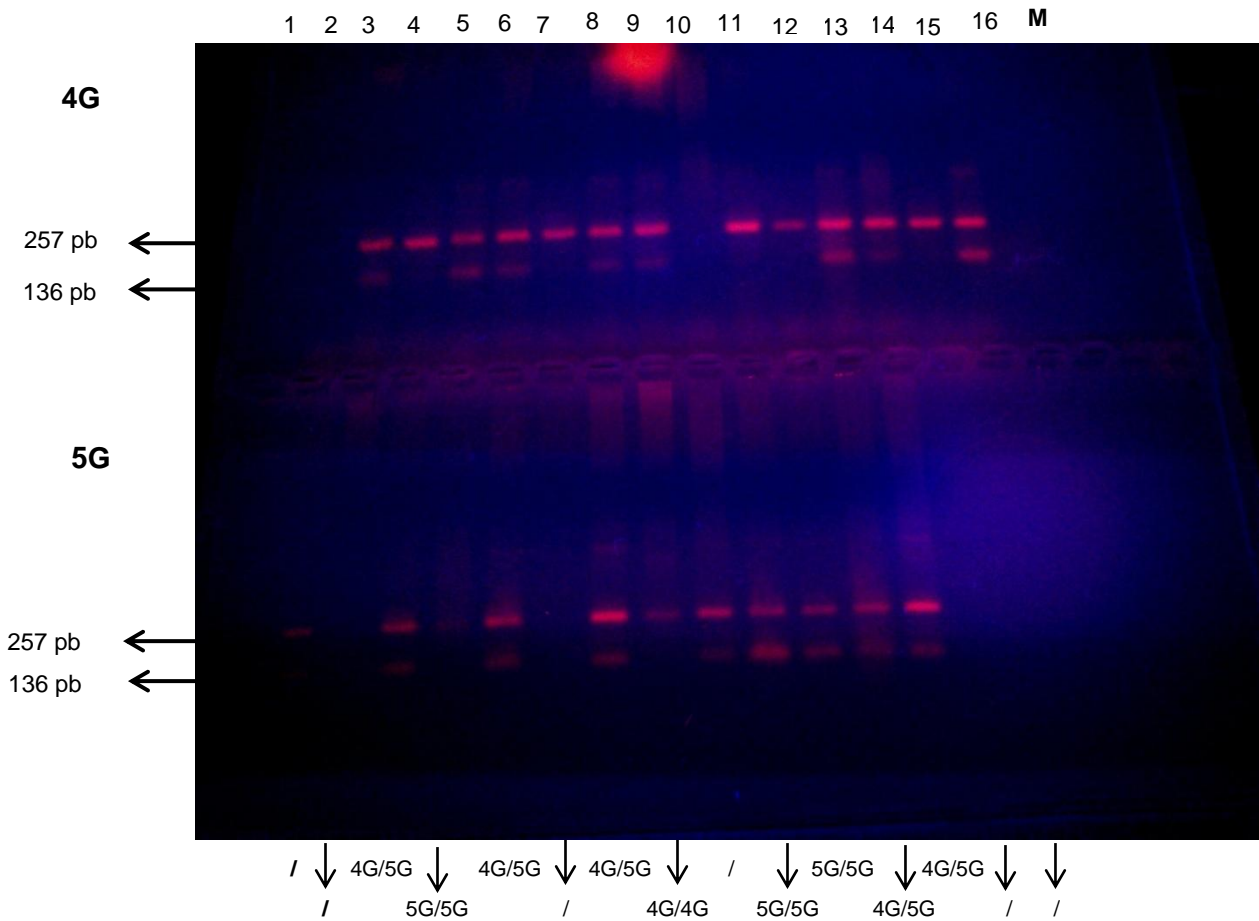
## 6.6 Activador del inhibidor del plasminógeno 1 (PAI-1)



**Figura 24** Interpretación de resultados del gen PAI-1

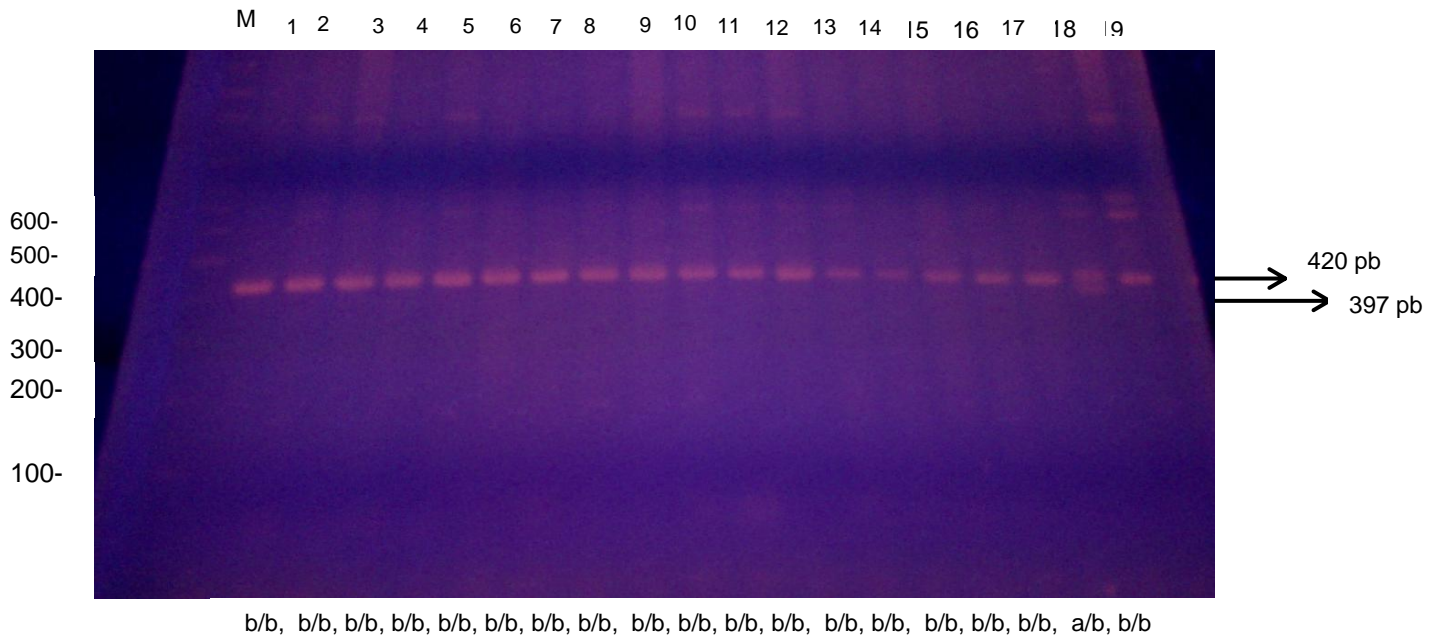
Para determinar los 3 posibles genotipos de PAI-1 (5G/5G, 4G/5G y 4G/4G) se realizan 2 reacciones por separado, una reacción para el alelo 4G en la cual se utilizan 3 primers uno control (upstream), un común (downstream) y el específico para el alelo 4G (delección), y otra reacción para el alelo 5G donde se utilizan los dos primeros primers (upstream y downstream) y un primer específico para el alelo 5G (inserción). Los primers upstream y downstream generan un producto de PCR de 257 pb y los primers downstream y el primer específico (4G o 5G) generan un producto de PCR de 136 pb. Los resultados se interpretan como se muestra en la imagen 24.





**Figura 24:** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se muestran los tres posibles genotipos del polimorfismo 4G/5G (inserción/delección) del gen de PAI-1. El producto de PCR genera dos bandas una de 297 pb determinada por los primers ups y down y una de 136 pb que se determina por el primer down y el primer específico para el alelo 4G o 5G, los productos de PCR para el alelo 4G se muestran en la parte superior y en la parte inferior se muestran los productos de PCR para el alelo 5G. Para el genotipo 5G/5G se distinguen 3 bandas dos de 257pb y una de 136 pb (Homocigoto normal), para el genotipo 4G/5G se distinguen cuatro bandas 2 de 257 pb y 2 de 136 pb (Heterocigoto, factor de riesgo) y para el genotipo 4G/4G se distinguen 3 bandas dos de 257 pb y una de 136 pb (Homocigoto).

## 6.7 Óxido Nítrico Sintasa (eNOS)



**Imagen 25:** Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se muestran dos de los genotipos para el polimorfismo 4ab del gen de la NOS III. El producto de PCR genera 2 bandas de acuerdo al genotipo una banda de 420 pb y una banda de 397 pb. Para el genotipo b/b se distingue una banda de 420 pb (Homocigoto normal), para el genotipo a/b se distinguen dos bandas una de 420 pb y otra de 397 pb (Heterocigoto) y para el genotipo a/a se distingue una banda de 397 pb (Homocigoto anormal).



## 6.7 Frecuencias Genotípicas y alélicas

Los resultados obtenidos se encuentran en las siguientes tablas en forma de frecuencias genotípicas y alélicas para los 6 genes a los cuales se les realizó el análisis molecular.

**Tabla 5 Frecuencias genotípicas y alélicas de *MTHFR* de pacientes y controles**

<b>MTHFR</b>	<b>PACIENTES</b>	<b>CONTROLES</b>
Genotipo	N (%)	N (%)
<b>C/C</b>	9 (25)	35 (24.31)
<b>C/T</b>	18 (50)	87 (60.41)
<b>T/T</b>	9 (25)	22 (15.28)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>C</b>	36 (50)	157 (54.51)
<b>T</b>	36 (50)	131 (45.49)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 6 Frecuencias genotípicas y alélicas de *MTHFR* de pacientes y controles por género**

<b>MTHFR</b>	<b>PACIENTES</b>		<b>CONTROLES</b>	
	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>
Genotipo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>C/C</b>	5 (33.33)	4 (19.05)	14 (23.33)	21 (25)
<b>C/T</b>	8 (53.33)	10 (47.62)	38 (63.34)	49 (58.33)
<b>T/T</b>	2 (13.34)	7 (33.33)	8 (13.33)	14 (16.67)
<b>Total</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>C</b>	18 (60)	18 (42.86)	66 (55)	91 (54.17)
<b>T</b>	12 (40)	24(57.14)	54 (45)	77 (45.83)
<b>Total</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

El genotipo que obtuvo la mayor frecuencia fue el C/T (heterocigoto), la menor frecuencia la obtuvo el genotipo T/T (Homocigoto anormal).

**Tabla 7 Frecuencias genotípicas y alélicas de PAI-1 de pacientes y controles**

<b>PAI-1</b>	<b>PACIENTES</b>	<b>CONTROLES</b>
Genotipo	N (%)	N (%)
<b>5G/5G</b>	23(63.89)	87 (60.42)
<b>4G/5G</b>	10 (27.78)	44 (30.55)
<b>4G/4G</b>	3 (8.33)	13 (9.03)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>5G</b>	56 (77.78)	218 (75.69)
<b>4G</b>	16 (22.22)	70 (24.31)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 8 Frecuencias genotípicas y alélicas de PAI-1 de pacientes y controles por género**

<b>PAI-1</b>	<b>PACIENTES</b>		<b>CONTROLES</b>	
	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>
Genotipos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>5G/5G</b>	8 (53.33)	15 (71.43)	38 (63.33)	49 (58.34)
<b>5G/4G</b>	5 (33.33)	5 (23.81)	17 (28.33)	27 (32.14)
<b>4G/4G</b>	2 (13.34)	1 (4.76)	5 (8.34)	8 (9.52)
<b>Total</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>5G</b>	21 (70)	35 (83.33)	93 (77.5)	125 (74.40)
<b>4G</b>	9 (30)	7 (16.67)	27 (22.5)	43 (25.60)
<b>Total</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

Frecuencias para el gen PAI-1, el genotipo 5G/5G (Homocigoto normal) obtuvo la frecuencia más alta seguida del genotipo 4G/5G (Heterocigoto anormal).

**Tabla 9 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen FVL de pacientes y controles**

<b>FVL</b>	<b>PACIENTES</b>	<b>CONTROLES</b>
Genotipo	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>G/G</b>	36 (100)	143 (99.31)
<b>G/A</b>	0 (0)	1 (0.69)
<b>A/A</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>G</b>	72 (100)	287 (99.65)
<b>A</b>	0 (0)	1 (0.35)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 10 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen FVL de paciente y controles por género**

<b>FVL</b> Genotipos	<b>PACIENTES</b>		<b>CONTROLES</b>	
	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>G/G</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	83 (98.81)
<b>G/A</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.20)
<b>A/A</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>5G</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	167 (99.40)
<b>4G</b>	0 (0)	0 (0)	0(0)	1 (0.60)
<b>Total</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

En el caso del gen del FVL se obtuvieron dos genotipos (G/G y G/A), el genotipo A/A no se obtuvo en ninguno de ambos grupos, siendo G/G el de mayor frecuencia y el genotipo G/A solo se obtuvo en controles femeninos.

**TABLA 11 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la Protrombina de pacientes y controles**

Protrombina Genotipo	PACIENTES	CONTROLES
	N (%)	N (%)
<b>G/G</b>	36 (100)	141 (97.92)
<b>G/A</b>	0 (0)	3 (2.08)
<b>A/A</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>G</b>	72 (100)	285 (98.96)
<b>A</b>	0 (0)	3 (1.04)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 12 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de la Protrombina de pacientes y controles por género**

Protrombina Genotipos	PACIENTES		CONTROLES	
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>G/G</b>	15 (100)	21 (100)	59 (98.33)	82 (97.62)
<b>G/A</b>	0 (0)	0 (0)	1 (1.67)	2 (2.38)
<b>A/A</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>G</b>	30 (100)	42 (100)	119 (99.17)	166 (98.81)
<b>A</b>	0 (0)	0 (0)	1 (0.83)	2 (1.19)
<b>TOTAL</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

En este gen solo se obtuvo el genotipo G/G en pacientes, mientras que en el grupo de controles se obtuvieron los genotipos G/G y A/G tanto en hombres como en mujeres.

**Tabla 13 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen eNOS de pacientes y controles**

<b>Protrombina</b>	<b>PACIENTES</b>	<b>CONTROLES</b>
Genotipo	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>b/b</b>	36 (100)	138 (95.83)
<b>a/b</b>	0 (0)	6 (4.17)
<b>a/a</b>	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>b</b>	72 (100)	282 (97.92)
<b>a</b>	0 (0)	6 (2.08)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 14 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen eNOS de pacientes y controles por género**

<b>NOS III</b> <i>Genotipos</i>	<b>PACIENTES</b>		<b>CONTROLES</b>	
	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>	<b>HOMBRES</b>	<b>MUJERES</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>b/b</b>	15 (100)	21 (100)	57 (95)	81 (96.43)
<b>a/b</b>	0 (0)	0 (0)	3 (5)	3 (3.57)
<b>a/a</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>TOTAL</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>b</b>	30 (100)	42 (100)	117 (97.5)	165 (98.21)
<b>a</b>	0 (0)	0 (0)	3 (2.5)	3 (1.79)
<b>TOTAL</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

En este gen se obtuvo en el grupo de pacientes el genotipo b/b de los tres probables, mientras que en el grupo control se obtuvieron los genotipos b/b y a/b.

**Tabla 15 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen de ApoE de pacientes y controles**

ApoE Genotipo	PACIENTES	CONTROLES
	N (%)	N (%)
<b>3/2</b>	3 (8.33)	7 (4.86)
<b>3/3</b>	27 (75)	116 (80.56)
<b>3/4</b>	6 (16.67)	21 (14.58)
<b>Total</b>	36 (100)	144 (100)
<i>Alelos</i>		
<b>2</b>	3 (4.17)	7 (2.43)
<b>3</b>	63 (87.5)	260 (90.28)
<b>4</b>	6 (8.33)	21 (7.29)
<b>Total</b>	72 (100)	288 (100)

**Tabla 16 Frecuencias genotípicas y alélicas del gen ApoE de pacientes y controles por género**

ApoE Genotipos	PACIENTES		CONTROLES	
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>3/2</b>	2 (13.33)	1 (4.76)	3 (5)	4 (4.76)
<b>3/3</b>	11 (73.34)	16 (76.19)	49 (81.67)	67 (79.76)
<b>3/4</b>	2 (13.33)	4 (19.05)	8 (13.33)	13 (15.48)
<b>TOTAL</b>	15 (100)	21 (100)	60 (100)	84 (100)
<i>Alelos</i>				
<b>2</b>	2 (6.67)	1 (2.38)	3 (2.5)	4 (2.38)
<b>3</b>	26 (86.66)	37 (88.10)	109 (90.83)	151 (89.88)
<b>4</b>	2 (6.67)	4 (9.52)	8 (6.67)	13 (7.74)
<b>TOTAL</b>	30 (100)	42 (100)	120 (100)	168 (100)

Para el gen de ApoE solo se presentaron 3 de los 6 genotipos posibles, el genotipo con mayor frecuencia fue el 3/3, seguido del 3/4 y el de menos frecuencia fue el 3/2.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para determinar el riesgo relativo se compararon frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles calculando el Odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% para todos los polimorfismos. También se llevó a cabo el análisis entre ambos grupos por género (tabla 18) y se realizó un análisis de asociación mediante combinaciones con los diferentes genotipos obtenidos (Tabla 19).

**Tabla 17 valores de OR** **Tabla 17** Resultados del análisis estadístico, en la tabla se muestra que no se encontraron resultados significativos, todos los valores de p obtenidos fueron por arriba de 0.05

Gen/Polimorfismo	Pacientes EVC N=36 (%)	Controles N=144 (%)	Valor p	OR	IC 95%
<b>MTHFR C677T</b>					
Genotipos					
CC	9 (25)	35 (24.31)	0.4055	1.038	0.4259-2.386
CT	18 (50)	87 (60.42)	0.1295	0.6567	0.4004-3.081
TT	9 (25)	22 (15.28)	0.0841	1.841	0.0732-4.415
Alelos					
C	36 (50)	157 (54.51)	0.2464	0.8344	0.4976-1.399
T	36 (50)	131 (45.49)	0.2464	1.198	0.7144-2.01
<b>PAI-1 4G/5G</b>					
Genotipos					
5G/5G	23 (63.89)	87 (60.42)	0.3515	1.158	0.5441-2.084
4G/5G	10 (27.78)	44 (30.56)	0.3728	0.8748	0.3738-1.948
4G/4G	3 (8.33)	13 (9.03)	0.5982	0.9165	0.199-3.207
Alelos					
5G	56 (77.78)	218 (75.69)	0.3556	1.124	0.6062-2.084
4G	16 (22.22)	70 (24.31)	0.3554	0.8898	0.4799-1.65
<b>FVL A/A</b>					
Genotipos					
G/G	36 (100)	143 (99.31)	—	—	—
G/A	0 (0)	1 (0.69)	—	—	—
A/A	0 (0)	0 (0)	—	—	—
Alelos					
G	72 (100)	287 (99.65)	—	—	—
A	0 (0)	1 (0.35)	—	—	—
<b>Protrombina A/A</b>					
Genotipos					
G/G	36 (100)	141 (98.33)	—	—	—
A/G	0 (0)	3 (2.08)	—	—	—
A/A	0 (0)	0 (0)	—	—	—
Alelos					
G	72 (100)	285 (98.96)	—	—	—
A	0 (0)	3 (1.04)	—	—	—
<b>eNOS a/a</b>					
Genotipos					
b/b	36 (100)	138 (95.83)	—	—	—
a/b	0 (0)	6 (4.17)	—	—	—
a/a	0 (0)	0 (0)	—	—	—
Alelos					
b	72 (100)	282 (97.92)	—	—	—
a	0 (0)	6 (2.08)	—	—	—
<b>ApoE 4</b>					
Genotipos					
2/3	3 (8.33)	7 (4.86)	0.3204	1.773	0.3558-7.135
3/3	27 (75)	116 (80.56)	0.2309	0.7241	0.3665-1.171
3/4	6 (16.67)	21 (14.58)	0.3774	1.17	0.4004-3.081
Alelos					
2	3 (4.17)	7 (2.43)	0.5562	1.124	0.2827-4.471
3	63 (87.5)	260 (90.28)	0.2441	0.7538	0.3388-1.677
4	6 (8.33)	21 (7.29)	0.3822	1.56	0.4486-3.114



Por otra parte, se calculó el riesgo relativo por género, en la tabla 18 se muestran los resultados de los genotipos TT de la MTHFR y el genotipo 5G/5G del gen PAI-1 en donde el valor de  $p < 0.05$ .

**Tabla 18 Valores de OR por género**

<b>Gen Polimorfismo</b>	<b>Pacientes EVC Mujeres n= 21</b>	<b>Controles Mujeres n= 84</b>	<b>Valor de p</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b><i>MTHFR C677T</i></b>					
Genotipos					
<b>TT</b>	7 (33.33)	14 (16.67)	0.0446	2.475	<b>0.8046-7.304</b>
<b><i>PAI-14G/5G</i></b>					
Genotipos					
<b>5G/5G</b>	<b>5 (23.81)</b>	49 (58.33)	0.00241	0.2264	0.0684-0.6573
<b>Gen/Polimorfismo</b>	<b>Pacientes EVC Hombres n=15</b>	<b>Controles Mujeres n= 60</b>	<b>Valor de p</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b><i>PAI-1 4G/5G</i></b>					
Genotipos					
<b>5G/5G</b>	<b>5 (33.33)</b>	38 (63.33)	0.0184	0.2945	0.0813-0.9683

**Tabla 19 Combinaciones de genotipos**

<b>Combinaciones</b>	<b>OR</b>	<b>IC al 95%</b>	<b>Valor de p</b>
<b>5G5G,TT,GG,GG,33,bb</b>	2.543	0.7125-8.427	0.05515
<b>4G5G,CT,GG,GG,4/3,bb</b>	1.19	0.3448-3.181	0.4185
<b>5G5G,CT,GG,GG,3/4,bb</b>	0.7365	0.1054-3.2	0.0350
<b>5G5G,TT,GG,GG,3/4,bb</b>	7.752	0.572-2.34	0.1126
<b>4G4G,TT,GG,GG,3/3,bb</b>	0.9848	0.3064-2.76	0.4887
<b>5G5G,CT,GG,GG,3/3,bb</b>	0.8837	0.3476-2.092	0.3910
<b>5G5G,CT,GG,GG,3/2,bb</b>	1.255	0.0464-1.623	0.6152
<b>4G5G,CC,GG,GG,3/3,bb</b>	0.2696	0.0121-1.62	0.1612
<b>4G5G,CC,GG,GG,3/4,bb</b>	3.789	0.095-1.503	0.377

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La enfermedad vascular cerebral (EVC) en México se encuentra dentro de las primeras cinco causas de muerte (Fortuna A & et.al., 2008) . Aproximadamente entre 3-5% de todos los eventos isquémicos se presentan en sujetos menores de 45 años. (Hernández, 2011)

La EVC se considera una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción de diferentes factores. Se ha propuesto que los factores asociados a EVC isquémico son diferentes entre los sujetos jóvenes y los adultos mayores. (Hoekstrs T., 2003), (Madonna P, 2002), sugiriendo que los factores genéticos son más frecuentes en los pacientes jóvenes (Flossman E., 2004), y los factores ambientales influyen más en los pacientes de edad mayor (Hassam A., 2000).

Entre los polimorfismos que se han propuesto como posibles factores de riesgo para el desarrollo de EVC están los polimorfismos C677T del gen de la MTHFR, 4G/5G del gen de PAI-1, G20210A del gen de la protrombina, Arg506Gln en el gen del factor V, la presencia del alelo 4 en el gen de la ApoE y la inserción deleción en el exón 4 del gen de la óxido nítrico sintasa (4ab) (Szolnoki Z, 2003).

Se realizó el análisis molecular de los genes MTHFR, PAI-1, FVL Protrombina, eNOS y ApoE para 36 pacientes con EVC isquémico idiopático, 15 hombres y 21 mujeres, los cuales se aparearon 4 a 1 con 144 controles aparentemente sanos de los cuales 60 son de sexo masculino y 84 de sexo femenino. Se determinaron frecuencias genotípicas y alélicas para cada gen.

Para el gen de la MTHFR el genotipo T/T (Heterocigoto anormal) tuvo una frecuencia del 25%, en el caso de los controles la frecuencia fue de 15.28% estos resultados muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa, estos resultados son similares a los publicados en 2001 por Ruiz Arguelles y col. donde la frecuencia del genotipo T/T es de 24% en población mestiza mexicana, otro realizado en el 2000 publicó frecuencias de 19% para el genotipo T/T en población mexicana. (Dávalos Rodríguez IP, 2000). Al comparar las frecuencias de este

genotipo entre pacientes femeninos y controles femeninos se observa que la frecuencia de este polimorfismo es casi el doble en pacientes que en controles (pacientes mujeres 33.33%, controles mujeres 16.67%), sin embargo no existe diferencia estadísticamente significativa.

La inserción/delección 4G/5G del gen PAI-1 se presentó en 10 pacientes (5 hombres y 5 mujeres), con una frecuencia de 27.78% y en 87 controles con una frecuencia de 60.42%, se observa que las frecuencias para este polimorfismo son muy similares en pacientes y en controles lo que indica que no exista asociación entre este polimorfismo y la enfermedad en estudio.

Para el caso del FVL no se obtuvieron los genotipos G/A (heterocigoto) y A/A (homocigoto anormal) en pacientes, por lo que no se pudo realizar el análisis estadístico, y por lo tanto no se puede decir si existe o no asociación entre este polimorfismo y la enfermedad en estudio. En controles sólo se obtuvo el genotipo G/A con una frecuencia de 0.69%. Lo mismo ocurrió en la variante G20210A del gen de la protrombina, no se encontró el alelo A en pacientes y en controles el genotipo heterocigoto (A/G) tuvo una frecuencia de 2.08%, de la misma manera no se pudo realizar el análisis estadístico, por lo que no podemos decir si existe asociación entre el polimorfismo G20210A y la EVC isquémica. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente Ruiz en 2001 realizó un estudio con 50 pacientes en el que la frecuencia para el polimorfismo G20210A de la protrombina fue 0 para el genotipo A/A, en el mismo estudio hace referencia al factor V de Leiden en donde no encontraron el genotipo A/A en la población estudiada. (Ruiz-Arguelles GJ, 2001)

Para el gen de la óxido nítrico sintasa (eNOS) el genotipo a/b el cual se asocia al desarrollo de la enfermedad, se presentó con una frecuencia del 0%, por lo que no se pudo llevar a cabo el análisis estadístico por esta razón no se puede determinar si existe o no asociación, no se encontraron frecuencias reportadas para este polimorfismo, por lo cual no se puede realizar una comparación.

También se determinó la presencia del alelo 4 en el gen que codifica para ApoE el genotipo 3/4 se presentó con una frecuencia de 16.67% en pacientes y 14.58% en controles, estos resultados no muestran diferencia estadísticamente significativa, sin embargo cabe señalar que no se obtuvo el genotipo 4/4 por lo que no podemos asegurar que la presencia del alelo 4 no tenga asociación con el desarrollo de esta enfermedad, pero podemos decir que el genotipo 4/3 no presenta asociación con la Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica. Nuestros resultados son muy similares a los publicados por Celaya J. y su grupo de estudio en 2007 donde estudiaron a 215 individuos y obtuvieron una frecuencia de 16.28% para el genotipo 4/3 en población mexicana. (Celaya J, 2007)

En la siguiente tabla (tabla 19) se presenten algunas frecuencias de diferentes poblaciones y las obtenidas en este trabajo.

**Tabla 19 Frecuencias reportadas (%)** (Urike Nowak-Gottl, 2001), (Alexis Elbaz Francois, 2001), (Junghan Song, 2000), (Victoria Marca, 2011), (Merino, 2000) (Xue-Lei Cao, 2010)

Gen Polimorfismo	Estudio población Mexicana (%)	POBLACION EUROPEA (%)		POBLACIÓN ASIÁTICA (%)		POBLACIÓN AMERICANA (%)	
		Alemania	Francia	Japón	China	Brasil	Argentina
<i>MTHFR T/T</i>	<b>15.28</b>	11	14.2	10.5	30	11	15.8
<i>PAI-1 4G/5G</i>	<b>30.55</b>	49.7	53.1	43.2	45	-	-
<i>Protrombina A/A</i>	<b>2.08</b>	2.3	2.2	0	0	0.9	2.6
<i>FVL A/A</i>	<b>0.69</b>	6.25	2.59	0	0	0.4	0
<i>Apo E alelo 4</i>	<b>14.58</b>	9.9	11	10.5	6.9	12	6.8
<i>eNOS a/b</i>	<b>3.57</b>	-	-	-	-	-	-

Además de calcular las frecuencias genotípicas y alélicas se llevó a cabo el análisis entre ambos grupos por género y se realizó un análisis de asociación mediante combinaciones de los genotipos para determinar si la presencia de dos o más genotipos son factores de riesgo para desarrollar la enfermedad.

Se obtuvieron 30 combinaciones, a las cuales se les calculo el Odds ratio con un intervalo de confianza del 95%. Los valores de p obtenidos para todas las combinaciones fueron mayores a 0.05, lo que nos indica que no son significativos.

En la tabla 17 se muestran los valores de p y OR con IC del 95% para cada genotipo y para cada alelo, donde se observa que los valores no son significativos, ( $p > 0.05$ ). Existen estudios anteriores donde se han propuesto los mismos genes como factores de riesgo, sin embargo los resultados reportados son contradictorios, ya que algunos autores reportan que ciertos genes si son factores de riesgo mientras que otros mencionan que no lo son. (Madrigal, 2010)

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios realizados previamente. Catto et al. En 1997 realizó un estudio con 421 casos y 172 controles en el que estudio la asociación entre el polimorfismo 4G/5G del gen de PAI-1 y la Enfermedad Vasculare Cerebral, los resultados que obtuvo no fueron significativos (Catto AJ, 1997). En 1999 Ridker y colaboradores publicaron un artículo en el que asociaban el polimorfismo G20210A de la protrombina con el infarto agudo al miocardio, la Enfermedad Vasculare Cerebral y la trombosis venosa en hombres, ellos determinaron que no existía asociación entre esta variante y la EVC y que este polimorfismo si está asociado a trombosis venosa. (Ridker PM, 1999). En 1998 Longstreth et al. realizaron un estudio con el polimorfismo G20210A del gen de la protrombina en el que estudiaron mujeres jóvenes adultas con edad entre 18 y 44 años con EVC, los resultados fueron negativos, es este mismo estudio se evaluó la variante Arg506Gln del gen del factor V los resultados fueron similares no encontrándose ninguna asociación (Longstreth WT, 1998).

En la tabla 18 se observan los resultados del análisis estadístico por género. Se observa que el genotipo 5G/5G (homocigoto normal) del gen que codifica para PAI-1 tuvo una **p de 0.0024** un **OR de 0.2264** con un **IC de 0.0684-0.657**, estos resultados corresponden a la comparación de pacientes mujeres contra controles mujeres, al realizar el análisis entre pacientes y controles de sexo masculino se obtuvo un valor de **p= 0.0184**, **OR= 0.2945** e **IC= 0.08135-0.9683**. El genotipo homocigoto 5G/5G del gen de PAI-1 se ha llegado a considerar como una factor de protección (Madrigal, 2010), en nuestro caso se afirman estas consideraciones ya que el valor de OR obtenido es menor a 2. Una posible explicación a esto es que los individuos portadores del genotipo 5G/5G presentan niveles menores de

PAI-1, lo que provoca una lisis más acelerada del coagulo de fibrina, evitando la formación de trombos que pueden ser los causantes de sufrir una EVC isquémica, sin embargo esto no es el objetivo de nuestro estudio.

En esta misma tabla (tabla 18) se observan los valores de p y OR con IC 95% para el polimorfismo T/T (homocigoto anormal) del gen de la MTHFR de pacientes mujeres contra controles mujeres, el valor de p es significativo (**p=0.0446**) con un valor de **OR=2.475** y un **IC= 0.8046-7.304**, aunque el valor de p es menor de 0.05 y el OR está por arriba de 2, el IC es muy amplio por lo que los resultados obtenidos no son significativos, sin embargo estos tienden a la significancia, lo que nos dice que el polimorfismo T/T del gen de la MTHFR probablemente es un factor de riesgo o se relaciona con el desarrollo de la Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica en mujeres jóvenes adultas. En 1990 Harmon y colaboradores realizaron un estudio con resultados muy similares a lo nuestros en donde obtuvieron un valor de p=0.01, OR= 1.59 y un IC al 95%= 0.85-2.97, ellos mencionan que la variante C677T del gen de la MTHFR es posiblemente un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. (Harmon DL, 1990)

Se han realizado diferentes estudios en los que se plantea que la variante C677T de la MTHFR puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, pero los resultados varían, Nakata y col. publicaron en 1998 un artículo en el que incluyeron 48 pacientes con EVC y 105 controles, sus resultados fueron negativos, no encontraron asociación entre el polimorfismo C677T y esta enfermedad. (Nakata Y, 1998). En el 2010 Jara y colaboradores publicaron un artículo en el que estudiaron la Disección Cervico arterial (DCA) que es la principal causa de infarto cerebral en pacientes jóvenes adultos, en el que sus resultados son similares a los nuestros, para el polimorfismo C677T de la MTHFR obtuvieron un valor de OR de 1.56, un valor de p de 0.0999 y un Intervalo de Confianza de 0.81-1.56, sus resultados al igual que los nuestros tienden a ser significativos. (Jara Prado Aurelio, 2010)

La EVC en general es una enfermedad multifactorial, la cual está influenciada por diversos factores, a pesar de que los resultados obtenidos no presenten una

asociación estadísticamente significativa, se observa que el genotipo C677T de la MTHFR en mujeres tiene una posible asociación en el desarrollo esta enfermedad.

## **9-. CONCLUSIONES**

- En este grupo de pacientes mestizo mexicanos con Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica de tipo idiopático no se encontró ninguna asociación con 5 de los polimorfismos más estudiados en otras poblaciones.
- La determinación de los polimorfismos asociados con esta enfermedad ha sido controversial y parece estar determinado por la diferencia étnica. Es importante recalcar este punto ya que los polimorfismos estudiados son considerados factores de riesgo en otras poblaciones previamente estudiadas, mientras que en esta muestra de la población mexicana los resultados obtenidos muestran que no lo son.
- Se determinó que el genotipo TT (homocigoto anormal) del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (polimorfismo C677T) en mujeres tiende a ser significativo, lo que indica que probablemente es factor de riesgo para desarrollar Enfermedad Vascul ar Cerebral isquémica en mujeres jóvenes adultas, para corroborar esto es necesario ampliar el número de muestra.

## 10.- REFERENCIAS

- Alexis Elbaz Francois, C. a. (2001). Plasminogen Activator inhibitors Genotype and Brain Infartion. *Circulation*, 103, 13-14.
- Andreas Festa, M. R. (2003). Promoter (4G/5G) Plasminogen Activator Inhibitor-1 Genotype and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Levels in Blacks, Hispanics, and Non-Hispanic Whites. *American Heart Association* .
- Arrigo M, S. L. (Junio de 2006). Frecuencia alélica de Apolipoproteína E en una población aborigen. *Mem. Inst. Investig. Cienc Salud*, 2, 25-27.
- Arruda V, A. B. (1995). Factor V Leiden (FVQ506) is common in a brazilian population. *Am J Hematol*, 49, 442-3.
- Arruda, V. (1997). Prevalence of the prothrimbin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease. *Thromb Haemost*(78), 1430-1433.
- Aslanidis C, G. S. (1999). Hig-Speed Apolipoprotein E genotyping and Apolipoprotein B3500 Mutation Detection using Real-Time Fluorescence PCR and Melting Curves. *Chem*, 45(7), 1094-1095.
- Asuar, L. E. (s.f.). *Guía practica sobre la técnica de PCR*. Recuperado el 10 de Julio de 2013
- Ayala C., G. R. (2010). Niveles de homocisteína y polimorfismos de los genes MTHFR y la CBS en pacientes colombianos con trombosis venosa superficial y profunda. *Biomédicas*, 259-267.
- Berg Jeremy, S. L. (2007). *Bioquímica*. España: Reverté.
- Bersano A, B. E. (2008). Genetic polymorphism for study of multifactorial stroke. *Hum Mutat*, 29, 776-795.
- Bertina RM, K. B. (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*, 369, 64-7.
- Carlos Santiago Uribe, A. A. (2002). *Fundamento de Medicina, Neurología*. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Casas JP, H. D. (2004). Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke. *Arch Neurol*, 1652-1662.
- Catto A., C. A. (1995). Factor V Leiden gene mutation and thrombin generation in relation to the development of acute stroke. *Vasc Biol*, 15, 783-5.
- Catto AJ, C. A. (1997). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G promoter polymorphism and levels in subjects whit cerebrovascular disease. *Thromb Haemost*, 77, 730-734.
- Celaya J, R. A. (2007). Estudio de polimorfismo del gen ApoE de la apolipoproteína E y su relacion con niveles elevados de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos séricos en niños con edad escolar. *Soc Med Quir Hosp Emerg* , 19-26.



- Chavarria, M. E. (2006). *Estudio de la frecuencia de polimorfismos asociados con el estrés oxidativo en la preeclampsia*. México: IPN.
- Chen CH, E. H. (2003). 4G/5G promoter polymorphism of plasminogen activator-1, lipid profiles, and ischemic stroke. *Lab Clin Med*, 142, 100-105.
- Ciszek Ana, B. V. (2007). Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y su relación con la aterosclerosis coronaria. *Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas*, 151-155.
- Colombo MG, A. M. (2002). Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp polymorphism) to the presence, extent and severity of artery disease). *Hearth*, 87, 525-528.
- Concalves Díaz Rodrigo, C. E. (2011). Óxido Nítrico y Sistema cardiovascular: activación celular, reactividad vascular y variante genética. *Arq Bras Cardiol*, 96(1), 68-75.
- Cordona H, C. W. (2008). Relación entre los polimorfismos de la metileno-tetrahidrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente. 277-282.
- Cumming AM, K. S. (1997). The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in U.K. anticoagulant clinic population. *Br Haematol*, 98, 353-5.
- Dahlback. (1994). Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J. Clin. Invest*, 923-927.
- Dahlback B., C. M. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 1004-8.
- Dahlback, B. (1995). Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood*(85), 607-14.
- Dávalos Rodríguez IP, R. L. (2000). Variante C677T del gen metileno-tetrahidrofolato reductasa en niños mexicanos con labio/paladar hendido no sindrómico. *Genet*.
- Davignon C, J. G. (1988). Apolipoprotein E Polymorphism and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 8, 1-21.
- Degen SJ, D. E. (1987). Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry*(26), 6165-77.
- Duarte Mote Jesus, R. F. (2008). Oxido Nitrico, metabolismo e implicaciones medicas. *Med Int Mex*, 24(6), 397-40.
- Escrig, J. (2003). *Manual de Neurogenética*. Madrid España: Diaz de Santos.
- Fernando Barinagarrementeria., T. F. (1996). Cerebral Infarction in People under 40 Years. *Cerebrovasc Dis*, 6, 75-79.
- Ferrau Valeria, F. E. (Enero de 2011). *RIGIP*. Recuperado el 10 Junio de Junio de 2013, de RIGIP: <http://www.geneticapediatrica.it/archivi/2011/archivio1/print.php?id=3>

- Ferrer Viant Dora, J. F. (1998). Óxido Nítrico, importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN*, 2(3), 45-53.
- Ferrer, A. P. (2010). *Medicina Transfusional*. México: Panamericana.
- Fisher M., F. J. (1996). Activated protein C resistance in ischemic stroke not due to factor V Arginine506 Glutamine. *Stroke*(27), 1163-6.
- Flossman E., S. U. (2004). Sistemic review of methods and results of studies of the genetic eoidemiology of ischemic stroke. *Stroke*, 35, 212-227.
- Forsyth PD., D. G. (1995). Activated protein C resistance in cases of cerebral infarction. *Lancet*(345), 795.
- Fortuna A, R. J., & et.al. (2008). *PROTOCOLO DE ATENCIÓN DEL PACIENTE GRAVE*. México: Medica Panamericana, Mexico, pp 228.
- Franco RF, S. S. (1998). Prevalence of G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human population. *Acta Haematol*(100), 9-12.
- Frosst P, B. H. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular diseases: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*(10), 111-113.
- Fuentes Arderiu, L. C. (1998). *Bioquímica y Clínica y Patología molecular* (segunda ed., Vol. II). Barcelona: Reverté.
- Furchgott R, Z. J. (1890). The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 273-376.
- García, M. (2003). La apolipoproteína E: el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos, los hábitos alimenticios y el origen étnico. *Revista Colombiana de Cardiología*, 10(4), 189-193.
- Gil, V. C. (2011). *Fundamentos de Medicina de Rehabilitación*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- González Ordóñez A, M. R. (1999). Mutación 20210A del gen de la protrombina y tromboembolismo venoso. *Sangre*, 44, 13-18.
- Greer P., F. J. (2009). *Wintrobe's Clinical Hematology* (Vol. 1). Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS Y WILKINS .
- Guzmán Neftali, S. L. (2011). Asociación de variantes funcionales en genes del metabolismo de la homocisteína con riesgo de trombosis venosa profunda e hiperhomocisteinemia en individuos del Sur de Chile. *Cardiol*, 28-32.
- Harmon DL, D. R. (1990). Genetic analysis of the thermolabile variant of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for ischemic stroke. *Arterioscler thromb Vasc Biol*, 19, 208-211.
- Hassam A., M. H. (2000). Genetics and ischemic stroke. *Brain*, 123, 1784-1812.
- Hatters M.D., P.-L. C. (2006). Apolipoprotein E : structure:insights into function. 31(8), 445-54.

- Hernández Rodríguez M., S. G. (1999). *Tratado de Nutrición*. Madrid: Díaz de Santos.
- Hernández, F. P. (2011). Evento Vascular isquémico en pacientes jóvenes. *Asociación Mexicana de Medicina de Urgencias*, 3, 68-78.
- Hillarp A, Z. B. (1997). The 20210A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients whit verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost*(78), 990-2.
- Hillier CEM, C. P. (1998). Factores de riesgo hereditarios y trombosis venosa cerebral. *Quartely Journal of Medicine*, 11, 677-680.
- Hixon J.E, V. D. (1990). Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage whit Hha I. *Lipids*, 31, 545-547.
- Hoekstrs T., G. J. (2003). 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated whit reduced risk ok stroke in elderly. *Stroke*, 34, 2833-2828.
- Ivovne, V. (2007). Estudio de trombofilias, Análisis molecular de algunos factores relacionados con la alteración en la hemostasia. *Rev. Med.Clin.CONDES*, 18(4), 394-398.
- Jara Prado Aurelio, A. M. (abril de 2010). MTHFR C677T, FII G20210A, FV Leiden G1691A, NOS3 intron 4 VNTR , and ApoE E4 gene polymorphism are not associated with spontaneous cervical artery dissection. *Stroke*, 5, 80-85.
- Jones, B. (2010). *Los cuidados de urgencias y transporte de los enfermos y heridos* (9 ed.). Canada: Jones and Bartlett Publishers.
- JP Miletich, S. P. (1993). Inherited predisposition to thrombosis. *Cell*(72), 477-80.
- JS Rosenberg, D. B. (1975). Activation of human prothrombin by highly purified human factors V and Xa presence of human antithrombin. *J Biol Chem*(250), 1607-17.
- Junghan Song, Y. M. (2000). Plasminogen Activator Inhibitor-1 4G/5G Promoter Polymorphism and Coagulation Factor VII Arg353Gln Polymorphis in Korean Patients whit Coronary Artery Disease. *Korean Med Sci*, 1011, 146-152.
- Kalafatis M., M. K. (1993). Role of the membrane in the inactivation of factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*(268), 27246-57.
- Kang SS, Z. J. (1988). Intermediate homocystinuria: a thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*(43), 414-421.
- Kevin Sullivan, E. U. (6 de Abril de 2013). *openepi*. Recuperado el 5 de Julio de 2013, de <http://www.openepi.com/v37/TwobyTwo/TwobyTwo.htm>
- Kiekebusch Gustavo, P. E. (2003). Trombofilias Hereditarias. *Chil Obstet Ginecol*, 5(68), 424-429.
- Kisiel, W. (1979). Human plasma proteina C: isolation characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest*(69), 761-9.
- Kohler HP, G. P. (2000). Plasminogen activator inhibitors type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*(342), 1792-801.

- Lens Daniela, O. A. (2000). Diagnóstico molecular de factores protrombóticos: primeros casos de factor V Leiden y Protrombina 20210A en Uruguay. *Revista Médica de Uruguay*, 16, 39-44.
- Longstreth WT, R. F. (1998). Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutation: Factor V Leiden and prothrombin gene variant G20210A. *Stroke*, 67, 577-580.
- Longstreth WT., R. F. (1998). Risk of stroke in young women and two prothrombotic mutations: Factor V Leiden and prothrombin gene variant G20210A. *Stroke*, 29, 570-580.
- M. Kalafatis, B. R. (1995). Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem*(270), 4053-7.
- Macleod MJ., D. M. (1999). No association between the Glu/Asp polymorphism of NOS3 gene and ischemic stroke. *Neurology*, 53, 418-20.
- Madonna P, d. S. (2002). Hyperhomocysteinemia and other inherited prothrombotic conditions in young adults with a history of ischemic stroke. *Stroke*, 33, 51-56.
- Madrigal, D. (2010). *Frecuencia del polimorfismo 4G/5G en el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), en pacientes jóvenes con enfermedad aterotrombótica cerebral*. México: IPN.
- Martinelli L., F. F. (1997). The transition G to A at position 20210 in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is not associated with cerebral ischaemia. *Blood*, 90, 3806.
- Martinez Augustin, S. d. (2004). Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm*, 45(4), 303-317.
- Medicine, N. L. (10 de Junio de 2013). *Genetics Home Reference*. Recuperado el 12 de junio de 2013, de <http://ghr.nlm.nih.gov/Resources/medicalterminology>
- Medicine, U. N. (mayo de 2013). *Genetics home reference* . Recuperado el 13 de junio de 2013, de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/F5>
- Méndez Arturo, F. J. (1999). Metabolismo de la homocisteína y su relación con la aterosclerosis. *Rev Cubana Invest Biomed*, 18(3), 155-168.
- Merino, N. Z. (2000). *Prevalencia del factor V Leiden y la mutación G20210A del gen de la protrombina en Navarra, y su papel como factores de riesgo trombótico*. Pamplona.
- Moncada S, P. R. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42.
- Nakata Y, K. T. (1998). Methylene tetrahydrofolate reductase gene polymorphism: relation to blood pressure and cerebrovascular disease. *Hypertens*, 1019-1023.
- Ney Callas, E. P. (2007). Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en un grupo de escolares del centro-oriente colombiano: comparación con las concentraciones plasmáticas de lípidos y apolipoproteínas. *Biomedica*, 27, 525-36.
- Oliva Rafael, B. F. (2008). *Genética Médica*. Madrid España: Díaz de Santos.

- Palmer RM, F. A. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-6.
- Passarge, E. (2007). *Genética, Texto y Atlas* (3 ed.). Mexico: Panamericana.
- Pedro-Botet J, S. M.-P. (1992). Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. Role of lipoprotein (a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke*, 23, 1556-1562.
- Pérez Sergio, R. E. (2004). Polimorfismo genético 4G/5G del gen inhibidor del activador del plasminogeno 1 (PAI-1) en el postoperatorio de cirugía cardíaca. Implicaciones hemodinámicas, (bajo gasto), pronósticas (mortalidad y complicaciones asociadas) y recuperación funcional. *Investigación Cardiovascular*, 116-130.
- Pérez, F. H. (2011). Evento Isquémico en pacientes Jóvenes. *Archivos de Medicina de Urgencia de Mexico*, 3(2), 67-78.
- Poort SR, R. F. (1996). A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*(88), 3698-703.
- Possos, D. D. (2009). *Protocolo de electroforesis del DNA en geles de agarosa; Protocolos de laboratorio UEG*. Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
- Raul Carrillo, P. V. (2004). Coagulopatía del paciente quirúrgico. El nuevo modelo celular de la coagulación y su aplicación en Anestesiología. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 219-230.
- Rees, D. (1996). The population genetics of Factor V Leiden (Arg506Gln). *Br J Haematol*(95), 579-86.
- Requejo Ana, O. R. (2000). *Nutriguía, manual de nutrición clínica*. Madrid: UCM, Editorial Complutense.
- Ricardo Roza Uribe, J. A. (2003). *Prácticas y procedimientos, Guías de práctica clínica*. Ediciones Medicas Latinoamericanas.
- Ridker PM, H. C. (1999). G20210A mutation in prothrombin gene and risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in a large cohort of US men. *Circulation*, 99, 999-1004.
- Rivera Maria Luz, D. G. (2006). Homocisteína y enfermedad vascular oclusiva. *Revista de Posgrado de la Vía Catedra de Medicina*, 24-30.
- Rodak. (2002). *Hematología, Fundamentos y aplicaciones clínicas*. México : Panamericana .
- Rodríguez R.J. Francisco, M. J. (2004). Infarto al miocardio y mutación de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa. *Comunicaciones Breves*, 476-478.
- Rosendaal FR, D. C. (1998). Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Tromb Haemost*(79), 706-8.

- Ruíz Quezada, V. d. (2005). Asociación del polimorfismo 4G/5G del gen PAI-1 con el perfil de lípidos, en pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y controles clínicamente sanos. *medigraphic*, 21-28.
- Ruiz-Arguelles GJ, G.-E. J.-N.-C. (2001). Primary Thrombophilia in México II: Factor V G1691A (Leiden), prothrombin G20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in thrombophilic Mexican mestizos. *Hematol*, 28-31.
- Ruza, F. (2002). *Tratado de cuidados intensivos pediátricos* (tercera ed., Vol. III). Capitel Ediciones .
- Sában Ruíz José, F. V. (2009). *Control global del riesgo cardiometabólico*. Madrid: Diaz de Santos.
- Sabán, J. (2012). *Factores Metabólicos, homocisteína*. Madrid: Diaz de Santos.
- Salazar Sanchez L., J. C. (Septiembre de 2007). Mutación 20210G/A del gen de la protrombina en una familia costarricense. *Revista Medica de la Universidad de Costa Rica*, 1(1), 28-34.
- Sánchez C. M., J. P. (2009). La homocisteína: un aminoácido neurotóxico . 3-8.
- Sanchez MB, G. J. (2006). Polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) en la patología isquémica vascular. *Neuro*(43), 630-636.
- Santiago Rodríguez, T. R. (6 de Enero de 2009). *OEGE online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*. Recuperado el 23 de Junio de 2013, de <http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>
- Segal Claudia, O. G. (2005). *Manual de Practicas de Biología Molecular de la Celula I*. (UNAM, Ed.) Mexico, Mexico: Publidisa.
- Shajith Anoop, A. M. (2010). Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular y coronary heart disease. *Indian J Med*, 363-378.
- Szonolki Z, S. F. (2003). Evaluation of modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke. 1615-1620.
- Torres Luis M., Á. J. (2002). *Tratado de cuidados críticos y emergencias II*. España: ARÁN.
- Tortora Gerard, F. B. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9 ed.). México: Panamericana.
- Turrent J, T. L. (2002). Comportamiento y manejo de la enfermedad cerebrovascular en unidad de cuidados intensivos. *Cub. Med. Int. Emerg.* .
- Urike Nowak-Gottl, R. S. (2001). The Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) promoter 4G/4G genotype is not associated whit ischemic stroke in a population of German children. *Eur J Haematol*, 66, 57-62.
- Velásquez Julio, H. L. (2011). Papel del Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en el Cáncer. *Biocáncer*, 5, 1-16.
- Victoria Marca, O. A.-O. (2011). Polimorfismo genético de la apolipoproteína E en una Población Peruana. *Rev Peru Med*, 28(4), 589-94.

- Wang H, R. D. (1988). Localization of the gene encoding human factor V to chromosome 1q21-25. *Genomics*, 2, 334-8.
- Wang XL., S. A. (1996). A smoking-dependent risk of artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 2, 41-45.
- Wayne Ch, T. V. (2003). Estimating the rate of thrombin and fibrin generation in vivo during cardiopulmonary bypass. *Blood*(101), 4355-62.
- Weintraub, M. I. (1998). Causes and Mechanisms of Cerebellar Infarction in Young Patients. *Stroke*, 29, 867-872.
- Whizar Victor, H. M. (2008). Factor V Leiden y anestesia. *Anestecia en México*, 3(20), 122-131.
- Wiklund PG., N. L. (2005). Plasminogen Activator Inhibitor -1 4G/5G Polymorphism and risk of Stroke Replicated Findings in Two Nested Case Control Studies Based on independent Cohorts. *Stroke*, 36, 1661-1665.
- WJ Williams, A. E. (1990). *Hematology*. New York: McGraw-Hill.
- Xue-Lei Cao, C.-Y. Z.-C.-L.-H. (2010). Reative protein, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)levels, PAI-1 promoter 4G/5G polymorphism and acute myocardial infarction. *Journal of Geriatric Cardiology*, 7, 3-4.
- Yahashi Y., K. K. (1998). The 27 pb repeat polymorphism in intron 4 of the endotelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in a Japanese population. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 9, 405-409.
- Yoshimura M, Y. H. (2000). Genetic Risk factors for coronary artery spam: significance of endotelial nitric oxide synthase gene T786C and missense Glu298Asp variants. *J Investig Med*, 48, 367-374.
- Zabala, C. (2000). Metabolismo de las lipoproteínas y significado clínico. *Clínica las Condes*, 11(4).