

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

**Asociación del Polimorfismo G894T en el gene de la Enzima
Sintasa del Oxido Nítrico Endotelial (eNos) con el Infarto
Agudo del Miocardio.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

PRESENTA:

María Cristina Rojas Guerrero

Director de Tesis: Dra. Irma Isordia Salas

Dr. Javier Mancilla Ramírez

Diciembre 2010



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 20 del mes de septiembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Asociación del Polimorfismo G894T en el Gene de la Enzima Sintasa del Oxído Nítrico Endotelial (eNos) con el Infarto Agudo del Miocardio”

Presentada por el alumno:

Rojas

Apellido paterno

Guerrero

Apellido materno

María Cristina

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	4	9	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

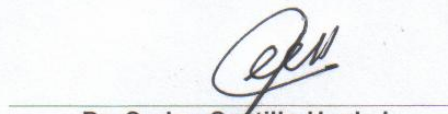
LA COMISIÓN REVISORA


Directores de tesis


Dr. Javier Mangilla Ramírez


Dra. Irma Isordia Salas


Dr. Juan Asbun Bojalil


Dr. Carlos Castillo Henkel


Dra. Norma del Carmen Galindo
Sevilla

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 20 del mes septiembre del año 2010, el que suscribe Rojas Guerrero María Cristina alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA con número de registro B071499 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Javier Mancilla Ramírez, Dra. Irma Isordia Salas y cede los derechos del trabajo intitulado "Asociación del Polimorfismo G894T en el Gene de la Enzima Sintasa del Oxido Nítrico Endotelial (eNos) con el Infarto Agudo del Miocardio", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección heclui@prodigy.net.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Cristina Rojas Guerrero

Nombre y firma

Este trabajo fue realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico, la Raza, en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis Hemostasia y Aterogénesis del H.G.R. No. 1 Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro” y en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional bajo la Dirección de la Dra. Irma Isordia Salas y el Dr. Javier Mancilla Ramírez

INDICE	PÁGINA
Glosario	4
Relación de Figuras y Tablas	5
Resumen	6
Abstracs	8
Antecedentes	9
Planteamiento del problema	22
Pregunta de Investigación	22
Objetivos	22
Hipótesis	22
Material y Métodos	23
Diseño del estudio	
Criterios de Inclusión,	24
Criterios de No inclusión	25
Criterios de Exclusión	26
Descripción de Variables	27
Tamaño de la muestra	30
Análisis Estadístico	32
Consideraciones Éticas	32
Resultados	33
Discusión	35
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Bibliografía	45
Anexo 1	54
Anexo 2	56
Anexo 3	58

GLOSARIO

- DM2Diabetes mellitus tipo II
- EDRF.....Factor relajante derivado de endotelio
- eNOS.....Sintasa de Oxido Nítrico endotelial
- HTAS..... Hipertensión Arterial Sistémica
- IAMInfarto agudo al miocardio
- IAMCEST.....Infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST
- iNOS.....Sintasa de Oxido Nítrico inducible
- nNOS.....Sintasa de Oxido Nítrico neuronal
- NO..... Oxido nítrico
- PCR.....Reacción de cadena de Polimerasa
- SMC.....Células de músculo liso
- ST.....Segmento ST en el electrocardiograma

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Página 10.....Figura 1. Interacción de los factores genéticos y ambientales para el desarrollo de IAM

Página 11.....Figura 2. Formación de la placa aterosclerosa. Penetración de las LDL oxidadas e inicio del proceso ateromatoso con la formación de las células espumosas (macrófagos con contenido lipídico en su interior).

Página 11... Figura 3. Activación del sistema de la coagulación sanguínea y generación de fibrina, presencia de agregados plaquetarios lo que origina obstrucción de la luz del vaso mediante la formación de un trombo.

Página 12....Figura 4. Interacción de elementos que favorecen la aparición de trombosis arterial.

TABLAS

Página 20...Tabla 1. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Glu 298 Asp (eNOS) en varias poblaciones indígenas mexicanas.

Página 21.....Tabla 2 Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas en población mexicana comparada con otros grupos a nivel mundial.

Página 39.....Tabla 3 Características Demográficas y Clínicas de los pacientes con IAMCEST y del grupo CONTROL.

PAGINA 40...TABLA 4 Genotipo eNOS Glu298Asp y frecuencia alélica para el grupo de pacientes con STEMI y sin STEMI

PAGINA 41...TABLA 5 Impacto Clínico de los diferentes alelos en pacientes con IAMCEST

PAGINA 42 TABLA 6 Análisis de Regresión Logística Múltiple usando IAMCEST como la variable dependiente.

RESUMEN

Antecedentes. El polimorfismo G894T en el gene de la enzima sintasa del oxido nítrico endotelial, se ha asociado con hipertensión arterial y enfermedad arterial coronaria en diversas poblaciones en todo el mundo, pero los resultados son contradictorios. El objetivo del presente estudio fue examinar la posible asociación del polimorfismo G894T con el desarrollo de infarto prematuro con elevación del segmento ST (IAMCEST) en población joven mexicana.

Métodos. En un estudio de casos y controles se estudiaron 180 pacientes con diagnóstico de IAMCEST con una edad igual o menor a 45 años de edad, que fueron admitidos a la Unidad de cuidados Intensivos Cardiovasculares y 180 sujetos aparentemente sanos que fueron incluidos en el grupo control, los cuales fueron pareados por edad. Los pacientes y controles fueron recluidos de Enero del 2006 a Marzo del 2009. En todos los sujetos (pacientes y controles) se determino el polimorfismo G894T mediante técnica de reacción de cadena de la polimerasa- restricción de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP).

Resultados. Se identificó una diferencia significativa en la distribución entre los dos grupos ($p=0.001$). El alelo Asp fue más frecuente en el grupo de pacientes ($p=0.001$). También se identificaron como factores de riesgo independiente: el alelo Asp (OR 2.2, 95%IC 1.11-3.5, $p=0.03$), tabaquismo (OR 5.0, 95% IC 3.1-8-2, $p<0.001$), enfermedad cardiovascular, OR 3.7, 95% IC 2.0 -4.6, $p=0.02$), y dislipidemia (OR 3.4, 95%IC 2.0-6.3, $p=0.02$).

Conclusiones. El alelo Asp del polimorfismo Glu298Asp representa un factor de riesgo independiente para infarto prematuro con elevación del segmento ST (IAMCEST) en población Mexicana.

ABSTRACT

Background. The polymorphism G894T of endothelial nitric oxide (eNOS) gene has been associated with hypertension and coronary artery disease in several populations worldwide, but results are still controversial. The aim of this study was examined the possible association of the G894T with premature ST elevation myocardial infarction (STEMI) in young Mexican population.

Methods. In a case-control study 180 unrelated patients with STEMI ≤ 45 years of age, who were admitted to a cardiovascular intense care unit and 180 apparently healthy controls matched by age were recruited from January 2008 and March 2009. The polymorphism G894T was determined in all participants by a polymerase chain-reaction-restriction fragment length polymorphism assay (PCR-RFLP).

Results. There was a significant difference in the genotype distribution between two groups ($P=0.001$). The allele Asp occurred more frequently in the patients group ($P=0.001$). There were independent factors for STEMI: the Asp allele (OR 2.2, 95%CI 1.1-3.5, $P=0.03$), smoking (OR 5.0, 95% CI 3.1-8.2, $P<0.001$), hypertension (OR 2.0, 95%CI 1.0-3.5, $P=0.03$), family history of cardiovascular disease, (OR 3.7, 95% CI 2.0-4.6, $P=0.02$), and dyslipidemia (OR 3.4, 95%CI 2.0-6.3, $P=0.02$).

Conclusions. The Asp allele from the Gu298Asp polymorphism represents an independent risk factor for premature STEMI in Mexican population.

ANTECEDENTES

DEFINICIÓN:

Se denomina como Infarto agudo al miocardio (IAM) a la muerte celular de las miofibrillas cardíacas, causada por falta de aporte sanguíneo a una zona del corazón debida a la oclusión aguda y total de la arteria que irriga dicho territorio (1).

EPIDEMIOLOGÍA

El IAM es la primera causa de morbimortalidad en el mundo. En los países industrializados como Estados Unidos, se presentan más de un millón de individuos con infarto agudo del miocardio (IAM) y es la primera causa de muerte ocasionando 500,000 decesos por año (2). En México la incidencia anual de Infarto agudo al miocardio (IAM) se estima en 140,000 casos, considerando que por cada fallecido (35,000), sobreviven 3, siendo las tasas de mortalidad por IAM estandarizadas por edad más altas que en Estados Unidos y en Canadá lo cual es preocupante. (2-3).

FACTORES DE RIESGO

El IAM es un fenómeno multifactorial, resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales relacionados con el desarrollo de aterosclerosis y trombosis (4,5). El desarrollo del IAM es favorecido por la presencia de factores ambientales como tabaquismo, hábitos dietéticos, sobrepeso y sedentarismo, así como, otras condiciones patológicas como la hipertensión arterial sistémica (HAS), Diabetes Mellitus (DM2) e hipercolesterolemia, sobre las que se puede

intervenir para modificar el riesgo de desarrollo de IAM (6-8). (Fig. 1).



Figura 1. Interacción de los factores genéticos y ambientales para el desarrollo de IAM.

FISIOPATOLOGÍA

El mecanismo fisiopatológico más aceptado del IAM, consiste en la erosión o ruptura súbita de la placa aterosclerosa. La placa de ateroma se inicia por la acumulación de lípidos dentro de la pared arterial y simultáneamente se presenta inflamación endotelial, así como reclutamiento de células inflamatorias dentro de la íntima del vaso. Posteriormente, células musculares migran desde la íntima dando origen a una matriz extracelular, densa y fibrosa, característica de lesiones avanzadas. En este momento, la placa es susceptible a ruptura debido a la actividad proteolítica de las enzimas secretadas por las células inflamatorias sobre la capa fibrosa (9,10). (Figura 2)

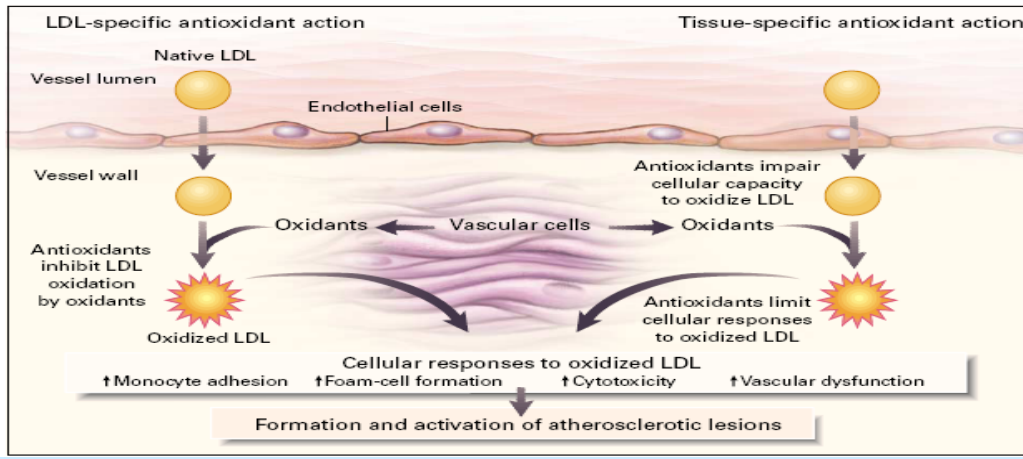


Figura 2. Formación de la placa aterosclerosa. Penetración de las LDL oxidadas e inicio del proceso ateromatoso con la formación de las células espumosas (macrófagos con contenido lipídico en su interior).

Una vez que ha ocurrido la ruptura de la placa, se inician los procesos de adhesión y agregación de las plaquetas, formación de un tapón plaquetario, se activa el sistema de coagulación dando origen a la formación de fibrina que refuerzan el tapón hemostático primario (10-11). Figura 3

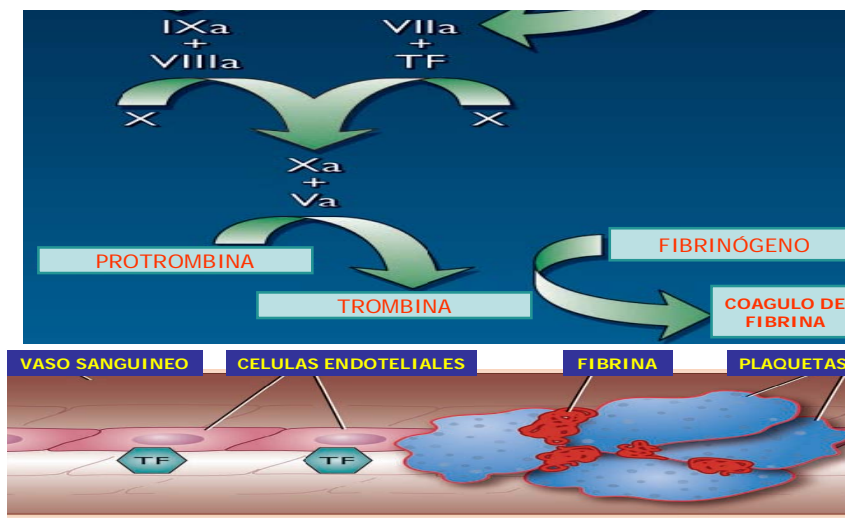


Figura 3. Activación del sistema de la coagulación sanguínea y generación de fibrina, presencia de agregados plaquetarios lo que origina obstrucción de la luz del vaso mediante la formación de un trombo.

En la fisiopatología de la trombosis arterial se involucran interacciones complejas entre la superficie endotelial, las plaquetas y diversos activadores de la coagulación. Desde 1856, Rudolf Virchow, describió tres condiciones fundamentales para el desarrollo de la trombosis: 1) alteración del sistema de coagulación sanguínea, 2) el flujo sanguíneo y 3) la superficie endotelial del vaso, requiriendo que estos factores interactuaran entre sí para formar un trombo localizado (10,11). **(Fig.4)**

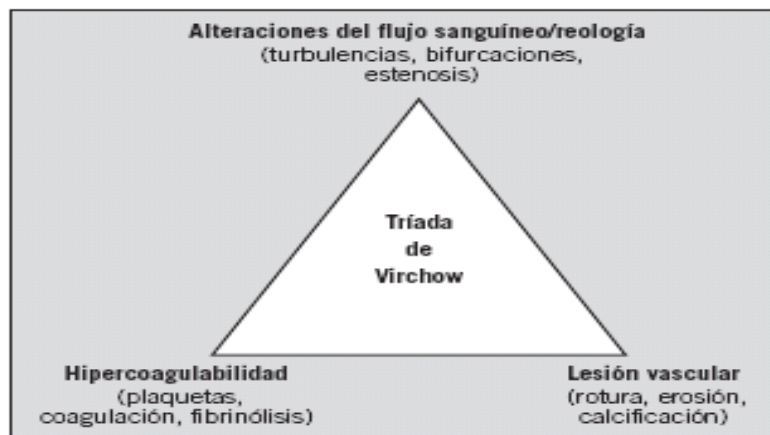


Figura 4. Interacción de elementos que favorecen la aparición de trombosis arterial.

SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO (NOS).

El endotelio es una línea de células endoteliales que cubre la superficie de numerosos vasos y otras estructuras; la localización estratégica que ocupa a lo largo de éstos, le permite actuar como un sensor y modulador en el vaso (11-13). El endotelio sano trabaja para evitar el desarrollo de aterosclerosis y sus complicaciones. La función del endotelio humano involucra respuestas vasomotoras y

además incluye marcadores fisiológicos, bioquímicos y genéticos que lo involucran con las plaquetas leucocitos y el sistema de coagulación.

El endotelio tiene un papel clave en la homeostasis mediante la producción de numerosos mediadores bioquímicos paracrinós y autocrinós, con propiedades vasodilatadores y vasoconstrictoras como el óxido nítrico (NO) llamado inicialmente Factor relajante derivado del endotelio (EDRF), que es el que mejor se ha caracterizado. El NO se genera por la conversión de L-arginina a L-citrulina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (14,15). Existen tres isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): óxido nítrico sintasa neuronal: nNOS (NOS1), óxido nítrico sintasa inducible: iNOS (NOS2) y óxido nítrico sintasa endotelial: eNOS (NOS3). El endotelio sintetiza eNOS, codificada por el exón 26 q35-q36 localizado en el cromosoma 7 (9). eNOS se expresa constitutivamente en células endoteliales, células endocárdicas y probablemente en el miocito e interviene en la síntesis de NO que penetra a las células musculares lisas vasculares que permiten mantener la relajación vascular, inhibir la agregación plaquetaria (16) y la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular (17). Además, NO inhibe la proliferación de las células musculares lisas, por lo que una disminución de su producción promueve la proliferación de la neoíntima endotelial. nNOS se encuentra en las terminales nerviosas que liberan norepinefrina. En respuesta a la inflamación iNOS es expresada y genera grandes cantidades de NO independiente de la estimulación con agonistas y Ca^{++} .

En los últimos veinte años, se ha vuelto evidente la disfunción endotelial, donde la disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico endotelial (NO) producido por la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), tiene un papel crucial en el desarrollo y progresión de aterosclerosis. Los progresos hechos para conocer los

mecanismos que disminuyen la biodisponibilidad de NO, son: 1.- a nivel de la regulación de la expresión del gene de eNOS, 2.- la actividad enzimática de eNOS y 3.-la inactivación de NO. Así, los estudios recientes de investigación están dirigidos a mejorar la función endotelial sobre I.- la regulación de la actividad enzimática de eNOS y II.-la inactivación de NO por el estrés oxidativo (18).

El NO derivado del endotelio, es sintetizado del sustrato L-arginina, vía la eNOS y juega un papel crucial en la función de un amplio espectro de funciones en el sistema cardiovascular, incluyendo relajación vascular, inhibición de la adhesión leucocitos-endotelio, migración y proliferación de células del músculo liso (SMC), así como, la agregación plaquetaria. Las lesiones físicas o bioquímicas del endotelio, deteriora la función de mediadores de protección vasculares, derivados del endotelio, como el NO, produciendo un incremento de contracciones vasculares, vía vasoconstrictores tales como endotelina-1, tromboxanos y serotonina, que refuerzan la formación del trombo y exacerban la producción y migración de SMC. No es sorprendente que la pérdida de la función endotelial está asociada con algunas alteraciones cardíacas, incluyendo aterosclerosis, la cual se produce debido a un incremento de la producción ó al incremento de la degradación de NO. Se ha demostrado que defectos en la función endotelial de NO (disfunción endotelial), asociada con los principales factores de riesgo cardiovasculares (Dislipidemias, DM2, HAS y tabaquismo), tiene un alto valor de predicción para la progresión de la aterosclerosis (11,18).

La producción reducida de NO se asocia con un incremento del consumo de oxígeno y se asocia a un cambio del uso de sustratos de ácidos grasos por glucosa en el corazón (19).

La liberación basal de NO ha sido demostrada en circulación coronaria en humanos, como respuesta de estímulo a acetilcolina y serotonina, los cuales producen vasodilatación que depende del endotelio en

vasos coronarios epicárdicos; efecto que se bloquea parcialmente al usar inhibidores de NOS.

Las células del endotelio que revisten la superficie interna de los vasos sanguíneos producen NO en respuesta a Acetilcolina liberada por los nervios autónomos que inervan los vasos periféricos. La unión de la acetilcolina a su receptor en la membrana de la célula endotelial produce un incremento de la concentración del ión Ca^{++} intracelular, lo que activa a NOS para producir NO a partir de L-arginina el cuál difunde a través de la membrana plasmática a las células del músculo liso adyacente donde estimula a la guanilato ciclasa para producir GMPc a partir de GTP, El GMPc desencadena la respuesta que conduce a la relajación de la célula muscular y la dilatación subsecuente del vaso sanguíneo.

Comparados con la actividad basal de un sujeto sano, se ha demostrado que la actividad del endotelio se encuentra disminuida en sujetos con aterosclerosis, El NO tiene un papel clave en la función de las plaquetas y leucocitos humanos, el uso de inhibidores de NOS produce una disminución de GMPc en las plaquetas obtenidas de seno coronario, la liberación de NO está disminuido en las plaquetas de sujetos con angina inestable comparados contra los que tienen angina estable. La actividad de NO es el resultado de un balance entre la producción de NO y su desactivación por radicales libres de oxígeno.

La atenuación del efecto del NO, se puede considerar como una disfunción endotelial, lo que puede ocurrir en respuesta a la aterosclerosis o factores de riesgo, alteraciones genéticas, de las que aún no se conoce mucho, así como, de la patofisiología de las células endoteliales (20,22).

Sin embargo, en aproximadamente un 50 % de los pacientes, los eventos trombóticos arteriales ocurren sin asociación a factores de riesgo conocidos. Actualmente se conocen diversas alteraciones

genéticas que afectan al sistema hemostático y al endotelio, los cuales son llamados polimorfismos y pueden contribuir al desarrollo del IM (23,24). Es importante identificar la prevalencia de tales polimorfismos para conocer mejor los mecanismos moleculares del IM y prevenir el desarrollo de la enfermedad en los familiares de estos pacientes.

Los primeros datos acerca de la participación de un componente genético en el desarrollo de un IM, provienen de estudios realizados en familiares de pacientes, cuyo riesgo de padecer un IM fue cuatro veces mayor que en familiares de sujetos sanos (25-27). Actualmente, el antecedente familiar de infarto al miocardio es un factor de riesgo independiente (28), y es mayor cuando el IM se presenta en pacientes jóvenes (29).

Los estudios para evaluar la influencia hereditaria de algún genotipo específico, son de particular relevancia si se efectúan en gemelos y más aun si son univitelinos (30). En un estudio con 21,004 parejas de gemelos, el riesgo para presentar un IM fue significativamente más alto en 7,310 gemelos monocigotos, que en 13,694 gemelos dicigotos. A pesar de que se conoce la participación genética en el desarrollo del IM, no se han estudiado las alteraciones que ocurren de los sistemas de coagulación y fibrinolítico y del endotelio que favorecen el desarrollo de la trombosis arterial, ya que la mayor parte de los estudios son enfocados a los factores de riesgo clásicos (31).

En la última década se ha presentado un desarrollo importante en la investigación molecular, lo que ha permitido identificar la alteración en algunos genes (polimorfismos), de las proteínas que constituyen el sistema hemostático, las cuáles favorecen el desarrollo de enfermedades trombóticas arteriales. Se denomina como polimorfismo a una variación en la secuencia de DNA (alelo), en un gene determinado y se presenta en un porcentaje mayor a 1% en la población general.

Entre los diversos polimorfismos asociados a desarrollo de enfermedad arterial coronaria se encuentran el gene para la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (32), el gene del factor de la coagulación VII (FVII) (33), el gene que codifica para la enzima metilen tetrahidrofolato reductasa (34).

POLIMORFISMO G894T DEL GEN eNOS EN IAM.

La enzima óxido nítrico sintasa humana es codificado por un gene de 26 exones en el cromosoma 7. algunos estudios genético clínicos identificaron diferentes polimorfismos de gene eNOS, que podrían estar asociados a enfermedad arterial coronaria aterosclerótica (Garderman et. Al, Jones, et. Al. (35-36). Algunos de los polimorfismos identificados son la sustitución el G894T en el exón 7, resultado de la conversión de glutamato a aspartato en la posición 298 (variante Glu298Asp), es uno de los más estudiados y se ha asociado con enfermedad arterial coronaria aterosclerótica en dos cohortes independientes reclutados del Cambridge Heart Antioxidantes Studies (CHAOS-I y CHAOS-II) (37). Esta variante también ha sido asociada con hipertensión (38), disminución del desarrollo coronario colateral (39), enfermedad arterial coronaria (40-43) y respuesta vascular incrementada a la fenilefrina (44).

Diversos estudios han demostrado que la presencia del polimorfismo en el gene de enzima eNOS, producido por el cambio de una base de guanina por una de timina (G894T), lo que se traduce por una substitución de un aminoácido de glutamina por una asparagina a la posición 298 en la molécula de dicha proteína. Dicha substitución promueve el rompimiento de la enzima en esta posición disminuyendo su función (45). Este polimorfismo está asociado con disfunción endotelial en pacientes con enfermedad arterial coronaria (46), hipertensión esencial (38) e IM (47-50). Además se ha

demostrado que dicho polimorfismo afecta la respuesta vascular endotelial ante un incremento del estrés oxidativo en sujetos fumadores así como, una asociación en el desarrollo del IAM en algunas poblaciones y se ha asociado con un incremento en el riesgo de vaso espasmo coronario e infarto al miocardio en población japonesa (51).

Para determinar si el polimorfismo G 894 T se relaciona con el riesgo de infarto agudo al miocardio, aterogénesis, estenosis del Stent, Andrikopoulos y cols. (52) se realizaron un estudio multicéntrico en la población griega en 1602 pacientes consecutivos, con el diagnóstico de infarto agudo al miocardio y con 762 controles sin infarto agudo al miocardio, se les investigó el polimorfismo G 894 T. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de los alelos, y tampoco se encontró diferencias entre los factores de riesgo coronario mayores, en el modelo de regresión logística, el polimorfismo no fue asociado a mayor riesgo de infarto agudo al miocardio. La posesión de este polimorfismo no tuvo una asociación estadísticamente significativa con mortalidad.

Vasilakou y cols. (53) Realizaron otro estudio independiente en la población griega en el cual buscaron asociación entre en polimorfismo Glu298Asp sin encontrar relación con el infarto agudo al miocardio prematuro.

Colombo y cols. (54) realizaron un estudio de casos y controles en la población italiana con 268 pacientes consecutivos con cardiopatía isquémica y se compararon con pacientes sin cardiopatía isquémica. Se les tomó muestra sanguínea para determinación de polimorfismo Glu298-Asp en el exón 7 del gen de eNOS. Se demostró en este estudio que el polimorfismo Glu 298-AS en el exón 7 fue asociado significativamente con la presencia de cardiopatía isquémica.

Para demostrar el efecto de los portadores del polimorfismo en la producción de óxido nítrico y en el tono vascular Malhotra y cols. (55)

estudiaron 497 adultos jóvenes, con un promedio de edad de 18.5 años, los cuales fueron sometidos a stress con un videojuego, se les midió la presión arterial, el tono vascular, y se determinó el polimorfismo G 894T. En este estudio se encontró diferencias estadísticamente significativas $p < 0.01$ en cuanto a sexo. Los hombres tuvieron significativamente la presión arterial más alta que las mujeres, no se encontraron diferencias en relación a grupo étnico, edad y/o obesidad.

Casas y cols. (56) escribieron un artículo de revisión de los polimorfismos relacionados con enfermedad cardiovascular y encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los alelos Asp298 y T786C por grupos étnicos entre Asiáticos, Hispánicos y Amerindios, concluye que es necesario realizar más estudios del polimorfismo en estas poblaciones.

Granath y cols. (57) estudiaron los polimorfismos 4ab, G894T, y T786C en sujetos caucásicos australianos, y no encontraron ninguna relación de estos polimorfismos con la enfermedad arterial coronaria en su población.

En un estudio hecho por Vargas y cols. sobre el polimorfismo de G894T en diferentes poblaciones indígenas mexicanas (Mestizos, Huastecos, Mayas y Mayos), obtuvieron diferencia entre los alelos homocigotos Glu/Glu, heterocigotos Glu/Asp y homocigotos Asp/Asp entre los grupos Mestizos y Huastecos comparados contra Mayas y Mayos, encontrando una menor cantidad del alelo heterocigoto en los grupos de Mayas y Mayos, y al compararlo con otros grupos caucásicos y asiáticos, estos resultados eran similares entre los grupos Mayas / Mayos y el japonés (58) (Tabla 1)

Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo **Glu298Asp** (eNOS) en varias poblaciones indígenas mexicanas.

Población	n	Glu/Glu	Glu/Asp	Asp/Asp	Glu	Asp	total
Mestizo	126	94 (74.6%)	30 (23.8%)	2 (1.6%)	218 (86.5%)	34 (13.5%)	252
Huasteco	65	50 (76.9%)	15 (23.1%)	0 (0.0%)	115 (88.5%)	15 (11.5)	130
Maya	26	23 (88.5%)	3 (11.5%)	0 (0.0%)	49 (94.2%)	3 (5.8%)	52
Mayos	77	64 (83.1%)	13 (16.9%)	0 (0.0%)	141 (92.0%)	13 (8.0%)	154

Rosas-Vargas H y cols. Human Biology. Febrero 2003; 75(1): 91-96

Tabla 1. Distribución genotípica y frecuencia alélica del polimorfismo Glu 298 Asp (eNOS) en varias poblaciones indígenas mexicanas.

Frecuencia de alelos del polimorfismo **Glu298Asp** (eNOS) en varias poblaciones

Población	n	Glu 298	Asp 298	Referencia
Mestizos Mexicanos	126	0.86	0.14	Rosas-Vargas y cols (2003)
Huastecos mexicanos	65	0.88	0.12	Rosas-Vargas y cols (2003)
Mayas mexicanos	26	0.94	0.06	Rosas-Vargas y cols (2003)
Mayos mexicanos	77	0.92	0.08	Rosas-Vargas y cols (2003)
Caucásicos ingleses	138	0.69	0.31	Hingorani y cols 1999
Caucásicos australianos	763	0.67	0.33	Cai y cols 1999
Asiáticos japoneses	100	0.96	0.04	Yoshimura y cols 1998

Rosas-Vargas H y cols. Human Biology. Febrero 2003; 75(1): 91-96

TABLA 2 Comparación de las frecuencias alélicas obtenidas en población mexicana comparadas con otros grupos a nivel mundial.

Casas et. Al realizaron un meta-análisis para determinar si el polimorfismo de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial se asocia con el incremento en la susceptibilidad para desarrollar aterosclerosis independientemente de los cambios de presión arterial y obtuvieron de 16 artículos de revistas indexadas, con 6, 036 casos y 6,106 controles encontrando diferencias significativas en los individuos con polimorfismo Glu298Asp entre diferentes grupos étnicos, asiáticos 7.6 % vs no asiáticos $p < 0.0001$ (caucásicos, negros, latinos). (59)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El infarto agudo al miocardio es una de las causas más importantes de morbimortalidad en el mundo y en México, constituyendo uno de los problemas más importantes de salud pública. Aunque existen factores de riesgo ampliamente aceptados para cardiopatía isquémica, la mitad de los pacientes no tienen factores de riesgo conocido.

Si el óxido nítrico es clave en el adecuado funcionamiento endotelial y si la reducción en la enzima eNOS ocasiona disminución en su producción debido al polimorfismo G894T (eNOS), entonces la presencia del polimorfismo G894T (eNOS) se asociará a incremento de la prevalencia de infarto agudo al miocardio.

Se ha determinado este polimorfismo en algunas razas, con resultados contradictorios, aunque en México se ha determinado ya el polimorfismo G894T (eNOS) en algunas poblaciones de indígenas sanos, no se ha estudiado aún en pacientes infartados

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.- ¿Existe asociación entre el polimorfismo G894T en el gene de la enzima sintasa del oxido nítrico endotelial (eNOS), con el infarto agudo del miocardio?

OBJETIVO

GENERAL:

1.-Determinar si existe asociación entre el polimorfismo G894T en el gene de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) con el infarto agudo al miocardio.

HIPÓTESIS

Existe asociación entre el polimorfismo (G894T) en la enzima eNOS con el infarto agudo al miocardio.

MATERIAL Y MÉTODOS.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO:

Se realizará un estudio Observacional,

Método de observación: Longitudinal

Tipo de análisis: Comparativo

Temporalidad: Retrospectivo

Tipo de Diseño: Casos y controles.

UNIVERSO:

Se estudió una muestra de expedientes y pacientes que ingresaron al Hospital de Especialidades del centro médico la Raza y del Hospital General Regional No.1 "Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro"

durante los meses de Enero del 2007 a Marzo del 2010 a quienes se le diagnosticó infarto agudo al miocardio.

MUESTRA

Se formó una muestra de los pacientes consecutivos ingresados al hospital con diagnóstico de Infarto Agudo al Miocardio que cumplieron con los criterios de inclusión hasta completar el número de casos requeridos para la muestra (muestreo por cuota).

Simultáneamente se eligieron individuos sanos que cumplieron con los criterios de inclusión para formar el grupo de comparación, y se emparejaron por edad y sexo.

Se obtuvo de los expedientes historia clínica completa la cual incluyó antecedentes familiares de cardiopatía isquémica e infarto, antecedentes patológicos como diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, tabaquismo, hipercolesterolemia, sedentarismo, se registró índice de masa Corporal. Se obtuvieron niveles de glucosa, colesterol.

CRITERIOS DE INCLUSION PARA GRUPO DE CASOS

Fueron incluidos pacientes, con diagnóstico de egreso de Infarto Agudo al Miocardio,

Procedentes de la Unidad Coronaria del Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza y de la Unidad Coronaria del Hospital de del Hospital General Regional No.1 "Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro

Edad de 20 a 45 años

- * Masculinos y femeninos.
- * Que el diagnóstico de infarto agudo al miocardio estuviera bien documentado en el expediente y que fuera establecido con

criterios clínicos, electro cardiográficos y enzimáticos, y corroborado por ecocardiografía, y/o angiografía. Estos criterios se muestran en el Anexo 1 (21).

- Que firmen carta de consentimiento informado.
- Que sean mexicanos, hijos de padres mexicanos.

CRITERIOS DE INCLUSION PARA EL GRUPO 2.

Pacientes masculinos y femeninos de 20 a 45 años de edad, que ingresaron a nuestras unidades por una causa diferente al infarto agudo al miocardio ó cardiopatía isquémica y los cuales tenían:

-Electrocardiograma de doce derivaciones sin evidencia de isquemia.

-Ausencia de dolor precordial, ó cardiopatía conocida.

-Que firmen carta de consentimiento informado.

-Que sean mexicanos, hijos de padres Mexicanos.

CRITERIOS DE NO INCLUSION PARA AMBOS GRUPOS

- Pacientes con antecedentes de abuso de drogas, como cocaína
- Pacientes que empleen medicamentos como esteroides y AINES

pacientes con enfermedades inmunológicas como Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, primario ó secundario. Trombofilias, síndromes de hipercoagulabilidad, neoplasias.

Pacientes con antecedentes de cardiomiopatía en cualquiera de sus variantes.

Valvulopatía cardíaca o cardiopatía congénita.

❖ CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No aplican

○ MÉTODO

Se obtuvo una muestra de 10 mL de sangre venosa, en cada individuo, se purificó el DNA genómico por un equipo comercial (Qiagen QIAamp DNAMini Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante. La genotipificación del polimorfismo Glu298Asp de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) de cada individuo se analizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguido de digestión con enzimas de restricción (*Ban II* y *MboI*). La secuencia de los iniciadores que se usaron para la amplificación fueron: Sentido: 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' y Contrasantido: 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGGTCAC-3'.

La prueba de PCR se realizó con: 200 ng de ADN genómico, 10 pM de cada iniciador, 0.2 mM de dNTP, 3.0mM de cloruro de magnesio, 1.0 U de *pfu* DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μ L. Las condiciones térmicas consistieron en desnaturalización a 96°C por 30 s, alineación a 60°C por 30 s y una extensión a 72°C por 30 s, por un total de 30 ciclos.

El producto de de PCR se dividió en dos partes, para someterse a un proceso de digestión con las endonucleasas *BanII* y *MboI* respectivamente durante 16h a 37°C. *BanII* rompió el producto de PCR de 206 pb en dos fragmentos de 124 pb y 82 pb en presencia de una G en el nucleótido 894 (que corresponde al alelo Glu298), pero no en su ausencia. Como complemento *MboI* generará dos fragmentos de 119pb y 87 pb en presencia del nucleótido T en posición 894 (que corresponde al alelo Asp298),

pero no en su ausencia. Los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se tiñieron con bromuro de etidio. Anexo 2.

DESCRIPCION DE LAS VARIABLES

VARIABLE INDEPENDIENTE:

1. Presencia del polimorfismo G894T en el gen de la eNOS

a) Definición Conceptual: Variación en la secuencia de ADN en el gen de la eNOS, el cual consiste en una substitución de un Guanina por Timina en el nucleótido 894.

b) Definición Operacional: es la presencia de la variación en la secuencia del ADN, el cual ocurre en más del 1% de la población caracterizado por el cambio del nucleótido Guanina por uno de Timina en la posición 894.

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: presente/ ausente

VARIABLE DEPENDIENTE:

Pacientes con Infarto Agudo al Miocardio

Definición Conceptual: Muerte celular de las miofibrillas causada por falta de aporte sanguíneo a una zona del corazón.

Definición operacional: Presencia de al menos 2 de los siguientes criterios: 1) Dolor torácico sugestivo de isquemia, 2) Cambios electrocardiográficos característicos (ver criterios de inclusión), 3) Incremento en los biomarcadores de necrosis miocárdica (ver criterios de inclusión).

Categoría: Cualitativa

Escala de medición: Nominal

Unidad de Medición. Dicotómica. Presente ó ausente

VARIABLES CONFUSORAS

Sexo y edad.

Dado que el infarto es más común en hombres, e incrementa su frecuencia a mayor edad, se emparejaron por sexo y por edad

Hipertensión arterial sistémica

a) Definición Conceptual: elevación de la tensión arterial sistólica >de 140 mmHg o de la tensión arterial diastólica >90 mmHg en mediciones repetidas, o bien cifras de tensión, arterial normal, pero bajo tratamiento antihipertensivo.

b) Definición Operacional: es la presencia de diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de tensión sistólica igual o mayor a 140 mmHg o diastólica igual o mayor a 90 mmHg en mediciones repetidas o bien cifras de tensión arterial normales pero bajo efecto de tratamiento antihipertensivo.

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Presente/ausente

Diabetes Mellitus

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

b) Definición Operacional: es la presencia del diagnóstico previo o durante la revisión de cifras de glicemia igual o mayor de 126 mg/dL en ayuno de al menos 6 horas, o bien 200 mg/dL o más a cualquier hora del día con presencia de síntomas, o bien cifras normales de glucemia bajo tratamiento hipoglucemiante.

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Presente/Ausente

Dislipidemia

a) Definición Conceptual: estado de desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno en tejido miocárdico que condiciona isquemia tisular con presencia de lesiones aterotrombóticas obstructivas.

b) Definición Operacional:

Colesterol igual ó mayor a 220 mg/dl y triglicéridos igual ó mayores a 180 mg/dl

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Presente/Ausente

Tabaquismo

a) Definición Conceptual: consumo de tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante un año, o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menor un año.

b) Definición Operacional: es la presencia del antecedente de haber consumido tabaco en cualquier época de la vida de por lo menos un cigarrillo por día durante un año, o bien la exposición pasiva al humo de tabaco diariamente al menor un año.

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Presente /Ausente

Obesidad

a) Definición Conceptual: Peso corporal secundario al acumulo de tejido adiposo que confiere un índice de masa corporal $>30\text{m}^2$ superficie corporal.

b) Definición Operacional: estado de desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno en tejido miocárdico que condiciona isquemia tisular

c) Tipo de Variable: cualitativa

d) Escala de Medición: nominal, dicotómica

e) Unidades de Medición: Presente/Ausente

Las variables confusoras, dado que intervienen el infarto agudo al miocardio se emparejaron por sexo y por edad, y se midió su asociación con el polimorfismo, las que resultaron ser significativas se le sometieron a un análisis multivariado del tipo regresión logística.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Dado que no existen estudios en México que informen sobre la prevalencia del polimorfismo G894T de eNOS (ya que los que existen sólo se concretan a poblaciones indígenas puras y sanas), Se realizó

un estudio piloto, para determinar el polimorfismo G894T de eNOS en 40 pacientes con infarto agudo al miocardio, y 40 muestras de sujetos sanos y 40 de pacientes con infarto, encontrando una distribución genotípica del polimorfismo como sigue:

	n	Glu/Glu	Glu/Asp	Asp/Asp
Control	40	34 (85%)	6 (15%)	0 (0%)
Casos	40	30 (75%)	10 (25%)	0 (0%)

Se obtuvo un tamaño de muestra en base a proporciones, con un valor de α de 0.05, con un valor de β 20%. Para 2 colas

$$n = \frac{(p_1 q_1 + p_2 q_2) (K)}{(p_1 - q_2)^2}$$

Dónde: Substituyendo:

$$\alpha = 0.05$$

$$p_1 = .75$$

n=60 pacientes

$$q_1 = .25$$

por grupo

$$p_2 = .75$$

$$q_2 = .25.$$

$$K = 8.6$$

$$n = \frac{\{(.75)(.25) + (.75)(.25)\} (8.6)}{(.75 - .25)^2} \quad n = 60$$

TOTAL DE PACIENTES: 60 PACIENTES POR GRUPO, TOTAL 120 PACIENTES.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO Los datos se presentaron con medidas de resumen y tablas de frecuencia simple. El análisis entre los grupos se presentó en una tabla, estableciendo un análisis de Odds. Se calculó la frecuencia y se utilizó una ji al cuadrado.

Las variables que resultaron ser significativas y que tuvieron entre sí una alta correlación se sometieron a un análisis multivariado a fin de encontrar la mejor explicación para la variabilidad encontrada.

Todas las pruebas se realizaron con un límite de confianza del 95%.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

Con relación a los aspectos éticos, a todos los pacientes se les explicó

El estudio y se les entregó la hoja de consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio. Se realizó conforme a los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, sobre los Principios Éticos para la Investigación Médica que involucra sujetos humanos, adoptada por la 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki Finlandia 1964, modificada en Tokio, Japón 1975. Este estudio tiene un riesgo menor al mínimo. Se obtuvieron muestras sanguíneas venosas al encontrarse clínicamente con estabilidad hemodinámica. Al obtener muestras sanguíneas venosas se produjo en algunos pacientes una equimosis en el brazo lo cual se controló con presión local. La carta de consentimiento informado se encuentra en el Anexo

RESULTADOS:

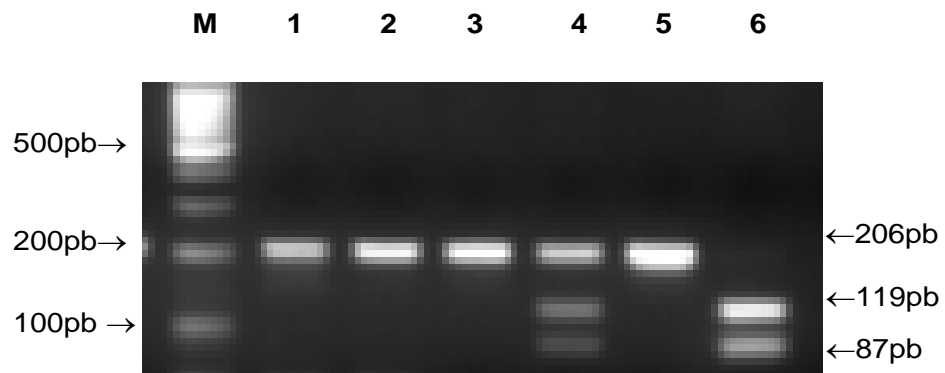
Las características clínicas y demográficas de los pacientes y controles se describen en la tabla 3. Todos los sujetos participantes (pacientes y controles) eran Mestizos- Mexicanos. Se estudiaron un total de 180 pacientes todos ellos menores de 45 años de edad, con diagnóstico de IAMCEST y 180 sujetos sin diagnóstico de IAMCEST pertenecientes al grupo control, los cuales fueron pareados por edad y sexo. El índice de masa corporal fue similar entre ambos grupos ($p=0.50$). La frecuencia de factores de riesgo fue mayor entre el grupo de pacientes, entre los cuales se asociaron diabetes mellitus (28.8% vs. 13.8%, OR 2.52; 95% IC 1.4-4.4, $p=0.001$), hipertensión (36.1% vs. 14.4, OR 3.3; IC 95% 1.9-5.7 $p<0.001$), tabaquismo (70.5% vs. 21.6, OR 6.6; IC 95% 4.0-10-74), $p<0.0001$), dislipidemia (54.4% vs. 21.6%, OR 4.3; 95% IC 2.6-7.0, $p<0.0001$) y el antecedente de historia familiar de enfermedad arterial coronaria (40% vs. 15.5%, OR 3.6; IC 95% 2.1-6.1, $p<0.001$).

En la Tabla 4, se muestran la distribución genotípica del alelo G894T de eNOS y la frecuencia alélica grupo de pacientes y del grupo control. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la distribución genotípica entre los dos grupos ($p=0.001$). En el grupo de los pacientes con IAMCEST 57.8% fue homocigoto para el alelo G, 34.4% fue heterocigoto G/T y 57.8% fue homocigota para el alelo Asp. La distribución genotípica en el grupo control fue de 74.5% de homocigotos, 23.3% heterocigoto G/T y T/T 2.2%. El alelo T fue más frecuente en el grupo de pacientes comprado con el grupo control 25.0% vs 13.8%, $p=0.001$ - El análisis univariado identificó el alelo T como factor de riesgo para IAMCEST (G/T y T/T) comparado con los portadores homocigotos G/G, OR 2.13 (95%IC 1.33-3.41, $p=0.001$).

Para evaluar el impacto del polimorfismo G894T en los pacientes con IAMCEST, se combinaron los sujetos homocigotos T/T y heterocigotos T/G debido a que el genotipo T/T fue muy bajo en ambos grupos.

No se encontraron diferencias significativas entre los portadores de ambos alelos en términos del porcentaje de la fracción de expulsión del ventrículo derecho (FEVI) ($p=0.43$). El alelo homocigoto para G tuvo un valor medio de la

concentración de creatininfosfocinasa 1024 ± 248 U/L, mientras que los portadores del alelo T fue de 1916 ± 316 U/L ($p=0.01$). Los portadores del genotipo G/G tuvieron una concentración menor de troponina I (TnI) de 12.4 ± 9.8 ng/dL, mientras que los portadores del alelo T (T/T+G/T) fue de 19.0 ± 12.6 ng/dL ($p=0.03$). Con respecto al estado inflamatorio, la concentración de fibrinógeno fue mayor en los portadores del alelo T 499 ± 152 mg/dL comparados con los homocigotos para G (G/G), 406 ± 146.7 mg/dL ($p=0.2$). La cuenta leucocitaria de los sujetos portadores del alelo T fue $11,117 \pm 2669$ μ L y 10428 ± 2584 para los homocigotos del alelo G (G/G). No se encontró diferencia en el porcentaje de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) realizadas entre ambos grupos ($p=0.9$) (Tabla 5). El análisis de regresión logística multivariado identificó como riesgos independientes dislipidemia, tabaquismo, el alelo T, hipertensión, historia familiar de enfermedad arterial coronaria (Tabla 6).



DISCUSIÓN

El óxido nítrico posee propiedades anti-aterotrombóticas, por lo que una disminución en su concentración favorece el desarrollo del proceso aterogénico (60). Debido a lo anterior, el gen que codifica para la enzima del óxido nítrico endotelial (eNOS) se ha identificado como un gene involucrado en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria. Diversos estudios han demostrado una correlación entre la presencia del polimorfismo G894T y el desarrollo de enfermedad cardiovascular en diferentes poblaciones (35,40-42, 49, 50, 54,61). Sin embargo, solo pocos estudios se han llevado a cabo en individuos jóvenes, en los cuales el componente genético se ha demostrado es más relevante (35,40). En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la posible asociación entre la presencia de IAMCEST en individuos jóvenes en México. En el presente estudio se identificó que el genotipo TT es un factor de riesgo independiente para el desarrollo prematuro de IAMCEST en los pacientes < de 45 años Mestizos-Mexicanos y más importante el genotipo TT permaneció como riesgo independiente para IAMCEST después de ajustarlo con otros factores de riesgo como diabetes, hipertensión, tabaquismo, dislipidemia e historia familiar para enfermedad cardiovascular. Nuestros resultados son acordes con previos reportes de estudios realizados en sujetos jóvenes, en los cuales se ha demostrado una asociación entre los portadores del genotipo TT y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (40,62). En un estudio de casos y controles pareados por edad y sexo, Antoniades y colaboradores (63), identificaron un incremento en el riesgo para IAM en sujetos portadores del alelo T, y dicho alelo se asoció con la presencia de disfunción endotelial e incremento en la concentración del factor de von Willebrand (FvW) e Interleucina 6 (IL-6). En el presente estudio, los niveles de otra molécula inflamatoria como es el fibrinógeno fueron más altos en los portadores de por lo menos un Alelo T, mientras que no hubo diferencias estadísticas entre la concentración de la cuenta leucocitaria entre ambos grupos. También, el genotipo TT se ha asociado con el desarrollo de enfermedad arterial coronaria en poblaciones Turca (40) y Brasileña (62). Además, en un reciente meta análisis en el cual se incluyeron 26 estudios involucrando 23,028 sujetos, el alelo G894T se asoció con un incremento en el riesgo para enfermedad isquémica coronaria (41). Sin embargo, nuestros

hallazgos, están en desacuerdo con previos estudios que no han podido demostrar una asociación entre el polimorfismo G894T en individuos jóvenes con EAC. En la población Canadiense, Nassar y colaboradores, (60) no identificó asociación entre el polimorfismo G897T y el desarrollo de IAM o angor pectoris. Debemos resaltar, que Nassar y colaboradores, analizaron dos grupos con EAC: uno de ellos con 50 individuos <50 años de edad y el segundo grupo con 149 sujetos >65 años de edad, y se incluyeron pacientes con IAM y angina pectoris. Además, no se analizó una posible interacción entre el afecto adicional entre la presencia del polimorfismo y los factores de riesgo tradicionales.

En otro estudio, Brscic y colaboradores- (64), demostraron que el polimorfismo Glu 298 ASP no representa un factor que incremente el riesgo para IAM, sin embargo este estudio incluye pacientes con y sin elevación del ST. En resumen, ellos muestran que el fumar, la dislipidemia, y la historia familiar de cardiopatía isquémica fueron más frecuentes asociados a pacientes jóvenes, mientras que la diabetes y la hipertensión fueron más frecuentes en los individuos adultos mayores. Por lo tanto, la interacción entre Glu298Asp con los factores de riesgo tradicionales y su influencia en el desarrollo de cardiopatía isquémica debería ser diferente. En el presente estudio los factores de riesgo modificables como tabaquismo, dislipidemia, historia familiar de cardiopatía isquémica e hipertensión arterial, representan factores de riesgo independientes para el infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST.

Algunos estudios han demostrado una fuerte asociación entre el polimorfismo del gene Glu298Asp y el perfil específico del alto riesgo coronario, produciendo un incremento en el riesgo de sufrir cardiopatía isquémica ó infarto agudo al miocardio. El alelo Asp de eNOS ha sido asociado con cardiopatía isquémica en el subgrupo de alto riesgo que incluye individuos diabéticos (42). También Tamañito y cols. (65) demostraron que el polimorfismo Glu298Asp se asocia con el desarrollo de enfermedad isquémica coronaria y diabetes mellitus en la población japonesa. Gulec y colaboradores. (39) demostraron la asociación del alelo t Asp298 con el daño colateral desarrollado en pacientes con diabetes mellitus y estenosis coronaria. En contraste, otros estudios de portadores del polimorfismo en población joven ha fallado en mostrar un incremento en el

riesgo de CAD en individuos in con diabetes. En el presente estudio, no se encontró una asociación independiente entre diabetes mellitus e infarto al miocardio con elevación del segmento ST. La diferencia probablemente es debida a una baja frecuencia de factores de riesgo modificables comparada con los vistos en pacientes de mayor edad. Además, algunos investigadores han descrito un alelo que influye en la cardiopatía isquémica en fumadores. Wang y colaboradores (66) reportaron que el riesgo de enfermedad isquémica coronaria en los fumadores se asocia al polimorfismo eNOS4a/b en el intrón 4 del gen de eNOS. En este estudio, nosotros encontramos un incremento del riesgo de infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST en los portadores de al menos uno de los alelos de Asp y el hábito de fumar. Los resultados del presente estudio son similares a otros estudios previamente reportados en donde existe una asociación entre el polimorfismo Glu298Asp del gen de la eNOS y el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

En contraste, otros estudios no han demostrado que el genotipo 298Asp sea un factor predisponente de aterosclerosis carotídea ó síndromes coronarios agudos (48, 60, 62). Estudios similares en Finlandia (67), Australia (68), Grecia (53) y Corea (69), no encontraron diferencias en la distribución genotípica ó en la frecuencia alélica, entre los pacientes y los controles para el polimorfismo Glu298Asp. Esta discrepancia entre los resultados de los estudios pueden deberse a las diferencias de grupo étnico, edad, tamaño de muestra, los factores genéticos subyacentes y los factores ambientales.

Finalmente, nosotros observamos una distribución genotípica similar a la observada por Rosas-Vargas y cols. (58) en 126 voluntarios Mexicanos-Mestizos: Los homocigotos para el alelo Glu fueron 74.6%, heterocigotos (23.8%), y (1.6%) para el homocigoto para el alelo Asp. Aunque la prevalencia del polimorfismo Glu298Asp difiere entre diferentes grupos étnicos, los subgrupos étnicos se pueden exhibir diferentes tipos de portadores ó susceptibilidad ambiental para enfermedades específicas lo cual puede explicarse por las diferencias étnicas y regionales en el riesgo para infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST. Basados en el hecho de que la enfermedad cardiovascular es una enfermedad multifactorial debe esperarse que un polimorfismo común pueda tener un cierto impacto en enfermedad cardiovascular junto con otros factores de riesgo coronario como

también se ha demostrado no solo en el presente estudio sino también en otros polimorfismos y en el análisis de otras variaciones genéticas como lo muestra el presente estudio (70).

Tabla 3. Características Demográficas y Clínicas de los pacientes con IAMCEST y del grupo CONTROL.

Variable	Pacientes (n=180)	Controles (n=180)	valor de <i>P</i>
Edad, en años	39.3 ±5.3	39.7 ±5.0	NS ^a
Hombre, Mujer (%)	135 (75)	130 (72.2)	NS ^b
IMC (kg/m ²)	29.5± 1.2	28.7 ± 1.7	NS ^a
Diabetes Mellitus n (%)	52 (28.8)	25 (13.8)	<0.001 ^b
Hipertensión n (%)	65 (36.1)	26 (14.4)	<0.001 ^b
Fumar n (%)	127 (70.5)	48 (26.6)	<0.0001 ^b
Dislipidemia n (%)	98 (54.4)	39 (21.6)	<0.0001 ^b
Historia Familiar de CAD	72 (40)	28 (15.5)	<0.001 ^b
Localización del STEAMI%			
Pared anterior	35.9	--	
Pared posterior	62.7	--	
Posterolateral	1.4	--	
Tipo de Infarto%			
Con elevación del segmento ST 100			
Historia de angina	Ausente		

^a t de student para variables continuas; ^bX² o Prueba exacta de Fisher para las proporciones. IMC= Índice de masa corporal

Tabla 4. Genotipo eNOS Glu298Asp y frecuencia alélica para el grupo de pacientes con STEMI y sin STEMI

Genotipo Glu298Asp	Pacientes n= 180	Control n=180	valor de P ^a
Glu/Glu	104 (57.8%)	134 (74.5%)	0.001 ^a
Glu/Asp	62 (34.4%)	42 (23.3%)	
Asp/Asp	14 (7.8%)	4 (2.2%)	
Alelo			
Glu	270 (75.0%)	310 (86.15%)	0.001*
Asp	90 (25.0 %)	50 (13.85%)	

Los datos se presentan como números (%) de pacientes. *Prueba de χ^2

NS=No significativa

Tabla 5. Impacto Clínico de los diferentes alelos en pacientes con IAMCEST

	Glu/Glu	Glu/Asp +Asp/Asp	valor de <i>P</i>
Estimación del tamaño del infarto			
LEVF, %	50.2 ±6.7	48.4±7.4	NS ^a
Creatinfosfoquinasa U/	932± 316	029 ±248	NS ^a
Troponina, ng/dL	13.4± 6.8	19.0± 7.6	0.03 ^a
Estado Inflamatorio			
Leucocitos/ μL	10,428±2,584	1,117±2,669	NS ^a
Fibrinógeno, mg/dL	406±146.7	499±152.2	0.02 ^a

LEFV indica la fracción de eyección del ventrículo izquierdo. PTCA, angioplastia percutánea transluminal

^aPrueba t de student.

^bPrueba χ^2

NS= No significativa

Tabla 6. Análisis de Regresión Logística Múltiple usando IAMCEST como la variable dependiente

Factor de Riesgo	adjOR 95%CI	valor de <i>P</i>
Diabetes Mellitus	1.69 (0.9-3.2)	NS
Hipertensión	2.0 (1.1-3.5)	0.03
Alelo Asp	2.2 (1.1-3.6)	0.03
Tabaquismo	5.0 (3.0-8.2)	<0.001
Dislipidemia	3.4 (2.0-6.3)	<0.001
Historia Familiar de EAC	3.7 (2.0-4.6)	0.02

9. CONCLUSIONES

1. Se identificó al polimorfismo Glu298Asp del gen de la enzima sintasa endotelial del óxido nítrico como factor de riesgo independiente en la población Mexicana con Infarto Agudo del Miocardio.
2. Se identificaron como factores de riesgo asociados al antecedente heredofamiliar de cardiopatía isquémica, tabaquismo, hipertensión y dislipidemia.
3. Se demostró un incremento en el riesgo para Infarto Agudo del Miocardio en los individuos portadores del alelo 298Asp y con antecedente de tabaquismo.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la función endotelial mediante ultrasonido en la arterial humeral.
2. Identificar la posible asociación de otros polimorfismos asociados a enfermedad arterial coronaria en sujetos jóvenes con IAMCEST <45 años.
3. Identificar la posible interacción genética entre el polimorfismo Glu298Asp y otras variantes genéticas.
4. Identificar la interacción entre los factores genéticos y ambientales.

BIBLIOGRAFIA:

1. Senter S, Francis G. A new, precise definition of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-2188
2. American Heart Association. Heart and stroke statistical update. Dallas American Heart Association.2002
3. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Censo Nacional de Población y Vivienda 2007 (México). Available at: <http://www.inegi.org.mx>
4. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med*. 1999;340:115-126.
5. Libby P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Int Med*. 2008;263:517-527.
6. Held C, Hjemdan LP, Rehnquist N. et.al. Haemostatic markers, Inflammatory parameters and lipids in male and female patients in the Angina Prognosis Study in Stockholm (APSIS).A comparison with healthy controls. *Journal of Internal Medicine*.1997;241:59-69.
7. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952.
8. Smith Sc Jr, Greenland P, Grundy SM.AHA Conference Proceeding. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: Identifying the high risk patient for primary prevention: executive summary: American Heart Association. *Circulation* 2000;101:111-116.

9. Giacobbe DJ, Murray MJ, Vascular disease and inflammation. *Anesthesiology Clin. NAM.*2004;22:183-197
10. Tiong AY,Briger DB.Inlammation and coronary artery disease. *American Heart Journal.* 2005;150(1)1840-1848
- 11.-Todd Andersen. "Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelium dysfunction". *Heart Failure Reviews,* 2003;8:71-86
12. Marsden PA, Heng HH, Sherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM; Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial endothelial nitric oxide sythase gene. *J Biol Chem.* 1993;268: 17478-17488.
13. Marletta MA: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* 1994;78:927-930.
14. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase. Role in the genesis of vascular disease. *Ann Rev Med.* 1997; 48:489-509-
15. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43: 109-142.
- 16.- Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet aggregation.. *Br J Pharmacol.*1987; 90: 687-692.
17. Radomki MW, Palamer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endhotelium. *Lancet.* 1987; 2: 1057-1058.
18. Zhihong Y, MD and Xiu-Fen Ming, MD,PhD. "Recent Advances in Understandin Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis". *Clin Med Res;*2006;4(1):53-65
19. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;38: 87-104.

20. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, Tentolouris C, Marinou K, Koumallos N, Stefanadis C. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:1101-1109.
21. Thordarson O, Fridriksson S. Aggregation of deaths from ischemic heart disease among first- and second-degree relatives of 108 males and 42 females with myocardial infarction. *Acta Med Scand* 1977;205:493-500.
22. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata JR, Kirkland SA, Title LM. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J.* 2001;142:586-589.
23. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michael T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1992;89: 6348-6352.
24. Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb.* 1994;14:653-655.
25. Ross G. Familial patterns in ischemic heart disease. *Br J Prev Soc Med.* 1964;19:75-80.
26. Slack J, Evans KA. The increased risk of death from ischemic heart disease in first degree relatives of 121 men and 96 women with ischemic heart disease. *J Med Genet* 1966;3:329-357.
27. Jorde LB, Williams RR. Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variables. *Am J Cardiol.* 1988; 62:708-713
28. Rissanen AM. Familial occurrence of coronary artery disease: Effect of the age at diagnosis. *Am J Cardiol.* 1988;62:708-713.

29. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in study of twins. *N Eng J Med.* 1999; 340: 1555-1564.
30. Harvald B Hauge. Coronary occlusion in twins. *Acta Genet Med Gemellol.* 1979; 19: 248-250.
31. Isordia-Salas I, Mendoza Valdez AL, Almeida Gutierrez E, Borrayo-Sánchez G. Factores genéticos del sistema hemostático en pacientes jóvenes con infarto del miocardio. 2010;78:93-97.
- 32.- Jeffery S, Poloniecki J, Lestham E, Bevan D, Ireson N, Talbot S, Cole D, Kaski JC. A protective contribution of the Q allele of the R353Q polymorphism of the factor VII gene individuals with chronic stable angina?. *Int J Cardiol.* 2005;200: 395-399.
33. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genetic.* 1995; 10: 111-113.
34. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, et al. A common variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu 298-Asp) Is a Major Risk factor for Coronary Artery Disease in the UK Circulation. 1999; 100:1515-1520.
35. Gardemann A, Lohre J, Cayci S, et al. The Allele of the missense Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with atherosclerotic risk profile. *Atherosclerosis.* 2002;160:167-175
36. Jones L C, Hingorani. Genetic regulation of endothelial function. *Heart.* 2005;91:1275-77
37. Fatini C, Sofi F, Gori AM, Sticchi M, Marcucci R, Lenti M, Casini A, Surrenti C, Abbate R and Gensini GF. "Endothelial nitric oxide synthase -786>C, pero no 894G>T and 4^a4b, polymorphism influences plasma homocysteine concentrations in persons with vitamin status". *Clin Chem;*2005; 51:1159-1164.

38. Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, Versari D, Sudano I, Pessina AC, Salvetti A. The T786C and Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow blood flow response of Caucasian hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:938-945.
39. Gulec S, Karabulut H, Ozdemir AO, Ozdol C, Turhan S, Altin T, Tutar E, Genc Y, Erol C. Glu298Asp polymorphism of the eNOS gene is associated with coronary collateral development study. [Atherosclerosis](#) 2008;198:354-359.
40. Cam SF, Sekuri C, Tengiz I, Ercan E, Sagcan A, Akin M, Berdeli A. The G894T polymorphism on endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature coronary artery disease in a Turkish population. *Throm Res.* 2005; 116: 287-292.
41. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase genotype and heart disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23 038 subjects. *Circulation* 2004;109:1359-1365.
42. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998;32:521-526.
43. Berdeli A, sekuri C, Sirri Cam F, Ercan E, Sagcan A, tengiz I, Eser E, Akin M. Association between the eNOS (Glu298Asp) and the RAS genes polymorphism and premature coronary artery disease in a Turkish population. *Clin Chim Acta.*2005;351:87-94.
44. Philip I, Plantefevre G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmonts JM, Durand G, Benessiano J. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 1999; 99:3096-3098.
45. Kerkeni, Addad F, chauffert M, Myara A, Ben Farhat M, maaroufi K, Trivin F. Hyperhomocysteinemia, endothelial nitric oxide synthase

polymorphism, and risk of coronary artery disease. Clin Chem 2006;52: 53-58

46. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. Hypertension. 1998; 32: 3-8.

47. Cai H, Wilcken DE, Wang XL. The Glu298Asp (894G-T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. J Molec Med. 1999; 77: 511-514.

48. Hingorani AD, Lianf CF, Fatibene J. A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease. Circulation. 1999; 100: 1515-1520.

49. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa H, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1998;31:1506-1510.

50. Suzuki T, Okumura K, Sone T, Kosokabe T, Tsuboi H, Kondo J, Maka H, Kamiya H, Tomida T, Imai H, Matsui H, Hayakawa T. The Glu298Asp polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary in-stent restenosis. Int J Cardiol. 2002; 39: 919-922.

51. Yoshimura MH, Yasue M, Nakayama. A Missense Glu298Asp variant in the Endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. Hum Genet. 103:65-69.

52. Andrikopoulos GK, Grammatopoulos DK, Tzeis SE, et al. Association of the 894>T polymorphism in the endothelial nitric oxide

synthase gene with risk of acute myocardial infarction. *BMC Medical Genetics*.2008;9.1-6.

53. Vasilakou M, Votteas V, Kasparian C, Pantazopoulos N. et.al. Lack of association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of premature coronary artery disease in the Greek population. *Acta Cardiol*, 2008;63(5):609-14

54. Colombo MG, Paradosi U, Andreassi MG. Et.al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Coronary Artery Disease. *Clinical Chemistry*.2003;49(3):389-395

55. Malhotra S, Poole J, Davis H. et. Al. Effects of NOS3 Glu 298Asp Polymorphism on Hemodynamic Reactivity to Stress: Influences of Ethnicity and Obesity. *Hypertension*.2004;44:866-871

56. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE. Et.al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Cardiovascular Disease: A Huge Review. *American journal Epidemiology*.2006;164(10):921-935.

57. Granath B, Taylor RR, Van Bockxmeer FM. Et. Al. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk*. 2001;8(4):235-41

58. Rosas-Vargas H, Flores-Segura A, Guizada-Claire B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in the Indian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol*. 2003;75:91-96.

59. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease. *Circulation*. 2004;109:1359-1365.

60. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA, Title LM. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J* 2001;142:586-589.

61. Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, Rossi G, Clerico A, Biagini A. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu298-->Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart* 2002;87:525-528.
62. Sampaio MF, Hirata MH, Hirata RD, Santos FC, Picciotti R, Luchessi AD, de Quateli Doi S, Armaganijan D, Batlouni M. AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults. *Clin Chim Acta* 2007;377:154-162.
63. Antoniadou C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Pitsavos C, Chrysochoou C, Panagiotakos D, Tentolouris C, Marinou K, Koumallos N, Stefanadis C. Genetic polymorphism on endothelial nitric oxide synthase affects endothelial activation and inflammatory response during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1101-1109.
64. Brscic E, Bergerone S, Gagnor A, Colajanni E, Matullo G, Scaglione L, Cassader M, Gaschino G, Di Leo M, Brusca A, Pagano GF, Piazza A, Trevisan G. Acute myocardial infarction in young adults: prognostic role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type I receptor, apolipoprotein E, endothelial constitutive nitric oxide synthase, and glycoprotein IIIa genetic polymorphisms at medium-term follow-up. *Am Heart J* 2000;139:979-984.
65. Tamemoto H, Ishikawa SE, Kawakami M. Association of the Glu298Asp polymorphism of the eNOS Gene with ischemic heart disease in Japanese diabetic subjects. [Diabetes Res Clin Pract](#) 2008;80:275-279.
66. Wang CL, Hsu LA, Ko YL, Lee YH. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. *J Formos Med Assoc.* 2001, 100:736-740-
67. Karvonen J, Kauma H, Kervinen K, Rantala M, Ikäheimo M, Päivänsalo M, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Endothelial nitric oxide

synthase gene Glu298Asp polymorphism and blood pressure, left ventricular mass and carotid artery atherosclerosis in a population-based cohort. *J Intern Med* 2002;251:102-110.

68. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk* 2001;8:235-241.

69. Kim IJ, Bae J, Lim SW, Cha DH, Cho HJ, Kim S, Yang DH, Hwang SG, Oh D, Kim NK. Influence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) in Korean patients with coronary artery disease. [Thromb Res.](#) 2007; 119:579-585.

70. Isordia-Salas I, Leños-Miranda A, Sainz IM, Reyes-Maldonado E, Borrayo-Sánchez G. Association of the plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism with ST elevation acute myocardial infarction in young patients. *Rev Esp Cardiol* 2009;62:365-372.

ANEXO 1

CRITERIOS PARA INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO CON ELEVACION DEL SEGMENTO ST

Con infarto agudo al miocardio, definido por la Organización Mundial de la Salud sobre la base de estudios de prevalencia, mediante la presencia de por lo menos 2 de los siguientes criterios: (17)

- 1) Dolor torácico sugestivo de isquemia típico ó atípico:

Dolor torácico en reposo o ejercicio, típico de isquemia a atípico con duración mayor ó igual a 20 minutos. El dolor típico es retro esternal, opresivo e irradia al hombro y al brazo izquierdo, El atípico se puede observar en epigastrio, espalda. La intensidad es variable, desde muy intenso hasta una molestia leve. En adultos mayores puede ser remplazado por equivalentes de isquemia, como disnea, fatiga, lipotimia ó síncope. La activación del sistema simpático (sudoración, palidez náusea y vómito es un elemento clínico muy importante)

- 2) Cambios electrocardiográficos característicos:
- Cambios electrocardiográficos: Elevación del ST en el electrocardiograma ≥ 0.1 mV en al menos 2 derivaciones concordantes en las derivaciones precordiales y ≥ 0.2 mV en al menos 2 derivaciones concordantes en las derivaciones bipolares.
- 3) Incremento de biomarcadores de necrosis miocárdica;
- Troponina T, incremento del valor normal determinado al menos una vez dentro de las primeras 24 hrs de iniciados los síntomas y que su nivel exceda a la percentila 99.

- Creatina-fosfoquinasa (CK), y su componente ligado al miocardio (CK-MB), por arriba de los valores de referencia en 2 muestras sucesivas, o > 2.0 veces el valor de referencia en una muestra durante las primeras horas del evento. Los niveles de CK-MB deben producir una curva de ascenso y descenso, deshidrogenasa láctica. (DHL).

- **ANEXO 2**

Extracción de la muestra sanguínea: Se extraerá de la vena antecubital 10 mL de sangre total en tubos que contienen EDTA (0.17 M). Este será centrifugado a 3500 g por 15 minutos. Posteriormente el plasma sobrenadante es retirado cuidadosamente tratando de no perturbar la capa de células mononucleares (Buffy coat) la cual será transferida con una pipeta de plástico estéril a un tubo de plástico eppendorf estéril de 1.5 mL libre de enzimas (RNasas y DNasas) que será utilizado para la obtención de ADN.

Extracción de ADN: Se usó el equipo comercial (Qiagen QIAampDNA Mini Kit) de acuerdo con las instrucciones establecidas por la compañía. Una vez extraído el DNA, se conserva a -70°C, hasta que se utilizó para la amplificación de los segmentos correspondientes.

Genotipificación de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial:

Posterior a la extracción del ADN, se llevará a cabo la reacción de PCR con el uso de oligonucleótidos específicos (sentido) 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' y (contrasentido) 5'AGTCAATCCCTTTGGTGGTCAC-3'.

Se usaron: 200 ng de ADN, 10 pM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP, 3 mM de cloruro de magnesio, 1.0 U de *pfu* DNA polimerasa, en un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones térmicas consisten en: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineación a 60°C por 30 segundos y una extensión a 72 °C por 30 segundos, por un total de 30 ciclos.

Identificación de fragmentos polimórficos: El producto obtenido de la PCR (206 pb), será sometido en partes iguales a digestión con las enzimas de restricción *BanII* y *Mbo* I respectivamente durante 16 h a 37°C. El producto de 206 pb, bajo la acción de la enzima *BanII*,

producirá 2 fragmentos: uno de 124 pb y uno menor de 82 pb ante la presencia de un nucleótido G en la posición 894 (correspondiente al alelo Glu298); mientras que en la segunda reacción del mismo producto de 206 pb, con la acción de la enzima *MboI*, generará también 2 fragmentos, uno de 119 pb y uno de 87 pb en la presencia de un nucleótido T en la misma posición 894, el cual corresponde a un alelo Glu298Asp. Los productos obtenidos de la restricción, serán visualizados a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% y teñidos con bromuro de etidio.

ANEXO 3

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMR

SERVICIO DE ADMISION CONTINUA

Por medio de la presente yo
_____ acepto participar

en el protocolo de investigación titulado: **"ASOCIACION DEL POLIMORFISMO G894T EN EL GENE DE LA ENZIMA SINTASA DEL OXIDO NITRICO ENDOTELIAL (eNOS) CON EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO"** Me ha sido explicado ampliamente el procedimiento y que no implica ningún riesgo para mi padecimiento y autorizo a la Dra. Irma Isordia Salas y colaboradores para que me tomen una muestra de sangre de 10 mL, para determinar la presencia de dichos polimorfismos mediante técnicas de biología molecular. Esta investigación formará parte del estudio integral de mi padecimiento, conozco también de manera precisa la gravedad de mi enfermedad participando de manera voluntaria, y en caso de negarme, dicha decisión no repercutirá para nada en mi tratamiento.

Se me ha explicado también que no recibiré remuneración económica alguna por participar en este estudio.

Firmo de conformidad.

Paciente

Domicilio _____

Lugar y Fecha _____

Testigo _____

Testigo _____