



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DEL SERVICIO SOCIAL

Determinación de dos polimorfismos (Glu298Asp, Intrón 4ab) en el gen de la sintasa del óxido nítrico en pacientes con trombosis venosa cerebral y en una muestra de la población normal mexicana.

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

ALUMNA:
Dení Hernández Bello

MATRÍCULA:
201228653

ASESORES:

Asesor interno: Dra. Marisol López López
Prof. Titular “C” TC
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco

Asesor externo: Dr. Aurelio Jara Prado
Departamento de Genética

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

LUGAR DE REALIZACIÓN:

Laboratorio N-103 Genética Molecular, Departamento Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco/
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”
Departamento de Genética y Biología Molecular

FECHA DE INICIO Y TERMINACION: Inicio 1 de agosto del 2005, terminación 26 de mayo del 2006

Marzo, 2024

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) por haberme permitido realizar mi tesis.

Al Dr. Aurelio Jara por considerarme parte de su equipo de trabajo y brindarme todos sus conocimientos.

A la Dra. Marisol López López por abrirme las puertas al mundo de la neurobiología, así como compartirme sus conocimientos en el transcurso de la Licenciatura.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	7
2	MARCO TEÓRICO	10
2.1	Enfermedades cerebrovasculares.....	10
2.2	Isquémica	12
2.3	Hemorragia intracraneal.....	15
3	TROMBOSIS VENOSA CEREBRAL.....	17
3.1	Anatomía.....	20
3.2	Fisiopatología.....	21
3.3	Factores de riesgo no genéticos	23
3.4	Factores de riesgo genéticos.....	23
3.5	Epidemiología en México.....	25
3.6	Diagnóstico y tratamiento.....	27
4	ENDOTELIO.....	28
5	BIOLOGÍA MOLECULAR.....	32
5.1	Nucleótidos y ácidos nucleicos (DNA).....	32
5.2	Replicación del DNA	¡Error! Marcador no definido.
5.3	Mutaciones	34
5.4	Polimorfismos	37
6	ÓXIDO NÍTRICO.....	40
7	SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO	43
8	SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL.....	48
8.1	Polimorfismos de la eNOS	53
8.2	Polimorfismo intrón 4ab 27 VNTR (número variable de repeticiones en tándem) del gen <i>NOS3</i>	53
8.3	Polimorfismo G894T del gen <i>NOS3</i>	55
9	JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	57
10	HIPÓTESIS	58
11	OBJETIVOS.....	58
11.1	Objetivo general	58
11.2	Objetivos específicos	58
12	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
12.1	Estrategia experimental.....	59

12.2	Listas de materiales, equipo y reactivos.....	60
12.3	Sujetos de estudio Recolección de muestras control y lisis celular	62
12.4	Lisis celular	63
12.5	Extracción de DNA por sales (micrométodo).....	64
12.6	Cuantificación del DNA	64
12.7	Determinación de los polimorfismos por PCR	65
13	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	69
14	RESULTADOS.....	70
14.1	Relación del polimorfismo G894T en pacientes con TVC	70
14.2	Relación del polimorfismo del intrón 4ab con la TVC.....	72
15	DISCUSIÓN.....	74
16	OBJETIVOS y METAS ALCANZADAS	76
17	CONCLUSIONES.....	77
18	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Frecuencia de los subtipos de enfermedad cerebrovascular
- Figura 2.** Anatomía de los principales senos venosos.
- Figura 3.** Fisiopatología de trombosis venosa cerebral.
- Figura 4.** Distribución de los estudios e incidencia de TVC en América Latina
- Figura 5.** Variaciones morfológicas del endotelio
- Figura 6.** Estructura de un nucleótido
- Figura 7.** Enlaces que conforman un nucleótido
- Figura 8.** Representación gráfica de una serie de nucleótidos
- Figura 9.** Tipos de mutaciones
- Figura 10.** Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma.
- Figura 11.** Estructura química del óxido nítrico (modelo de Lewis).
- Figura 12.** Estructura de los dominios de la nNOS, eNOS y la iNOS.
- Figura 13.** Producción biológica de NO catalizada por la NOS.
- Figura 14.** Esquema del gen que codifica la eNOS
- Figura 15.** Activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) con calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ y sin $[Ca^{2+}]_i$
- Figura 16.** Polimorfismo 4a/4b VNTR.
- Figura 17.** Polimorfismo Glu298Asp.
- Figura 18.** Expresión del polimorfismo Glu298Asp en el exón 7 del gen eNOS
- Figura 19.** Expresión del polimorfismo VNTR en el intrón 4 de el gen de la eNOS

1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad cerebrovascular (EVC) es un déficit neurológico que se puede presentar por diversas razones como alteraciones de la pared vascular, por un émbolo o un trombo, por rotura de un vaso, por un cambio en la permeabilidad de la pared o por cambios de la viscosidad (Ropper, 2000).

La EVC se puede diferenciar en función de la lesión, ya sea isquémica o hemorrágica. La isquémica se debe a la falta de irrigación sanguínea y puede presentarse un infarto cerebral. Esto va a depender del tiempo en que transcurra el accidente cerebrovascular, si este es menor a 24 horas solo se le denomina trastorno isquémico transitorio (TIA), si es mayor a 24 horas es un infarto cerebral. La EVC hemorrágica se da por una rotura de un vaso, y se divide en dos tipos intracraneal y subaracnóidea. La EVC que se presenta con mayor frecuencia es la isquémica con 80%, y la hemorrágica con un 20% .(Ropper, 2000).

Existe otro accidente cerebrovascular que representa solo de un 0.5 al 1%, y es la Trombosis venosa cerebral (TVC), que es una entidad de baja incidencia al igual que su información. La TVC puede presentarse a cualquier edad, pero se presenta con mayor frecuencia en las mujeres debido a los factores de riesgo como los anticonceptivos hormonales, el embarazo, la terapia de remplazo hormonal, el puerperio e infecciones locales (Ropper et al., 2000).

Las EVC representan la segunda causa de muerte a nivel mundial. En México es un problema de salud que ocasiona elevadas cifras de mortalidad y son una causa importante de incapacidad permanente que consume importantes recursos económicos (Nieto de Pascual, 2003).

Aunque se conocen factores de riesgo como hipertensión, cardiopatía, diabetes, tabaco y alcohol, entre otras, los cuales pueden prevenirse, los accidentes cerebrovasculares aún siguen siendo las causas principales de ingresos en los servicios de urgencias en hospitales. (Caplan et al., 2009).

Por otro lado, los factores genéticos constituyen una posible fuente de variación individual en el riesgo del accidente cerebrovascular, por lo tanto, el estudio de la genética de los factores de riesgo del EVC puede reducir la complejidad de las relaciones genotipo-fenotipo

y proporcionar una mejor capacidad para detectar los genes que generan la susceptibilidad (Rowland, 2011).

Se ha mostrado una incidencia entre la relación de las enfermedades coronarias, con la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) (Tran et al., 2022; Oliveira-Paula et al., 2016; Li et al., 2015). El óxido nítrico (NO) es una molécula mensajera que en un principio fue considerado como el factor relajante derivado del endotelio desde 1988 por Moncada (Centelles et al., 2004). El NO desempeña un papel importante en procesos fisiológicos como la liberación de hormonas, la señalización y la regulación de la neurotransmisión no colinérgicas y noradrenérgicas relacionadas con la memoria y aprendizaje, la neuroprotección y la plasticidad sináptica, regula la transcripción génica y la traducción del RNAm; también regula la homeóstasis vascular, ya que es un potente vasodilatador endógeno y, por lo tanto, controla el tono vascular. El NO es un factor importante en las propiedades antiateroscleróticas del endotelio, inhibe la agregación plaquetaria, regula la proliferación y migración del músculo liso, y tiene efectos antitrombóticos (Silvis et al., 2017)

El óxido nítrico (NO) es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina como sustrato por una familia de enzimas denominadas sintasas del óxido nítrico (NOS). Se han reportado tres isoformas de las NOS: dos isoformas constitutivas dependen de calcio Ca^{2+} y calmodulina, la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS o NOS3) se localiza principalmente en la membrana de células endoteliales de vasos sanguíneos, en células cardíacas, epiteliales y en ciertas neuronas; la otra isoforma constitutiva es la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS ó NOS1) que se encuentra principalmente en neuronas tanto en el cerebro como en la médula espinal y suprarrenal y por último una isoforma inducible independiente de Ca^{2+} y calmodulina (iNOS o NOS2) identificada en el citosol de algunas células que participan en la respuesta inmune como macrófagos y células endoteliales inducidas por endotoxinas o citocinas. (Zhao et al., 2014; Monti et al 2003; Vaca-Villanueva et al., 2021).

El gen *NOS3* que codifica para la eNOS, se encuentra en el cromosoma 7q35-36, y está conformado por 26 exones que codifican para una proteína de 123kDa con 1203 aminoácidos, que es una enzima homodimérica (Vaca-Villanueva et al., 2021).

Se han informado asociaciones con variantes genéticas en el gen de la eNOS con enfermedades cardiovasculares, hipertensión, angina espástica coronaria, infarto al miocardio y accidentes cerebrovasculares. Las más estudiadas son la variante “T-786C que se localiza en la región promotora de la transcripción, la variante eNOS 4ab que se encuentra

en el intrón 4 y está relacionada con la alteración de la actividad del promotor, y la variante *G894T* localizada en el exón 7 que codifica el cambio de un aminoácido glutamato a aspartato (Glu894Asp)”(Ksiazek et al., 2003, Jiménez-González et al., 2021; Seckin et al., 2016).

El objetivo de este trabajo fue determinar la posible asociación de dos polimorfismos de la eNOS con la trombosis venosa cerebral y su frecuencia en la población mexicana normal.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades cerebrovasculares

La enfermedad cerebral vascular EVC representa un importante problema de salud pública ya que se sitúa entre las cuatro primeras causas de mortalidad en la mayoría de los países y es responsable de un elevado porcentaje de la carga de los trastornos neurológicos. La EVC es la principal causa de incapacidad neurológica grave y genera un enorme costo, tanto de forma directa en atención sanitaria como derivado de la pérdida de productividad. Se han hecho grandes progresos en la comprensión de la epidemiología, etiología y la patogenia, que han conducido a nuevos métodos de diagnóstico y tratamiento (Rowland, 2011).

El término *enfermedad cerebrovascular o accidente cerebrovascular* designa cualquier anomalía del cerebro (Caplan et al., 2009), consecuencia de un proceso patológico de los vasos, que incluyen la oclusión del interior por un émbolo o un trombo, la rotura de un vaso, alteraciones en la permeabilidad de la pared vascular o incrementos en la viscosidad de la sangre u otros cambios en sus características, que fluye por los vasos cerebrales (Ropper, 2000). Se debe pensar en un cuadro patológico vascular no solo en sus aspectos más generales o macroscópicos (embolia, trombosis, disección o rotura de un vaso) sino en términos del trastorno básico o primario (ateroesclerosis, cambios arterioescleróticos por hipertensión, arteritis, dilatación aneurismática y malformaciones surgidas en el desarrollo) (Ropper, 2000). Dependiendo de su naturaleza, la enfermedad vascular cerebral se puede representar como isquémica, hemorrágica o como trombosis venosa cerebral con una proporción en torno al 85% , 15% y 5% respectivamente, existen varios subtipos. La isquémica se divide en varios subtipos (Figura 1) según el mecanismo y la función del tipo, así como la localización de la lesión vascular. La isquemia se produce por una disminución del aporte sanguíneo cerebral de forma total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). Según la duración del proceso isquémico focal se presentará como isquemia cerebral transitorio (AIT) o como infarto cerebral, en función de que el déficit isquémico se revierta o no antes de 24 horas (Ropper, 2000; Arauz-Antonio, 2012).

La hemorragia intracraneal puede subdividirse en varios tipos o clasificaciones según la

localización y el origen vascular de la sangre: subaracnoidea, cuando la hemorragia se origina en los espacios subaracnoideos que rodean el cerebro e intracerebral, cuando la hemorragia se produce en el interior de la sustancia o parénquima del cerebro. Ahora bien, existen otros tipos de hemorragia intracraneal como, por ejemplo, la subdural y la epidural, los cuales son asociados normalmente a un traumatismo (Ropper, 2000). Hay que considerar que el término *ictus* representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen el infarto y las hemorragias cerebrales. *Ictus* es un término latino, que al igual que su correspondiente Stroke que significa golpe, describen el carácter brusco y súbito del proceso. (Ropper, 2000, Caplan et al., 2009; Arauz-Antonio, 2012).

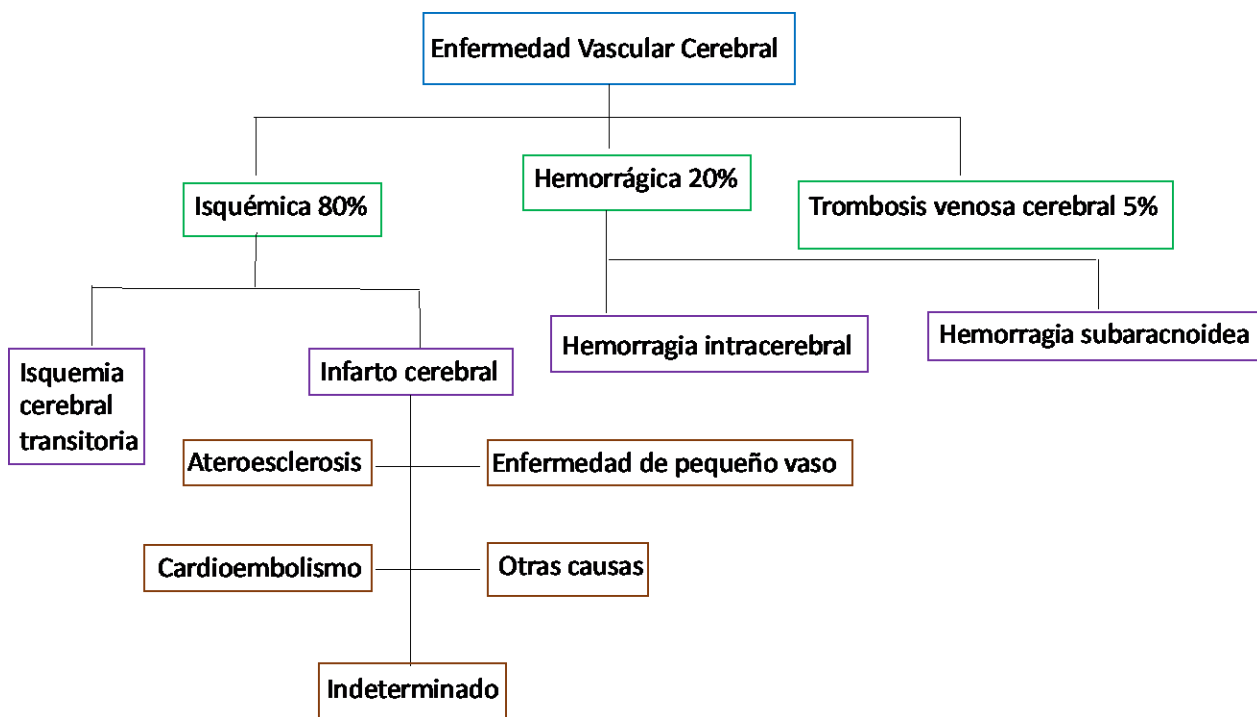


Figura 1. Frecuencia de los subtipos de enfermedad cerebrovascular (Tomado de Arauz A y Ruiz-Franco A. 2012)

2.2 Isquémica

Patogenia y clasificación de las EVC

- *Infarto cerebral*

La disfunción cerebral se produce con valores de flujo sanguíneo cerebral inferiores a 50 mg/dl y la lesión neuronal irreversible comienza por debajo de 30 mg/dl. Cuando el flujo sanguíneo se interrumpe totalmente durante 30 segundos, el metabolismo cerebral se altera; después de 1 minuto la función neuronal cesa. Transcurridos 5 minutos desde la interrupción, la anoxia inicia una cadena de fenómenos que puede dar lugar a un infarto cerebral; sin embargo, si el flujo de sangre oxigenada se restablece con eficaz rapidez, la lesión es reversible, como sucede en el AIT (Ropper, 2000; Caplan et al., 2009).

Interesantes estudios sobre las consecuencias celulares de la isquemia han permitido dilucidar la cascada isquémica. Una cascada de fenómenos a escala neuronal conduce a la disfunción y muerte celular, que comienza con la bomba de sodio/potasio (Na^+/K^+), la despolarización de la membrana neuronal, la liberación de neurotransmisores estimuladores y la apertura de los canales de calcio, la entrada de calcio produce mayor lesión neuronal, con daño de los organelos y aumento de la desestabilización del metabolismo neuronal y de la función normal. El calcio penetra en la neurona a través de diversos canales sensibles al voltaje y mediados por receptores (*N*-metil-D-aspartato). Los neurotransmisores estimuladores, como el glutamato y la glicina, pueden aumentar la entrada de calcio a través de estos canales. Estos fenómenos pueden conducir a la muerte neuronal retardada y son el objetivo principal de diversas estrategias de neuroprotección. La penumbra isquémica se ha definido como la región del cerebro que rodea la zona central de un infarto, donde la función neuronal está alterada, pero se puede recuperar (Rowland, 2011., Arauz-Antonio, 2012).

Un gran número de mecanismos pueden producir la isquemia cerebral. El infarto hemodinámico se origina como consecuencia de un impedimento a la perfusión normal cuya causa es, por lo general, una estenosis arterial intensa o la oclusión producida por aterosclerosis y trombosis coexistente. La embolia tiene lugar cuando una partícula de un trombo de origen más proximal se traslada a lo largo del sistema vascular y produce una oclusión arterial. Afecciones menos frecuentes que disminuyen la perfusión cerebral y

producen, como resultado un infarto, son la disección de la aorta, la vasculitis primaria o secundaria, la hipercoagulación, el vasoespasmo, la hipotensión sistémica, la hiperviscosidad, la enfermedad de moyamoya, la displasia fibromuscular, la compresión extrínseca de las arterias mayores por un tumor y la oclusión de las venas que drenan el cerebro. Los principales cuatro subtipos más frecuentes de isquemia cerebral son: aterosclerosis de grandes vasos; el cardioembólico, el de pequeños vasos (lacunar) y el criptogénico (Ropper, 2000., Rowland, 2011).

- *Infarto aterosclerosis de los grandes vasos*

La placa aterosclerótica en una bifurcación o en la curva de un vaso de gran calibre produce estenosis progresiva y la oclusión final de la arteria por trombosis o estrechamiento de la luz vascular. La placa aterosclerótica se puede formar en cualquier punto a lo largo de la arteria carótida y del sistema vertebrobasilar, pero su localización más frecuente son la bifurcación de la carótida (Ropper, 2000, ; Rowland, 2011).

La isquemia se atribuye al fracaso de la perfusión distal al lugar de una estenosis intensa u oclusión del vaso mayor. La estenosis u oclusión aterosclerótica también puede dar lugar a infarto cerebral a través de un mecanismo de embolia. En este caso, los émbolos procedentes de lesiones ateromatosas proximales ocluyen ramas más distales (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

- *Cardioembolia*

Muchos *ictus* causados por embolias se originan a partir de un trombo cardíaco. Una pequeña partícula de trombo se desprende y se traslada por la circulación hasta que se aloja en una arteria demasiado pequeña para permitir su paso. Además de trombo, otros tipos de partículas que pueden producir émbolos son los tumores, la grasa y otras sustancias extrañas. Las fuentes más frecuentes de cardioembolia son: las valvulopatías, los trombos intracardiacos, un aneurisma ventricular o septal, y miocardiopatías que producen estancamiento de la sangre y aumento de la propensión a la formación de trombos intracardiacos (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

- *Infarto lacunar de pequeños vasos*

Estos ictus ocasionan síndromes clínicos característicos, con una pequeña zona de isquemia limitada al territorio de un solo vaso. Los principales síndromes clínicos del *ictus* lacunar son: la hemiparesia motora pura, el síndrome sensitivo puro, la disartriamano torpe, la hemiparesia atáxica y el síndrome sensitivomotor. Estos síndromes se aprecian por la afectación de funciones neurológicas elementales y por la relativa preservación de funciones corticales superiores, como la atención y el lenguaje, algunos casos de infarto de pequeños vasos pueden incluir cambios cognitivos como rasgo principal (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

- *Infarto criptogénico*

En estos casos, en los que el mecanismo del infarto es desconocido, se denominan infartos de causa no determinada o infartos criptogénicos. Los casos clasificados como infarto criptogénico no tienen lesión estenótica arterial en el territorio del *ictus*; tampoco historia clínica ni resultados de laboratorio indicativos de cardioembolia clara y no presentan habitualmente síndrome lacunar (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

- *Ataque isquémico transitorio (AIT)*

Se denomina ataque o accidente isquémico transitorio (AIT) a la aparición de síntomas neurológicos de origen isquémico que dura menos de 24 horas, de hecho, la mayoría de los ataques solo duran de unos minutos a una hora. La causa de la isquemia transitoria puede ser un flujo distal bajo si el flujo colateral es insuficiente; las AIT suelen ser breves y estereotipadas. La AIT puede reflejar la afectación de prácticamente cualquier arteria cerebral: carótidas primitivas o interna, arterias cerebrales media, posterior o anterior, arteria oftálmica, arteria vertebral, tronco basilar o arteria cerebelosa o una rama penetrante a la cápsula interna, el tálamo o el tallo encefálico. Pueden aparecer intrínsecamente como crisis transitorias de hemiparesia, afasia, insensibilidad u hormigueo en una mitad del cuerpo, disartria, diplopía, ataxia, oscurecimiento de un campo visual o todas las combinaciones, en que se duplican los síndromes de enfermedad cerebrovascular. (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

La AIT puede aparecer o acompañar después de que apareció y evolucionó una enfermedad cerebrovascular o puede surgir intrínsecamente sin culminar en un accidente de este tipo, hecho que dificulta la valoración de cualquier forma de tratamiento (Ropper, 2000; Rowland, 2011).

2.3 Hemorragia intracraneal

La hemorragia intracraneal se produce como consecuencia de la rotura de un vaso en cualquier lugar de la cavidad craneal. La hemorragia intracraneal se clasifica según su localización, la naturaleza del vaso o los vasos afectados (Ropper, 2000, p.746; Rowland, 2011).

- *Hemorragia cerebral*

La hemorragia cerebral se caracteriza por sangrado en el interior de la sustancia cerebral, cuyo origen es habitualmente una arteria penetrante de pequeño calibre. Se considera que la hipertensión es la causa de la debilidad de la pared de las arteriolas y de la formación de microaneurismas. Otras causas son: mal formaciones arteriovenosas, aneurismas, enfermedad de moyamoya, trastornos hemorrágicos o la administración de anticoagulantes, traumatismos, tumores, angiomas cavernosos y drogadicción. Las localizaciones más frecuentes de hemorragias arterial son el putamen, el caudado, la protuberancia, el cerebelo, el tálamo o la sustancia blanca profunda. La hemorragia puede continuar durante varias horas después de su inicio y, por consiguiente, los hematomas se pueden extender. Si el paciente sobrevive a una hemorragia cerebral, los fagocitos eliminan la sangre y el tejido necrótico cerebral. El tejido cerebral destruido se sustituye parcialmente por tejido conectivo, glía y vasos sanguíneos neoformados, lo que da lugar a una cavidad encogida llena de líquido. (Ropper, 2000; Caplan et al., 2009; Rowland, 2011.)

- *Hemorragia subaracnoidea*

La hemorragia subaracnoidea se produce cuando la sangre se localiza alrededor de las membranas y en el líquido cefalorraquídeo.

La causa principal es la fuga de sangre a partir de un aneurisma cerebral; estos se pueden distribuir en diferentes lugares por toda la base del cerebro, en particular en el origen o la bifurcación de las arterias del polígono de Willis. Entre otras causas están las malformaciones arteriovenosas, trastornos hemorrágicos o la administración de anticoagulantes, traumatismos, vasculopatía amiloidea o trombosis del seno central. Los signos y síntomas incluyen la aparición brusca de cefalea muy intensa, vómitos, alteración de la consciencia y, algunas veces, coma; estas características suceden con frecuencia sin signos de localización focal (Ropper, 2000, p.746; Caplan et al., 2009; Rowland, 2011, p.250).

La hemorragia subaracnoidea se presenta en pacientes más jóvenes y con mayor frecuencia en mujeres. Algunos de los factores desencadenantes pueden ser los anticonceptivos orales, la hipertensión y el tabaco entre un 30% hasta un 70% esto depende de la gravedad del cuadro inicial (Ropper, 2000; Caplan et al., 2009; Rowland, 2011).

3 TROMBOSIS VENOSA CEREBRAL

Se le llama trombosis cuando un paciente presenta un coágulo (trombo) que impide la circulación sanguínea.

La trombosis venosa cerebral (TVC) se describió por el médico francés Ribes en 1825 a través de una autopsia de una mujer de 45 años la cual presentaba cefalea intensa, crisis tónico-clónicas generalizadas y delirio; afectando el seno sagital superior y senos laterales. Más adelante John Aberrombie en 1828 reporta la primera trombosis en una mujer de 24 años que presentó cefalea intensa, crisis convulsivas dos semanas después del parto, afectando el seno sagital superior y las venas anastomóticas corticales. En los años 60 Krayenbuhl y colaboradores publicaron 92 casos de TVC donde el 40 % se atribuyeron a infección y el 55 % de causa no infecciosa, de los cuales 17 casos fueron por embarazo, aborto o puerperio (etapa inmediata al nacimiento), en ese mismo año la TVC se reportaba con una incidencia de 0.2-0.5 por cada 100,000 personas-año con un 0.5 % del total del evento vascular, sin embargo estas incidencias aumentaron a 1.32-1.57 por cada 100,000 personas-año siendo 1.5 a 2 % del evento vascular reportado por todo el mundo (Rivera-Góngora et al., 2022; dos Santos et al., 2022; Ruiz-Sandoval et al., 2012).

La TVC es una enfermedad neurovascular poco común causada por oclusión venosa trombótica dentro de la cavidad craneal de un seno dural, o una vena cortical, también se le considera TVC a la trombosis venosa cerebral profunda (Mehta et al., 2019).

La TVC se representa alrededor del 0.5 al 1 % entre todos los tipos de enfermedades cerebrovasculares (Ruiz-Sandoval et al., 2012). La TVC es una enfermedad grave pero potencialmente tratable, afecta de manera más frecuente a adultos jóvenes, con una incidencia de 13 casos por millón de habitantes adultos y siete casos en niños (Tadi et al., 2023).

La TVC en la población adulta tiende a ocurrir con mayor frecuencia en pacientes entre edades de 20 a 50 años en comparación con otras enfermedades cerebrovasculares, pero es poco frecuente en pacientes con edades mayores de los 65 años (Dmytriw et al., 2018). La TVC es más frecuente en mujeres que en hombres debido a factores asociados con el género como el parto, puerperio y al uso de anticonceptivos orales los cuales están involucrados en la fisiopatología de la TVC; además, la edad de presentación es más frecuente entre los 25 y 35 años (Ehtisham et al., 2006; Guenther et al., 2011).

Los signos y síntomas de la TVC son variables siendo el más común el dolor y aun no existe un patrón reconocible o identificable por lo que puede conducir a diagnósticos erróneos. La TVC puede confundirse con una serie de afecciones como hipertensión intracraneal espontánea, hemorragia subaracnoidea, déficit neurológico focal, crisis, tumor, absceso, encefalitis encefalopatía metabólica, el uso de talidomida en mieloma múltiple y meningoencefalitis (Tadi et al., 2023; Mehta et al., 2019; Ehtisham et al., 2006).

En un estudio internacional la trombofilia genética y adquirida estuvo presente en el 34 % de los pacientes con TVC; la trombofilia hereditaria incluye deficiencias en la proteína S y C, deficiencia de antitrombina, mutación del factor V Leiden, mutación del gen de la protrombina y la hiperhomocisteinemia (Silvis et al., 2017).

Otros factores de riesgo asociados a la TVC incluyen enfermedades inflamatorias como lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias intestinales y la granulomatosis de Wegener; infecciones locales como la otitis y mastoiditis las cuales pueden conducir a la trombosis de los senos sigmoideo y transversos, así como también TVC (Silvis et al., 2017, Ruiz-Sandoval et al., 2012).

La TVC también se puede presentar en pacientes con lesiones en la cabeza después de procedimientos neuroquirúrgicos, lesiones directas en los senos paranasales o venas yugulares como el cateterismo de la vena yugular o después de una punción lumbar. (Silvis et al., 2017). (Tabla 1)

Tabla 1. Posibles causas de TVC

Neoplasias	Trastornos hematológicos
Carcinomas viscerales, leucemias, linfomas, enfermedades, mieloproliferativas, hemangioma, metástasis cerebrales.	Policitemia, hemoglobulinuria paroxística, anemia de células falciformes, anemia posthemorrágica, aumento de lipoproteína A, deficiencia de antitrombina III, deficiencia de plasminógeno, criofibrinogenemia, hiperhomocisteinemia, exceso del factor VIII, mutación del factor II, Anemia ferropénica, deficiencia del ácido fólico y de vitamina B ₆ y B ₁₂ , deficiencia de proteína C y S; mutación del factor V Leyden; mutación de protrombina G20210A, coagulación intravascular diseminada.
Enfermedades inflamatorias	Enfermedades gastrointestinales
Lupus eritematoso sistémico; granulomatosis de Wegener; sarcoidosis; arteritis de la arteria temporal; Behcet; síndrome antifosfolípido, tiroiditis.	Colitis ulcerativa
Enfermedades infecciosas	
Infecciones regionales (oído, nariz, ojo, faringe, cabeza y cuello, (septicemia, endocarditis, tifoidea, tuberculosis, abscesos, sarampión, hepatitis, encefalitis, herpes, VIH, CMV, malaria, triquinosis, aspergilosis, criptococosis, empiema, meningitis, osteomielitis, sinusitis, celulitis facial.	
Medicamentos	
Anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal, esteroides, antineoplásticos (L-asparaginasa), ácido épsilon aminocaproico.	

Fuente: Rev Med Hosp Gen Mex 2003; 66 (1):7-12

3.1 Anatomía

Las venas cerebrales no contienen capas típicas de las paredes de los vasos, por lo cual permite dilatación, así como el movimiento del flujo sanguíneo en cualquier dirección cuando es obstruido. El drenaje del cerebro se divide en dos: el sistema venoso superficial y el sistema venoso profundo este último drena hacia los principales senos duros como el seno sagital superior (SSS), seno sagital inferior (SSI), senos laterales (SL), seno cavernoso y seno recto; finalmente el drenaje se lleva a cabo a través de la vena yugular interna; mientras que el sistema venoso superficial drenan sangre venosa de la corteza cerebral y una porción de la sustancia blanca subyacente, también tienden a drenar principalmente al SSS y SL. El sistema venoso profundo drena sangre desde la sustancia blanca profunda de los hemisferios, así como de los ganglios basales hacia la vena de Galeno; ambos sistemas contienen múltiples anastomosis, esto permite vías alternas al drenaje venoso cuando se presente una trombosis (Vaca-Villanueva et al., 2021; Guenther et al., 2011).

La función de los senos duros consta de la absorción del líquido cefalorraquídeo (LCR), ya que contienen las vellosidades aracnoideas, los senos duros están conformados por dos grupos: el posterosuperior que comprende el SSS, el SSI y los SL con sus porciones transversa y sigmoidea, el seno recto y occipital; el grupo anteroinferior que incluyen los senos petrosos superior e inferior y el cavernoso. El SSS drena la corteza cerebral la mayor parte y corresponde anatómicamente al borde de la hoz del cerebro; los SL se originan en la presa de Herófilo y se extienden hasta el bulbo de la yugular, tienen una porción transversa y una porción sigmoidea que va unida a la apófisis mastoideas y es susceptible de trombosis a pacientes que presentan mastoiditis u otitis media; el seno lateral drena sangre del cerebelo, tallo encefálico y la parte posterior de los hemisferios cerebrales, la función de los senos cavernales es drenar a las venas yugulares internas mediante los senos petrosos y se localizan en la base del cráneo, en posición superolateral a los senos esfenoidales; debido a sus paredes laterales discurren los nervios motor ocular común (III), troclear (IV) y el trigémino (V). En la parte medial está el nervio motor ocular externo (VI) y la arteria carótida interna rodeada por el plexo simpático (Figura 2) (Vaca-Villanueva et al., 2021; Guenther et al., 2011).

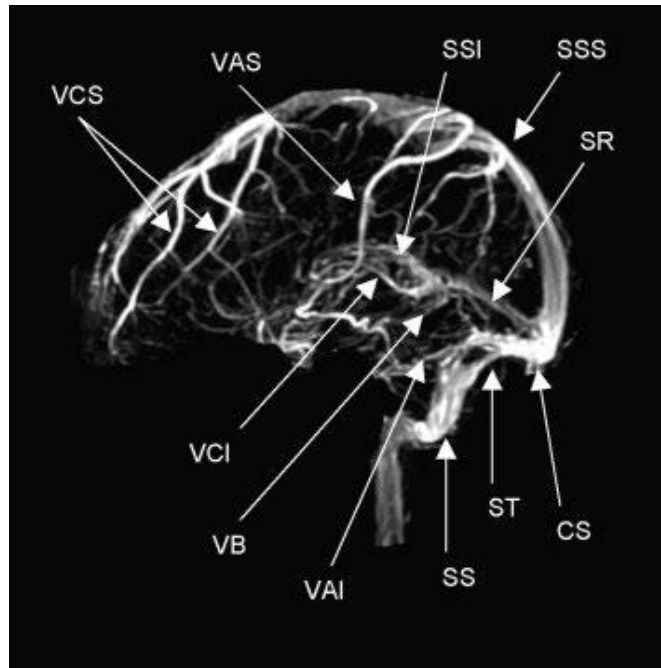


Figura 2. Anatomía de los principales senos venosos. CS: confluencia de los senos (presa de Herófilo); VAI: vena anastomótica inferior (Labbé); VAS: vena anastomótica superior (Trolard); VB: vena basal (Rosenthal); VCI: vena cerebral interna (Galeno); VCS: venas cerebrales superficiales; SR: seno recto; SS: seno sigmoideo; SSI: seno sagital inferior; SSS: seno sagital superior; ST: seno transversal o lateral. (Tomado de Guenther 2011)

3.2 Fisiopatología

La localización usualmente de trombosis venosa cerebral es el seno sagital superior, el seno transversal y el seno sigmoideo. Para que la TVC origine una lesión cerebral puede explicarse a través de dos mecanismos fisiopatológicos: el primer mecanismo es cuando la trombosis de las venas cerebrales induce un aumento de la presión venosa y capilar por lo que hay una disminución de la perfusión cerebral, la disminución de esta da como resultado una lesión isquémica, manifestándose con un edema citotóxico, dañando así las bombas de la membrana celular dependientes de energía provocando inflamación intracelular. Cuando se altera la barrera hematoencefálica provoca edema vasogénico y fuga hacia el espacio intersticial; el aumento de presión en el sistema venoso que puede provocar una hemorragia intraparenquimatosa (Tadi et al., 2023).

El segundo mecanismo fisiopatológico que provoca la TVC es la obstrucción de los senos cerebrales, esto es cuando el trombo no se disuelve. El líquido cefalorraquídeo normalmente se encuentra en los ventrículos cerebrales este se transporta a través del espacio subaracnoideo hasta las granulaciones aracnoideas y se absorbe en los senos venosos; la trombosis de los senos venosos produce una alteración de la absorción del líquido cefalorraquídeo, por lo que conduce a un aumento de la presión intracraneal; esto a su vez produce edema citotóxico y vasogénico el cual puede provocar hemorragia parenquimatosa. (Figura. 3). Se han descrito una amplia variedad de factores de riesgo no genéticos y genéticos para la TVC (Tadi et al., 2023).

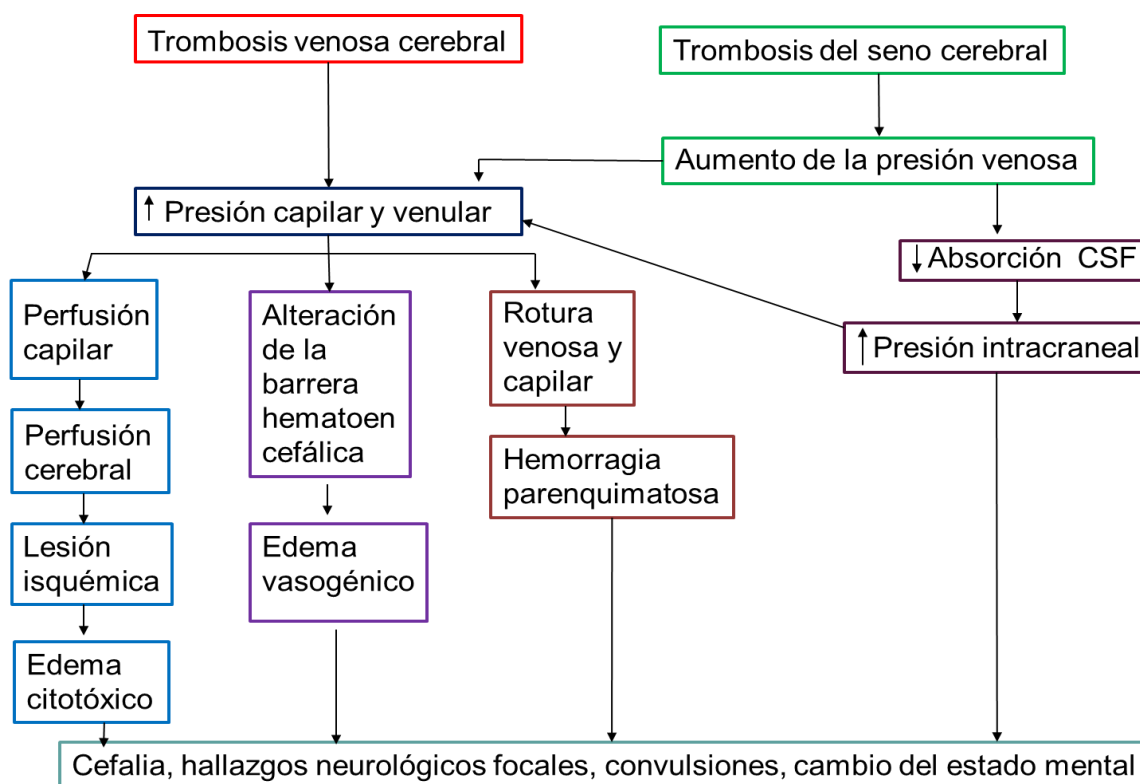


Figura 3. Fisiopatología de trombosis venosa cerebral. (tomado de Piazza., 2012).

3.3 Factores de riesgo no genéticos

Los factores de riesgo no genéticos corresponde a los fármacos como los anticonceptivos orales 10 al 73%, los glucocorticosteroides 5%, la asparaginasa 1-3% así como también el tamoxifeno, el estado protrombótico adquirido (como el embarazo, puerperio y período postoperatorio), los trastornos metabólicos 10-26% (como la hiperhomocisteinemia, hipertensión y la diabetes durante la gestación), enfermedades autoinmunes e inflamatorias 15% (como la enfermedad inflamatoria intestinal), neoplasias malignas (como leucemia y carcinoma sistémico), algunas enfermedades infecciosas sistémicas 6-9% (como la septicemia y las causas locales como la otitis y mastoiditis), así como también traumatismo craneoencefálico 4-6%, intervención o cirugías neuroquirúrgicas 19%. Aunque se han señalado más de 100 causas que pueden desencadenar la TVC, un 15 al 20% de los casos no se identifica su etiología (Appenzeller et al., 2005).

3.4 Factores de riesgo genéticos

La TVC tiene bases genéticas y se han estudiado genes candidatos posiblemente relacionados con la TVC tanto en controles como en casos, sin embargo, los resultados de estos estudios han sido contradictorios.

Se sabe que las trombofilias hereditarias causan 22.4% de los casos de TVC, el factor genético más común es el factor V Leiden, la siguiente es la mutación del gen de la protrombina G20210A, también se incluyen las deficiencias de proteína S, proteína C y antitrombina III siendo las menos comunes. El factor V de Leiden, las deficiencias en las proteínas y la mutación del gen de protrombina provocan una reducción del control de la generación de trombina; la deficiencia de antitrombina causa una disminución de la neutralización de trombina; estos mecanismos son responsables de la TVC (Ahmad 2006).

La enfermedad sistémica (como el síndrome de Behcet, lupus eritematoso sistémico) los cuales corresponden alrededor de un 20 a 30% (Appenzeller et al., 2005; Green et al., 2018).

Se han estudiado seis genes con sus seis polimorfismos relacionados con la TVC adulta, el factor V de Leiden (G1691A), protrombina (G20210A), metilentetrahidrofolato reductasa MTHFR (C677T), inhibidor-1 activador del plasminógeno, proteína Z (G79A), Janus cinasa-2/V617F, de los cuales solos dos el factor V de Leiden ((G1691A) y protrombina (G20210A) mostraron una asociación significativa con el riesgo de TVC (Marjot et al., 2011).

Green y colaboradores reportaron que algunos factores genéticos mostraron una asociación de riesgo con la TVC significativamente estos son: el factor V de Leiden (G1691A), la MTHFR (C677T), el inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina TAFI (C1040T) con deficiencia de la proteína C y S y la mutación de la protrombina (Green et al., 2018).

En el 2010 Akhter y colaboradores reportaron que dos polimorfismos G894T y A922G, muestran asociación con la trombosis venosa profunda (TVP) en pacientes de la India y de Asia., (Akhter et al., 2010) en 2022 Akhter y colaboradores reportaron que los polimorfismos G8974T y G2479A del gen de la eNOS aumentan el riesgo de trombosis venosa profunda al alterar los niveles de homocisteína (Akhter et al., 2022).

Con un mejor entendimiento de la contribución genética en la TVC se obtendrán mejores resultados en salud pública. Por lo tanto, el estudio de la genética de los factores de riesgo de la EVC puede proporcionar una mejor capacidad para detectar los genes que están o generan la susceptibilidad.

3.5 Epidemiología en México

En México, según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), las enfermedades cerebrovasculares representan la sexta causa de muerte en el año 2012, seguido de las enfermedades cardíacas, la diabetes mellitus, los tumores malignos, los accidentes y las enfermedades hepáticas. En el año 2012 se reportó que de 2000 casos registrados el 59 (3%) presentaron TVC de los cuales el 85 % fueron mujeres y el 15 % fueron hombres .(Ramírez-Alvarado et al., 2016) En el periodo de los años 2016 al 2018 se reportó que la TVP constituyó el 69% de los 1785 casos de los cuales el 2.63 % fallecieron. (Nieto de Pascual, 2003; Rivera-Góngora 2015; Hernández-Cu et al., 2022).

Actualmente, en México la tendencia registrada los últimos años muestra un incremento continuo en la mortalidad por este padecimiento que ocupó en el 2010 el sexto lugar dentro de las principales causas de defunción. Este fenómeno se da por la llamada transición epidemiológica. Esto contrasta con lo observado en países desarrollados donde en las últimas cuatro décadas la incidencia de EVC ha disminuido consistentemente, mientras que casi se ha duplicado en países en vía de desarrollo. El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica realizó un estudio en el 2010 y encontró que existe una tendencia creciente y sostenida que implica el incremento del 27.7% entre el 2004 y 2010 (con casi 40 mil egresos el primer año vs casi 51 mil para el 2010) el comportamiento del sexo fue muy semejante.²⁵ La TVC tiene una frecuencia relativa que oscila entre el 0.43 % y 8 % entre todas las formas de enfermedad cerebrovascular aguda, hay pocos datos epidemiológicos sobre la incidencia, prevalencia o frecuencia entre pacientes hospitalizados con accidentes cerebrovascular y los registros hospitalarios raras vez se refieren específicamente a la TVC. (Ruiz-Sandoval et al., 2012).

Se ha reportado que los factores sociodemográficos difieren significativamente de los países desarrollados con los países de latinoamericanos sobre la TVC; además la mayoría de los estudios sobre TVC en Latinoamérica no describen la metodología responsable del diagnóstico de dicha enfermedad; dos Santos Becerra y colaboradores en el 2022 realizó una investigación de literatura sobre casos de TVC en América Latina, el número de pacientes oscilo entre 5 y 467 comprendido entre 2003 y 2021.

Los 26 estudios incluidos sumaron 1,486 pacientes; de los cuales el 77.9% (1,154) fueron mujeres con una edad media de 32 años. Solo 9 países latinoamericanos encontraron hallazgos epidemiológicos como Argentina, Brasil, Colombia, Chile, Costa Rica, Cuba, Guadalupe, Uruguay y México. México con un 36.7%, Brasil con un 26.7% y Argentina con un 19.3% fueron los países con más pacientes reportados con TVC. (Figura 4).



Figura 4. Distribución de los estudios e incidencia de TVC en América Latina. A) Se observa en el mapa los casos de TVC por país hasta julio de 2022. B) Distribución de las bases de datos con TVC en América Latina. (Tomado de dos Santos, et al., 2022)

3.6 Diagnóstico y tratamiento

La forma de inicio de la TVC es altamente variable y este depende del seno venoso afectado. El 30% de los casos de TVC se presenta en forma aguda y los síntomas se desarrollan en se presenta en forma crónica desarrollando los síntomas en un período mayor de 30 días hasta 6 meses. Según Bousser se han reportado cuatro patrones clínicos en la TVC:

- 1.- Síndrome focal, asociados con cefalea, crisis convulsivas o alteraciones del estado mental.
- 2.- Hipertensión intracraneal (HIC) aislada con cefalea, náuseas, vómito y papiledema.
- 3.-Encefalopatía subaguda difusa con alteración del estado mental.
- 4.-Síndrome del seno cavernoso, oftalmoplejía dolorosa, quemosis y proptosis (Guenther et al., 2011).

Para el tratamiento TVC, se utilizan anticoagulantes de bajo peso molecular, heparina no fraccionada o anticoagulantes directos, estos se utilizan en la reversión del proceso trombótico causal y en la prevención de otras complicaciones como tromboembolia pulmonar o en pacientes que presentan trombosis en venas yugulares; el tratamiento endovascular consta de agentes trombolíticos aplicados de manera local con acceso endovascular yugular o femoral, este tratamiento es usado regularmente en pacientes con TVC de mal pronóstico a pesar del tratamiento con anticoagulantes, el tratamiento de hemicraneotomía descompresiva tiene la utilidad de otorgar al parénquima cerebral una ventana para mitigar el exceso de presión intracraneal; en pacientes con HIC severa que tienen poco o nula respuesta al tratamiento inicial (Appenzeller et al., 2005; Green et al., 2018; .Guenther et al., 2011).

4 ENDOTELIO

En 1865 el anatomista Wilhelm His definió como endotelio la célula que recubre los vasos sanguíneos, linfáticos y las cavidades mesoteliales; sin embargo, esta definición posteriormente fue modificada incluyendo solo los vasos sanguíneos y linfáticos; por lo que ahora el endotelio se define como una capa delgada de células que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos y linfáticos; que van desde el corazón hasta el capilar más diminuto, controlando el paso de materiales, el tránsito de glóbulos blancos desde el torrente sanguíneo. El endotelio se le considera como una capa monocelular que separa los tejidos de la circulación sanguínea (Lodish 2005, p 45; Checa 2007; Favero et al., 2014).

En los años de 1950 y 1960 se descubrió que el endotelio está formado por una gran variedad de células endoteliales, desde el punto de vista metabólico el endotelio es sumamente complejo, sin embargo, su estructura anatómica es muy simple y lineal, la cual consta de una sola capa de células mesenquimales. El endotelio puede ser continuo o discontinuo; el endotelio continuo puede ser fenestrado (son poros transcelulares de 70nm de diámetro aproximadamente, que se extienden a través de todo el espesor de la célula y poseen un diagrama no membranoso delgado de 5 a 6 nm a través de su abertura) o no fenestrado. El endotelio continuo no fenestrado se encuentra en arterias, venas y capilares del cerebro, piel, corazón y pulmones, mientras que el endotelio fenestrado continuo se caracteriza en zonas de alta filtración o de transporte transendotelial, como por ejemplo los capilares de las glándulas exocrinas y endocrinas, la mucosa gástrica e intestinal, los plexos coroideos, los glomérulos y los túbulos renales; por último el endotelio discontinuo se localiza en ciertos lechos vasculares sinusoidales, principalmente en el hígado, en la medula ósea y el bazo (Favero et al., 2014). (Figura 5)

Las células endoteliales son células altamente especializadas y su membrana está formada por una bicapa de fosfolípidos separados por compartimientos de agua y atravesados por proteínas complejas las cuales funcionan como receptores o canales. Las células endoteliales constan de tres superficies, la cohesiva que une a las células endoteliales entre sí y facilita los procesos de transporte, la superficie adhesiva se adhiere a la lámina basal y la superficie luminal consta de moléculas y proteínas de unión específicas que regulan el tráfico de células sanguíneas (Favero et al., 2014).

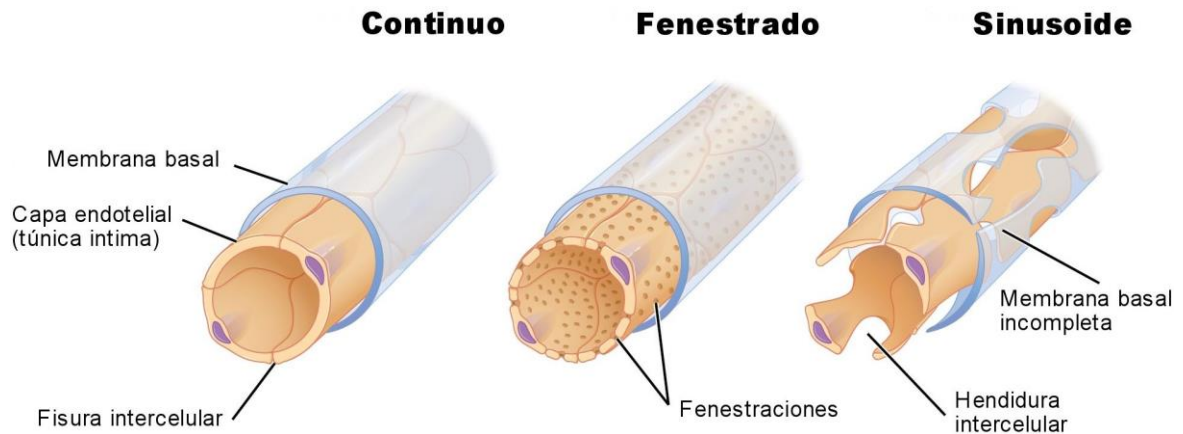


Figura 5. Variaciones morfológicas del endotelio. Esquemas del endotelio continuo fenestrado y endotelio continuo no fenestrado, endotelio discontinuo o sinusoide. (Tomado de study.com/academy/lesson).

Las células endoteliales son capaces de adaptar su estado funcional a estímulos diversos; como por ejemplo extender y remodelar la red de vasos sanguíneos así como el crecimiento y la reparación del tejido; el endotelio es capaz de enviar información a las células circundante, permitiendo que los vasos sanguíneos adapten su diámetro y grosor de pared para adaptarse al flujo sanguíneo, esto se realiza a través de mecanorreceptores que presentan las células endoteliales permitiéndoles sentir la tensión de corte debido al flujo de sangre (Checa 2007). Por lo tanto, el endotelio realiza diversas funciones ateroprotectoras, mantiene la fluidez de la sangre, regula el tono vasomotor, la coagulación, inhibe la trombosis, el sistema fibrinolítico, el metabolismo de las lipoproteínas, el transporte capilar, la angiogénesis, las interacciones de la pared del vaso con la sangre circulante, modula la actividad de las células musculares, controla el tránsito de macromoléculas y células inflamatorias de la pared; el endotelio elabora una armadura completa de proteínas, prostanoideas, y otras sustancias paracrinas que mantienen un delicado balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación, así como la inhibición y promoción del crecimiento vascular. El endotelio sintetiza y libera un potente agente antiplaquetario y vasodilatador, la prostaciclina, pero también es capaz de elaborar otros prostanoideas como el tromboxano A, que son vasoconstrictores y agonistas de la agregación plaquetaria; el endotelio ejerce una profunda influencia para metabolizar sustancias vasoactivas circulantes como la serotonina, epinefrina, bradiquinina y angiotensina II.

Esta diversidad de función del endotelio permite que este tejido mantenga la fluidez de la sangre (Cooke 1997).

Existe una complejidad similar entre el endotelio y el músculo liso vascular subyacente. La En resumen, el endotelio es un órgano dinámico con funciones autocrinas y paracrinas, regulando intercambios entre el torrente sanguíneo y los tejidos circundantes; el endotelio ejerce un control importante sobre las funciones vasculares mediante la elaboración de una amplia gama de sustancias las cuales le permite regular y mantener la homeostasis vascular a través de múltiples y complejas interacciones entre las células endoteliales y la luz del vaso (Fernández et al., 2009).

La disfunción endotelial es un evento previo a los cambios morfológicos de la aterogénesis contribuyendo así a la placa aterosclerótica que es caracterizada por la reducción del óxido nítrico (NO), estrés oxidativo aumentado, expresión de factores protrombóticos y proinflamatorios aumentada, así como también una vasorreactividad; generalmente existe varios mecanismos moleculares para la disfunción endotelial; sin embargo, ninguno es tan crítico como la disminución o pérdida del NO (Cry et al., 2020).

Tabla 2. Clasificación de las diferentes sustancias generadas por el endotelio.

Sustancias vasoactivas	Mediadores inmunológicos e inflamatorios
Vasodilatadores	Citocinas
Adrenalina	Interleucinas
Cininas	Proteínas quimioatrayentes de monocitos 1
Óxido nítrico	Factor de necrosis tumoral
Factor hiperpolarizante derivado del endotelio	Moléculas de adhesión:
prostaciclina	Moléculas de adhesión intercelular
	Moléculas de adhesión célula endotelial-plaqueta
<u>Vasoconstrictores</u>	Selectinas
Angiotensina II	Moléculas de adhesión de células vasculares
Prostanoides vasoconstrictores	Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno
Coagulación y fibrinólisis:	<u>Especies reactivas de oxígeno</u>
<u>Coagulación</u>	Peróxido de hidrogeno
Factor V	hiperóxido
Heparán sulfato	superóxido
Proteína CyS	<u>Especies reactivas del nitrógeno</u>
Trombomodulina	Nitrito
Factor tisular	Dióxido de nitrógeno
Factor de Von Willebrand	Peroxinitrito
<u>Fibrinólisis</u>	Cloruro de nitrilo
Inhibidor del activador del plasminógeno	
Activador tisular del plasminógeno	
Urocinasa	
Factor de crecimiento:	
Factor básico de crecimiento de fibroblastos	
Factor de crecimiento similar a insulina	
Factor de crecimiento transformante	

Fuente: Carvajal-Carvajal, 2017

5 BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1 Nucleótidos y ácidos nucleicos (DNA)

Los nucleótidos desempeñan múltiples funciones en el metabolismo celular, constituyen la moneda energética en la transacción del metabolismo, son componentes estructurales de una serie de cofactores enzimáticos, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales, y son las unidades monoméricas que forman los ácidos nucleicos, como el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA) (Lehninger, 2014).

El nucleótido está formado por una base nitrogenada que puede ser púrica compuesta por dos anillos heterocíclicos fusionados (son adenina y guanina, tanto para el DNA y RNA) o pirimidina compuesta por un anillo heterocíclico (son citosina, timina o uracilo, este último solo lo tiene el RNA en lugar de timina), una azúcar que tiene 5 átomos carbono (la pentosa para el DNA es 2-dexosiribosa y para el RNA es D-ribosa) y un grupo fosfato que da la carga negativa. Las pentosas son las que definen la identidad de un ácido nucleico.

La base de un nucleótido está unida covalentemente por el N-1 en las pirimidinas y el N-9 por las purinas por el C 1 de la pentosa a través de un enlace *N-β-glucosídico* y el fosfato está esterificado con el carbono 5 de la pentosa (Figura 6 y 7) (Stryer, 2008).

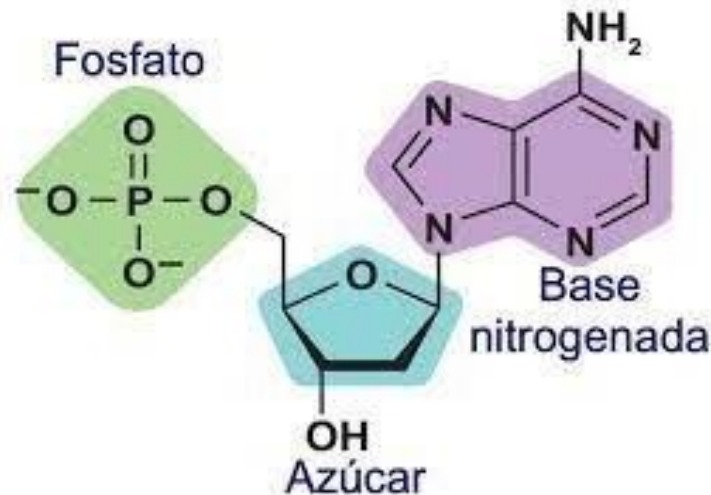


Figura 6. Estructura de un nucleótido. La estructura de los nucleótidos está compuesta por un grupo fosfato (verde), una molécula de pentosa (azul) y una base nitrogenada (morado). (Tomado de la página <https://www.significados.com/nucleotido/>)

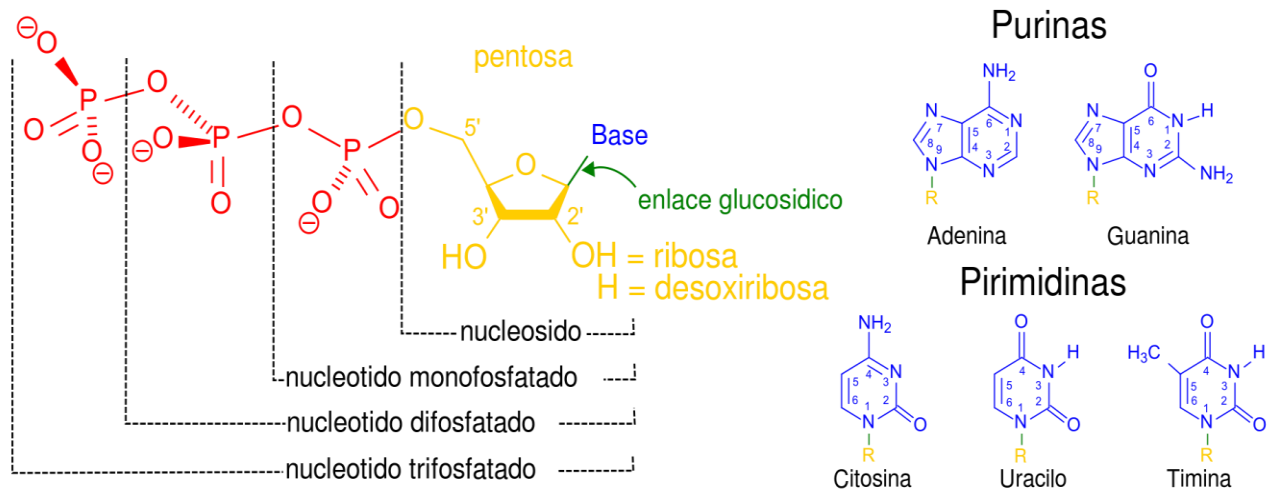


Figura 7. Enlaces que conforman un nucleótido. El enlace éster está conformado por una molécula de ácido fosfórico (rojo) y un nucleósido (amarillo). El enlace N-glucosídico está conformado por la base nitrogenada y una pentosa (nucleósido). Enlace fosfodiéster se conforma por un grupo fosfato y una pentosa, se libera una molécula de agua entre el grupo hidroxilo (OH) del fosfato y otro OH de la pentosa. Los nucleótidos se forman por la unión mediante un enlace éster, de una molécula de ácido fosfórico y un nucleósido (Tomado de <https://soclalluna.com/>).

El DNA es la macromolécula que almacena información genética de un organismo, de tal forma que puede ser transmitida de generación en generación. Estas macromoléculas están formadas por un gran número de nucleótidos y estos nucleótidos están unidos covalentemente por enlaces fosfodiéster este enlace se forma entre el grupo fosfato de un nucleótido en el C5 de su pentosa y el C3' de la pentosa del siguiente nucleótido (por convenio la secuencia de bases se escribe 5' a 3'), por lo tanto, los esqueletos covalentes de los ácidos nucleicos consisten en residuos alternados de fosfato y pentosa; este esqueleto es muy hidrofílico (Figura 8) (Lehninger, 2014; Stryer, 2008).

A las bases nitrogenadas se les puede considerar como grupos laterales, están unidas covalentemente por puentes de hidrógeno y la unión se hace entre una adenina (A) con una timina (T) o uracilo (U en el caso del RNA) con dos puentes de hidrógeno y una citosina (C) con una guanina (G), con tres puentes de hidrógeno; el apilamiento de las bases, ayudan a minimizar el contacto con en la estabilización de la estructura del DNA (Lodish, 2005).

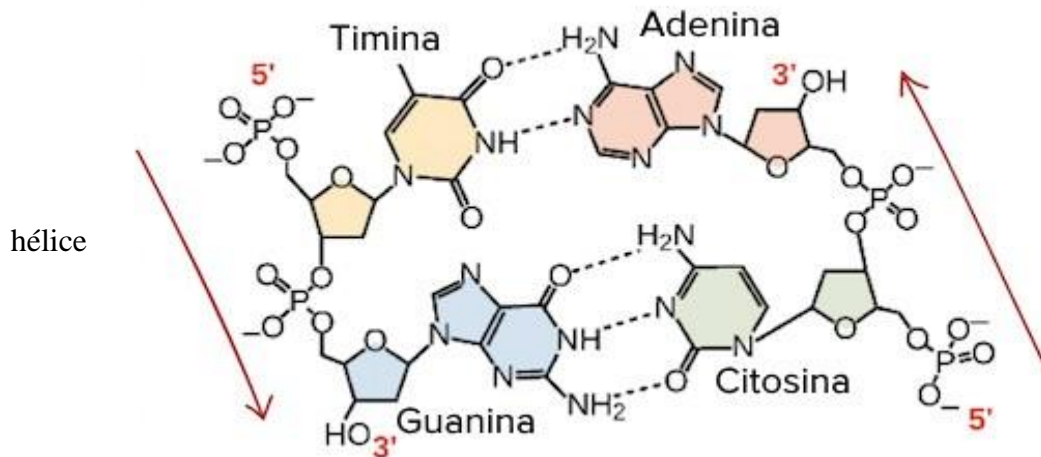


Figura 8. Representación gráfica de una serie de nucleótidos. (hélice) unidos por enlaces fosfodiéster y uniones entre bases por puentes de hidrógeno para la formación de la doble hélice. (Tomado de <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/central-dogma-transcription/a/nucleic-acids>.)

La estructura del DNA es una doble cadena arreglada en una doble hélice, las dos cadenas de nucleótidos se arreglan de manera antiparalela, una está 5' a 3' y la otra 3' a 5', las dos cadenas se enroscan una sobre la otra creando una molécula de forma helicoidal; que forma un surco mayor y un surco menor. El modelo de la doble hélice y el apareamiento específico de las bases sugirió cómo podría replicarse el DNA. La secuencia de bases de una hebra de la doble hélice determina de forma precisa la secuencia de la otra (Pollard, 2007).

5.2 Mutaciones

El DNA es una molécula sumamente estable que se replica con una precisión asombrosa, pero pueden ocurrir errores en su replicación que generan cambios; por lo tanto, una mutación es una variación espontánea, un cambio permanente y heredable en la secuencia del DNA, en nucleótidos o bien la disposición del DNA en el genoma (Sánchez-Prada y Gómez-Meda 2013). Estos cambios se pueden expresar durante la división celular, la exposición a mutágenos o una infección viral y alterar las secuencias de aminoácidos de las proteínas o una diferencia en regiones no codificantes del DNA el cual tiene el potencial de cambiar la expresión del gen alterando la fuerza de un promotor (Loewe et al., 2010).

Las mutaciones en la línea germinal afectan a las células productoras de gametos, transmitiéndose a la siguiente; estas mutaciones suceden con mucha frecuencia y constituyen la base de varias enfermedades genéticas y hereditarias (Sánchez-Prada y Gómez-Meda 2013).

Las mutaciones somáticas describen cualquier alteración a nivel celular en los tejidos somáticos, son parte normal del envejecimiento ocurriendo a lo largo del ciclo de vida del organismo; los cuales puede ser de manera espontánea en la replicación del DNA o como respuesta al estrés; las radiaciones, la exposición a ciertos químicos, así como los procesos intracelulares que generan radicales libres son factores que pueden causar daño celular y mutaciones dentro del DNA celular; diferentes mutaciones en genes supresores de tumores, en oncogenes así como mecanismos de reparación del DNA, dan como resultado un riesgo de enfermedades o cáncer a medida que las mutaciones somáticas continúan acumulándose dentro de los genes siendo ya inestables (Miles et al., 2023).

TIPOS DE MUTACION

Las mutaciones puntuales son aquellas que cambian solo una letra dando lugar a los llamados polimorfismos de un solo nucleótido, en inserciones y deleciones o también denominadas mutaciones por cambio de marco esto es cuando se produce dentro de una región codificante puede provocar un cambio en el marco de lectura utilizado para la traducción de la proteína específica del gen, sin embargo todas las inserciones y deleciones pueden ocurrir en cualquier lugar y no todas las inserciones y deleciones en regiones codificantes dan como resultado variaciones de marco, una inserción o deleción de diferentes tamaños simplemente agrega o elimina codones sin afectar el marco de lectura o puede ser el resultado de variantes en el número de copias (Sánchez-Prada y Gómez-Meda 2013; Loewe et al., 2010).

Mutaciones de inserción o deleción, son aquellas que pueden afectar a todas las partes del genoma siendo las más frecuentes cuando el DNA molde incluye secuencias cortas repetidas; estas secuencias repetidas pueden corroborar un deslizamiento de replicación, esto es en el que la cadena plantilla y su copia cambian sus posiciones relativas por lo que la parte de la plantilla se copia dos veces o se omite (Marrón, 2002).

Las mutaciones por transposiciones es cuando un segmento de un gen cambia de posición a otra por lo que pueden causar mutaciones en los límites e inversiones de varios tamaños que cambian la orientación de un segmento de DNA (Loewe et al., 2010).

Las mutaciones por duplicación consisten en secuencia interior de un gen se invierte, esto se lleva a cabo cuando se producen dos giros de 180° , uno para invertir la secuencia y otro para mantener la polaridad del DNA. Por lo tanto, la mutación en un gen clave puede ocasionar la muerte celular si la proteína codificada por dicho gen es defectuosa y algunos eventos de recombinación conducen a cambios definidos en las capacidades bioquímicas de la célula (Brown 2002). Los factores bioquímicos en cada una de las mutaciones ocurren con más frecuencia que otros; por ejemplo la metilación de los grupos CpG (regiones de DNA donde hay una gran concentración de pares de Citosina y Guanina enlazados por un fosfato) en mamíferos dirige a tasas de mutación aproximadamente diez veces más en estos sitios, se ha reportado que en diversas especies existen más transiciones que transversiones así como la proporción de inserciones y eliminaciones puede cambiar entre especies (Figura 9) (Loewe et al., 2010).

Por lo anterior, las mutaciones son la fuente de las variaciones genéticas y constituyen una de las principales causas de la diversidad de los organismos. Las materias primas de la evolución pueden ser benéficas o perjudiciales; por lo que son fuente de muchas enfermedades, así como de trastornos humanos; por lo tanto, son útiles para verificar procesos biológicos fundamentales (Pierce, 2009; Pollard, 2007).

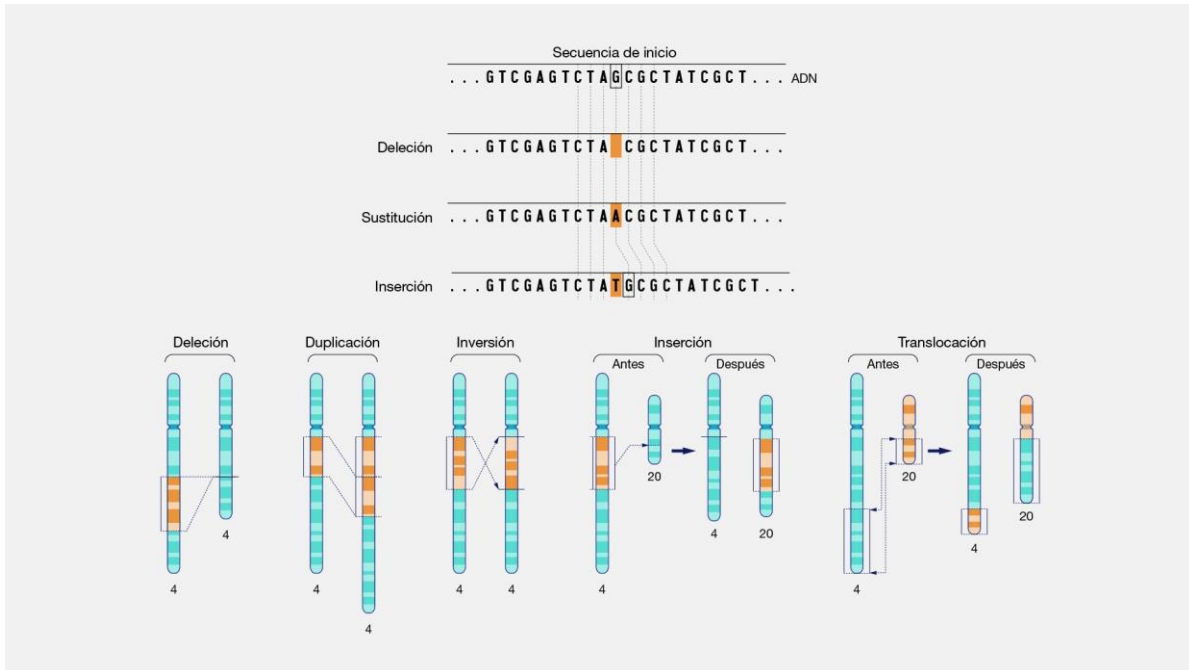


Figura 9. Tipos de mutaciones. Delección: pérdida de uno o más nucleótidos de un segmento de DNA o hasta una parte completa de un cromosoma, duplicación: duplicación de una o más copias de un segmento de DNA, inversión: cuando un segmento se desprende y se vuelve a unir dentro del mismo cromosoma, pero con la orientación opuesta, inserción: adición de uno o más nucleótidos en un fragmento de DNA o hasta una parte completa de un cromosoma, translocación: cuando un cromosoma se rompe y los fragmentos se añaden fuera de sitio a cromosomas diferentes. (www.genome.gov. Natural Human Genome Research Institute)

5.3 Polimorfismos

Como ya se había mencionado anteriormente las mutaciones son cambios en el DNA, originados por errores en el mecanismo de la replicación o por factores ambientales; causando enfermedades, dichas mutaciones dan lugar a lo que se llama polimorfismos. El polimorfismo se define como la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos (variaciones de la secuencia del DNA presentes en una posición definida en un cromosoma) para un *locus* (sitio o ubicación) determinado, la frecuencia alélica en la población es superior al 1% (Torrades -Sandra 2002; Checa 2007).

La diferencia que existe entre un polimorfismo y una mutación es que el polimorfismo no conlleva a una modificación en el fenotipo hablando clínicamente. Este podría llevar una susceptibilidad a ciertas patologías, modificación de respuesta a medicamentos o podría ser un factor de riesgo en ciertas enfermedades como el Factor V de Leiden; la otra diferencia es el porcentaje, en una mutación de una población general se esperaría <1% de los casos, mientras que en un polimorfismo se esperaría >1% de los casos (Pierce, 2009).

Existen varias investigaciones donde centran sus estudios en genes de polimorfismos en ciertas poblaciones para identificar si existe alguna influencia en el riesgo de padecer una enfermedad.

Existen varios tipos de polimorfismos, inserciones, deleciones, cambios en un número de secuencias repetidas en un número variable de veces de una secuencia corta (*variable number tandem repeat* VNTR) (Cooke 1997), los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base, también se les llama polimorfismos de un único nucleótido (SNP). La gran mayoría de los SNP's contiene dos alelos, estos están representados por una sustitución de base por otra; este tipo de alelos se clasifican como alelos principal o silvestre y alelo mutante; esta clasificación se basa en la frecuencia observada en las poblaciones. Si en los SNP el cambio del nucleótido ocurre en una zona codificante, puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante y puede modificar la actividad y función de esta. Los cambios también pueden ocurrir en zonas del promotor de un gen y modificar su expresión, en este caso, estas zonas promotoras modulan el proceso de la transcripción del DNA en RNA (la transcripción es el primer paso de la información del DNA a RNA); o si el cambio se produce en el intrón estos no se traducen a proteína, cambios en su estructura pueden modular la expresión del gen (Figura 10) (Cooke 1997; Checa 2007).

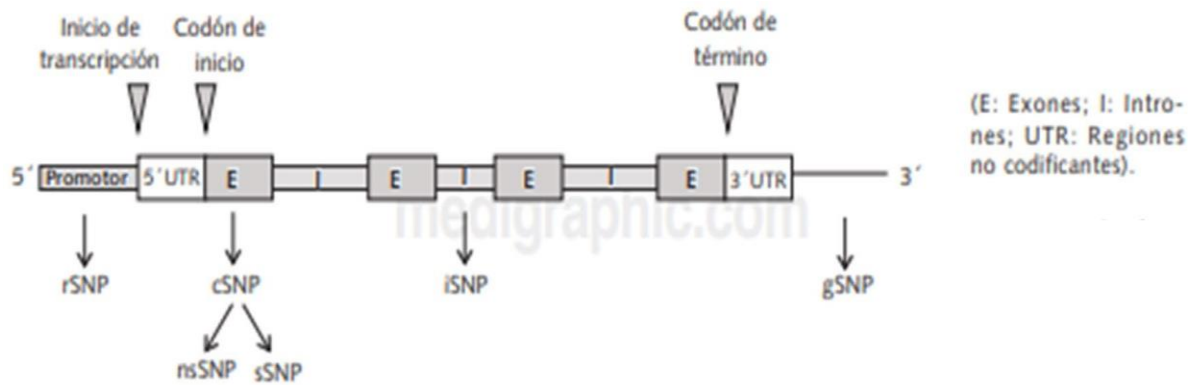


Figura 10. Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma. Los SNP que se encuentran en la región promotora se clasifican como rSNP (en regiones reguladoras) influenciando la actividad transcripcional del gen, localizados en exones se clasifican en cSNP en regiones codificantes; estos se pueden clasificarse como nsSNP o sSNP sinónimos o no, los que se localizan en regiones intrónicas se clasifican iSNP modulando la estabilidad de la proteína, lo que se localizan en regiones intragénicas se clasifican como gSNP. cerca del codón de inicio. (Tomado de centrodeartigo.com/articulos-para-saber-mas/article.)

6 ÓXIDO NÍTRICO

En 1722 Joseph Priestly descubrió al óxido nítrico (NO) como un gas tóxico e incoloro y lo consideró como un contaminante ambiental llamándolo “aire nitroso”. En 1987 se descubrió que el NO se producía naturalmente en el cuerpo y que participaba en la regulación de la presión arterial y el alivio de diversas dolencias cardiacas, en 1987 fue reconocido como el factor relajante derivado del endotelio (EDFR); finalmente en 1998 recibiendo el Premio Nobel de Medicina y Fisiología Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott y Ferid Murad identificaron el óxido nítrico como una molécula de señalización (Cry et al., 2020; Goshi et al., 2019; Rovira et al., 1995; Habib y Ali, 2011).

El óxido nítrico es un radical libre gaseoso de naturaleza lipofílica, altamente reactivo y fácilmente difundible, químicamente está constituido por siete electrones del átomo de nitrógeno (N) y ocho electrones del átomo de oxígeno (O), cuando estos dos átomos reaccionan entre sí, sus electrones se aparean para formar una molécula sin carga con un electrón desapareado (N≡O) (Habib y Ali 2011) (Figura 11).

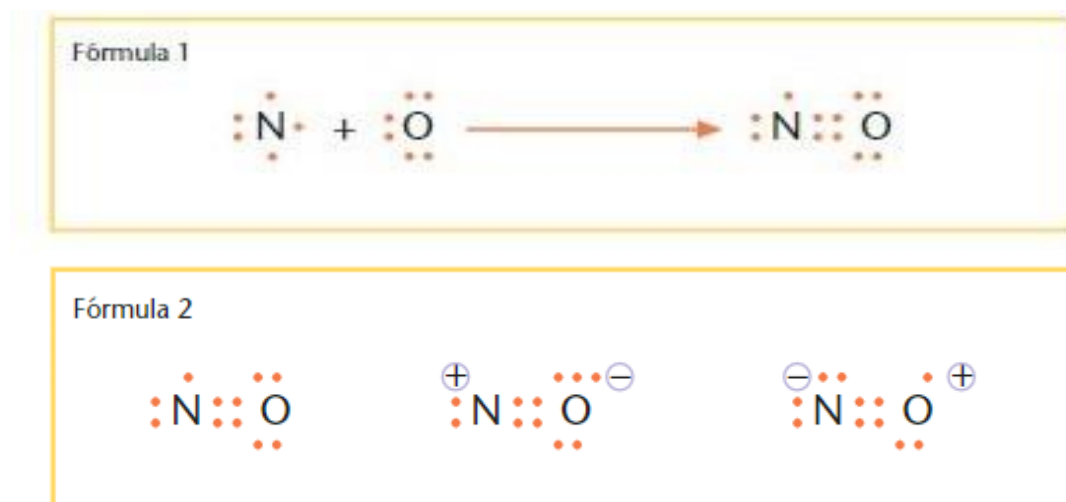


Figura 11. Estructura química del óxido nítrico (modelo de Lewis). En la fórmula 1 se muestran los siete electrones del átomo de nitrógeno y los ocho electrones del átomo de oxígeno, cuando los dos átomos reaccionan entre sí forman NO. En la fórmula 2 se observa que el átomo de nitrógeno tiene un electrón desapareado, este electrón se encuentra situado en el orbital π ; siendo un orbital anti-enlazante, por lo tanto, es un electrón lábil, formando así el NO. (Tomado Centelles et al., 2004)

La presencia del electrón desapareado permite que el NO interactúe rápidamente con otros átomos como el N, azufre (S) átomos que se encuentran en las proteínas, con átomos metálicos como hierro (Fe) para formar nitrosilos metálicos (Fe-NO) o con radicales tirosilo de la enzima ribonucleótido reductasa inhibiendo la síntesis de DNA, con el oxígeno molecular (O_2) esta reacción se puede llevar en fase acuosa o gaseosa, en fase gaseosa el dióxido de nitrógeno (NO_2) es un producto estable de la oxidación de NO, en la fase acuosa el NO_2 da lugar a NO, nitrato (NO_3^-), reacciona con el radical hidroxilo (OH) convirtiendo especies menos dañinas y fácilmente desintoxicantes (Habib y Ali 2011).

Un importante modo de inactivación del NO es cuando reacciona con el anión superóxido (O_2^-) formando peroxinitrito ($ONOO^-$) un potente oxidante que reacciona con todas las moléculas biológicas, este compuesto puede causar daño oxidativo, nitración y S-nitrosilación a biomoléculas incluyendo, lípidos, proteínas y DNA. El estrés nitrosativo por $ONOO^-$ se ha implicado en el daño del DNA seguido por la activación de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP) (Förstermann et al., 2012).

Los mecanismos de acción que mejor se han caracterizado en el óxido nítrico son:

- **La activación de la guanilato ciclasa soluble.** Cuando hay un aumento en los niveles de NO en las células del músculo liso de las arterias, tiene como consecuencia su unión al grupo hemo de la guanilato ciclasa, desplazando un residuo de histidina del lado distal, lo cual conduce a su activación, la concentración elevada de cGMP inicia una cascada de señalización que conduce a la regulación de numerosas cinasas y a la transducción de diversos genes (Förstermann et al., 2012).
- **Su efecto sobre la cadena respiratoria mitocondrial.** El NO inhibe la enzima mitocondrial citocromo c oxidasa (complejo IV) compitiendo con el O_2 . Esta interacción pone de manifiesto que la acción del NO sobre la mitocondria es capaz de dar lugar a un fenómeno llamado *hipoxia metabólica* en la cual, existiendo una concentración normal de O_2 la célula es incapaz de utilizarlo (Xu et al., 2005).
- **Nitrosilación directa de proteínas.** Tiene un efecto postraducciona l sobre diversas proteínas. La modificación postraducciona l se realiza en residuos de cisteína que afecta drásticamente la función de las proteínas un ejemplo de proteínas que se nitrosilan son las caspasas cuya S-nitrosilación viene acompañada de la inhibición de la apoptosis (Stamler et al., 2001).

- El NO puede formar enlaces con el átomo de hierro de las hemoproteínas, como la hemoglobina o guanilato ciclasa, gran parte del NO es inactivado por esta unión (Kim et al., 2003)

Cabe señalar que su reactividad no se debe al electrón desapareado, sino depende de sus propiedades físicas, como por ejemplo su tamaño, su velocidad de difusión y lipofilidad (Habib y Ali 2011; Cuellar-Mata et al., 2010).

Se ha reportado que el NO influencia a la proteína ciclooxigenasa que participa en la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas por reacciones de radicales y por la interacción metal-NO (Habib y Ali 2011), además de estas reacciones el NO como molécula de señalización juega un papel clave en regulación de procesos fisiológicos como: la regulación del tono vascular, factor llave en las propiedades antiateroscleróticas del endotelio, la agregación plaquetaria, la angiogénesis, la comunicación neuronal (neurotransmisión y neuromodulación), la secreción hormonal, la inflamación, la movilidad gastrointestinal, regula la transcripción de los genes y la transducción del RNAm, produce modificaciones post-transduccionales en las proteínas, inhibe la migración y proliferación del músculo liso, inhibe la adhesión plaquetaria, atenúa la adhesión de leucocitos al endotelio y ayuda en la permeabilidad del endotelio (Förstermann et al., 2012; Alimoradi et al., 2019). El NO en el cerebro persiste segundos, junto con su rápida difusión esto le permite abarcar varios millones de sinapsis, el NO también puede inhibir reversiblemente el citocromo c oxidasa en un rango micromolar, se ha reportado que el NO interviene en el daño del DNA a través de la formación de nitrosomas, por la inhibición de sistemas de reparación de lesiones del DNA que esta mediada por sistemas genotóxicos y por la modificación del DNA a través de los productos de oxidación del NO. El NO es capaz de eliminar patógenos intracelulares y bloquear la replicación viral, también tiene efectos antitumorales. El NO tiene un tiempo de vida media entre 0.1 y 5 segundos en soluciones acuosas sin embargo *in vivo* los niveles del NO son modulados por las enzimas sintasa del óxido nítrico (NOS). (Zhao et al., 2015).

7 SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO es sintetizado por una familia de enzimas denominadas sintasa del óxido nítrico (NOSs); se han caracterizado tres isoformas, la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS o NOS1), la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS o NOS2) y la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS o NOS3); en humanos existen tres genes distintos para las isoformas NOS (Tabla 6); los genes de las NOS tiene una estructura bidominio (Figura 12), las isoformas nNOS y eNOS son constitutivas estas dos se pueden inducir bajo determinados estímulos tales como fuerza de rozamiento hemodinámicos (*shear stress*) o daño neuronal; estas dos isoformas se pueden activar con calcio o sin calcio, mientras que la isoforma iNOS se le considera inducible y para ser activada no requiere la presencia de Ca^{2+} , esta se expresa en varios tipos celulares, principalmente en macrófagos y células endoteliales así como en células expuestas a endotoxinas y a diversas toxinas pro-inflamatorias. (Förstermann et al., 2012; Zhao et al., 2015; Figueroa-Vega et al., 2008).

Tabla 3. Genes de las isoformas humanas de las NOSs.

Isoforma NOS humana	Estructura del gen y tamaño	Localización cromosomal	Numero de aminoácidos (aa) en forma predominante , tamaño de la proteína
nNOS (<i>NOS1</i>)	29 exones, 28 intrones, organización estructural compleja, locus sobre la región de > 200 kpb	12q24.2-12q24.3 en el cromosoma 12	1434 aa, 161 kDa
iNOS (<i>NOS2</i>)	26 exones, 25 intrones, 37 kpb	17cen-q11.2 en el cromosoma 17	1153 aa, 131 kDa
eNOS (<i>NOS3</i>)	26 exones, 25 intrones, 21-22 kpb	7q35-7q36 en el cromosoma 7	1203 aa, 133 kDa

Fuente: Zhao et al., 2015

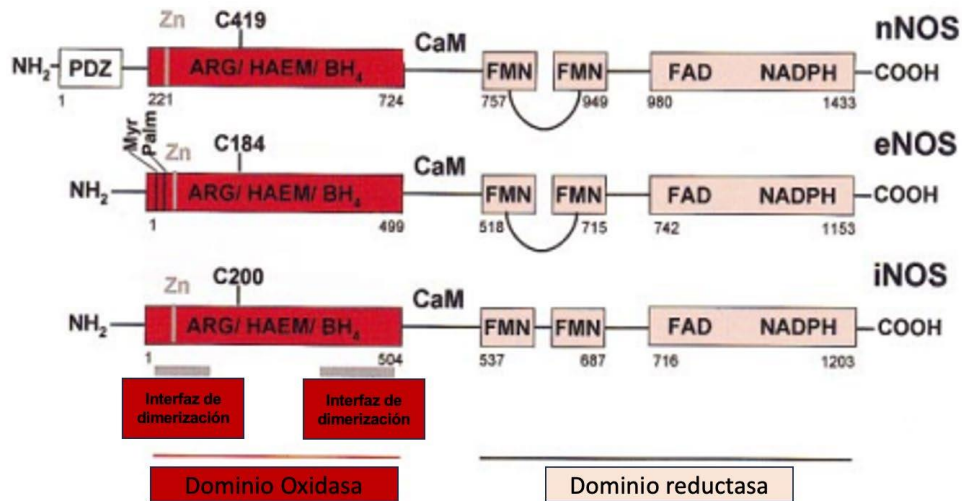


Figura 12. Estructura de los dominios de la nNOS, eNOS y la iNOS. Se muestran los dominios oxigenasa, reductasa y PDZ, el número de aminoácidos al principio y al final de cada uno de los dominios. En cada isoforma se muestra los residuos de cisteína que se unen al grupo hemo y el sitio de unión a CaM, en la isoforma eNOS se muestran los sitios de miristoilación (Myr) y palmitoilación (Palm) así como también la localización de las cisteínas que unen al zinc. En las isoformas nNOS y eNOS se muestra el bucle autoinhibitorio dentro de las regiones FMN, se indica el interfaz de dimerización en el dominio oxidasa. (Tomado de Alderton et al., 2001)

Estas proteínas catalizan la producción de NO y L-citrulina a partir del aminoácido L-arginina y O₂, también requiere la presencia de agentes reductores y varios cofactores entre ellos la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), la flavin dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN) la tetrahidrobiopterina (BH₄), la unión de Ca²⁺/Calmodulina y un átomo de zinc tetracoordinado estructural Förstermann et al., 2012; Alimoradi et al., 2019; Zhao et al., 2015).

Las tres isoformas de NOS se sintetizan como monómeros y para que se lleve a cabo la su función, la enzima requiere su dimerización; estas proteínas están constituidas por dominios de plegamiento independiente, unidos por un polipéptido que contiene una secuencia de unión a calmodulina. Contiene diferencias en sus extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal, el núcleo catalítico lo constituyen los dos dominios (Förstermann et al., 2012). El dominio oxidasa N-terminal tiene un grupo hemo que participa directamente en la oxidación de L-arginina y BH₄; el dominio reductasa C-terminal suministra electrones al dominio oxidasa.

El mecanismo de acción de las proteínas se lleva a cabo de la siguiente manera: la NOS funciona transfiriendo electrones de NADPH, a través de FAD y FMN en el carboxilo terminal del dominio reductasa, al grupo hemo en el dominio oxigenasa (dominio hemo-oxigenasa) en el amino terminal. En las NOSs en la mitad N-terminal está presente el dominio hemo-oxigenasa, de modo que los electrones del NADPH son transferidos desde el dominio reductasa de la NOS al centro activo, y es aquí en donde se une el cofactor BH_4 , oxígeno molecular O_2 , y el sustrato L-arginina, para transformarse en NO y L-citrulina, donde en el sitio hemo-oxigenasa los electrones son usados para reducir y activar el O_2 y oxidar L-arginina a L-citrulina y NO (Cooke 1997; Förstermann et al., 2012; Vaca-Villanueva et al., 2021; Zhao et al., 2015).

El papel fundamental de los cofactores flavina es permitir que un donador de dos electrones como es el NADPH, done electrones a un aceptor de un solo electrón, el hemo, a través de la formación de intermedios radicales semiquinona estables. En todas estas diflavina-reductasas los electrones fluyen en dirección $NADPH \rightarrow FAD \rightarrow FMN$ y este flujo es posible gracias a que los potenciales redox está equilibrados termodinámicamente. Se ha sugerido que el flujo de electrones entre las dos flavinas es el punto de control donde actúa la CaM ya que la transferencia de electrones desde el FAD al FMN es más lento en ausencia de Ca^{2+}/CaM . (Figura 13) (Bredt y Snyder 1994; Förstermann et al., 2012; Park et al., 2004; Zhao et al., 2015).

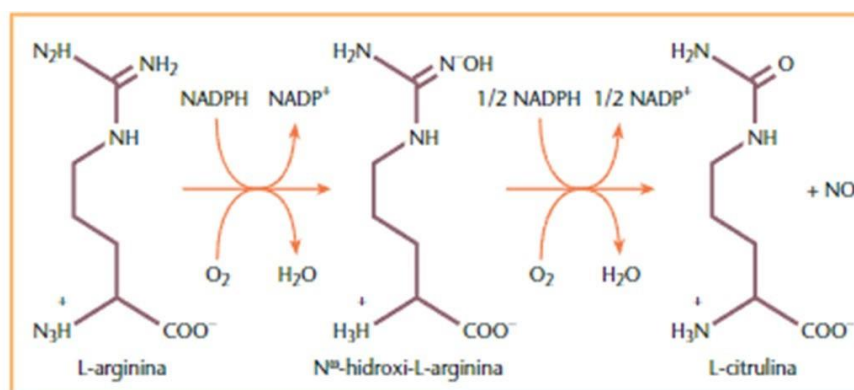


Figura 13. Producción biológica de NO catalizada por la NOS. A partir de la L-arginina se produce NO y L-citrulina la reacción requiere NADPH y O_2 . (Tomado de Centelles et al., 2004).

Las isoformas nNOS y eNOS necesitan un incremento de Ca^{2+} intracelular para que se dé la unión Ca^{2+} -Calmodulina, esta unión es reversible; en cambio para la activación de la iNOS es independiente de Ca^{2+} gracias a su gran avidez por Ca^{2+} -Calmodulina que hace que la enzima sea activa a los niveles basales de Ca^{2+} intracelular. Otra diferencia tiene que ver con la fuerza de asociación de sus monómeros y la influencia de L-arginina y BH_4 sobre su estabilidad y formación; en tanto a los dominios reductasa y hemo-oxigenasa se han realizado estudios e indican que son críticos para la dimerización de la nNOS y eNOS, mientras que para la iNOS solo está implicado el dominio hemo-oxigenasa

Por lo tanto, las tres isoformas de NOSs son enzimas complejas altamente reguladas, para la producción de NO cada una de ellas está sujeta a una amplia variedad de controles transcripcionales, transducciones y postraduccionales. Todos estos mecanismos están interrelacionados, lo que conduce a un complejo sistema de control para cada una de las isoformas de óxido nítrico sintasa que permite regular el tiempo, magnitud y distribución espacial de la liberación de NO (Bredt y Snyder 1994; Kim et al., 2003).

La NOS neuronal está constituida por 1.434 aminoácidos con un peso molecular de 160.8kDa. Fue el primer gen humano clonado y caracterizado, la NOS produce NO en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico, el NO está implicado en la regulación en la actividad y excitabilidad neuronal, en la plasticidad sináptica como también en los procesos de memoria y aprendizaje; además regula la liberación de neurotransmisores como la histamina, la acetilcolina y la serotonina y contribuye a los efectos protectores en el infarto de miocardio. Cabe señalar que nNOS se expresa también en las terminales postsinápticas de las neuronas, en células endoteliales, en células del miocito cardiaco, del musculo liso, en células musculares esqueléticas, en la capa adventical de las arterias del pene y células de la mácula densa del riñón. Se ha reportado que la nNOS participa en la vasodilatación neurológica en la microvasculatura de la piel de rata; la nNOS se expresa cuando hay lesión vascular en la íntima y en las células del músculo liso medial; cuando hay una inhibición en la expresión de nNOS aumenta la respuesta a varios vasoconstrictores, se suprime la producción de la cGMP y agudiza la formación de la neoíntima (Alimoradi et al., 2019; Figueroa-Vega et al., 2008; Zhou et al., 2009).

La nNOS es activada por diferentes mensajeros primarios como el glutamato, la noradrenalina, acetilcolina, vasopresina, oxitocina y algunas citocinas; también es activada por diferentes estímulos como el dolor, el estrés térmico, con tratamiento de colchicina o litio, por procesos infecciosos, por estimulación eléctrica en el músculo esquelético, cuando exista una disminución de la transmisión glutamatérgica, con algunos esteroides como la estradiol o testosterona (Figuroa-Vega et al., 2008).

La NOS inducible es activada por la presencia de infecciones, inflamaciones crónicas y la presencia de tumores; la iNOS libera grandes cantidades de NO en respuesta a citocinas como el interferón gamma (IFN), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), y la interleucina 1 (IL-1). Se ha reportado que hay una sobreexpresión de iNOS en enfermedades inflamatorias crónicas como, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, cirrosis primaria biliar, hepatitis autoinmunitaria, como también en diferentes tumores como cáncer de ovario, mama, estómago y tiroides; la iNOS participa también en procesos como la angiogénesis y la apoptosis. Para que se active la región promotora de la iNOS se requiere del factor regulador del interferón 1 y el factor nuclear κ , potenciador de la cadena ligera de células B activadas, por lo anterior explica porque la iNOS es característica de la inflamación (Figuroa-Vega et al., 2008; Förstermann et al., 1994; Zhao et al., 2015).

8 SINTASA DEL ÓXIDO NÍTRICO ENDOTELIAL

La eNOS está codificada por el gen *NOS3* localizado en el cromosoma 7 en la región 7q35-36 en los seres humanos, está conformado por 26 exones que abarcan 21 kb. (Figura 14) (Stamler et al., 2017; Tran et al., 2022).

La eNOS es principalmente expresada en las células endoteliales, sin embargo, también se encuentra en miocitos cardiacos, plaquetas y en ciertas neuronas del cerebro, en sincitiotrofoblastos de la placenta humana y en células epiteliales del túbulo renal LLC-PK1. La región promotora del gen *NOS3* se encuentran dos regiones reguladoras que son clave para la transcripción basal de la eNOS: un dominio regulador positivo I, que corresponde al sitio de reconocimiento del factor de transcripción Sp1 y la unión de tres nucleoproteínas identificadas como SP1 y dos variantes de Sp3; un segundo dominio positivo II, que forma complejos de nucleoproteínas con los factores de transcripción Ets, Efl-1, YY1, Sp1 y la proteína de dedos de zinc (MAZ) asociada a MYC. Sp1, Sp3, Ets-1, Elf-1 y YY1 están involucrados en la regulación positivamente de la actividad del promotor de la eNOS mientras que MAZ parece inhibir la actividad del promotor de la eNOS (Oliveira et al., 2017). Los mecanismos complejos pueden afectar la regulación postranscripcional de la eNOS como las alteraciones de la estabilidad del RNA mensajero, (RNAm) el transporte nucleoplasmático y la localización subcelular estas modificaciones son a través de por elementos del RNA, actuando en *cis* ubicados en las regiones no traducidas (UTR) del RNAm 5' y 3'-UTR, en los mecanismos postraduccionales también son relevantes para la actividad de la eNOS ya que en estado de reposo hay una fuerte interacción con caveolina-1; esto es las caveolas inactivan a la proteína; cuando la proteína es activada por calcio, la calmodulina (CaM) se une a la proteína desplazando a la caveolina-1 (Oliveira et al., 2017).

La principal isoforma que regula la función vascular es la eNOS y esta puede ser activada por varios estímulos: *shear-stress* (fuerza de cizallamiento) por acetilcolina, histamina, bradicinina y 17 β -estradiol, en ambos estímulos se requiere o no concentraciones de intracelular $[Ca^{2+}]_i$, cuando es dependiente $[Ca^{2+}]_i$ los agonistas histamina, acetilcolina o bradicinina se une a los receptores de membrana de las células endoteliales para aumentar la

$[Ca^{2+}]_i$, cuando la activación es independiente del $[Ca^{2+}]_i$ la eNOS es fosforilada en varios residuos de serinas (Ser), treoninas (Thr) y tirosinas (Tyr). La fosforilación de serina 1177 estimula el flujo de electrones dentro del dominio de la reductasa, el Ca^{2+} aumenta la sensibilidad de la enzima estímulo de la eNOS es el; esta activación está mediada por la fosforilación de la enzima; la eNOS puede ser fosforilada. (Figura 15) (Figuroa-Vega et al., 2008; Förstermann et al., 1994; Park et al., 2004).

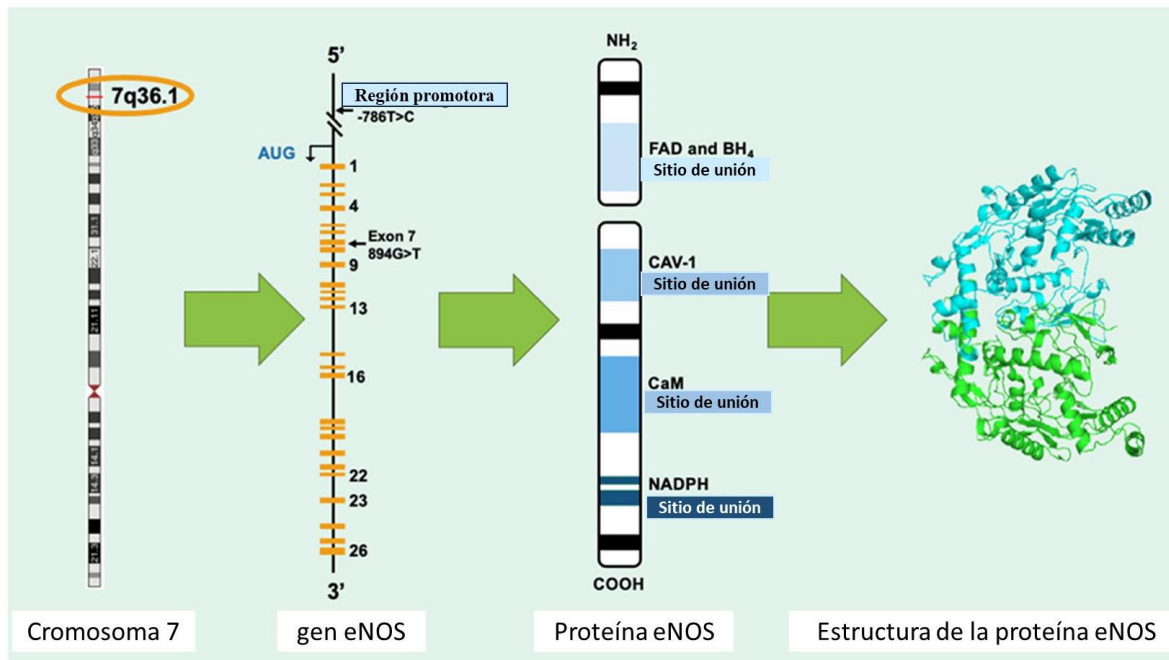


Figura 14. Esquema del gen que codifica la eNOS. Extremo izquierdo: El gen de la eNOS se localiza en 7q35-36, contiene 26 exones con el sitio de inicio de la transcripción designado por AUG en la región promotora. Se indican los polimorfismos en la región promotora y en el exón 7. En el extremo derecho: se muestra el esquema de la proteína de la eNOS. (Tomado y modificado de Tran et al., 2022)

Similar en la nNOS, la unión de Ca^{2+} /Calmodulina es importante para la regulación de su actividad en la eNOS. La eNOS sintetiza NO de forma pulsátil, aumentando la actividad de la enzima cuando aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} , ya que el Ca^{2+} induce la unión de calmodulina. Existen proteínas que interaccionan con la eNOS y sirven como modulador alostérico que activa y promueve a la eNOS; un ejemplo es la proteína 90 (hsp90).

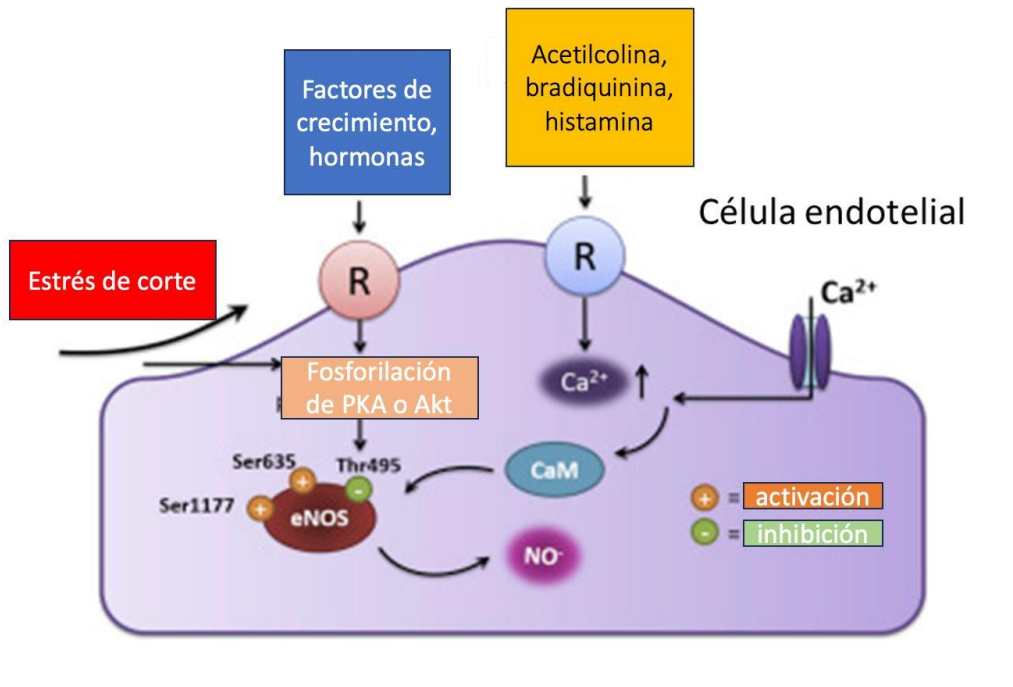


Figura 15. Activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) con calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ y sin $[Ca^{2+}]_i$. Dependiente de $[Ca^{2+}]_i$: En el esquema se puede observar que agonistas como la histamina, acetilcolina o bradiquinina actúan sobre receptores específicos de la membrana de las células endoteliales para aumentar la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ que se une a la calmodulina (CaM) conduciendo a la activación del dominio de unión de la eNOS a la para la producción de NO. Independiente de $[Ca^{2+}]_i$: la fosforilación de la eNOS en serina (Ser) 1177 y Ser 1179 son importantes para la activación de la enzima, la inhibición de la enzima está dada por la fosforilación en treonina (Thr) 495; las respuestas al estrés hemodinámico se llevan a cabo a través de esta vía independiente a calcio. (Tomado y modificado de Zhao et al., 2015)

Otra interacción que realiza la eNOS con proteínas es con las caveolinas -1, esta interacción se da ya que una fracción de eNOS se encuentra en las caveolas, la caveolina-1 es un tónico inhibidor de la actividad de la eNOS. Por lo tanto, el reclutamiento de calmodulina y de la proteína hsp90 a eNOS puede desplazar a la caveolina-1, lo que conduce a la actividad de la enzima (Park et al., 2004; Kim et al 2003).

Se ha establecido que el óxido nítrico derivado del endotelio es uno de los principales contribuyentes a la regulación vascular en la salud y la enfermedad (Costa et al., 2016).

Las principales funciones de la eNOS son las siguientes:

- **Vasodilatación e inhibición de agregación y adhesión plaquetaria.**

La eNOS es un regulador homeostático de numerosas funciones cardiovasculares esenciales. El NO derivado de la sintasa del óxido nítrico endotelial dilata todos los vasos sanguíneos por la estimulación del guanilato ciclasa soluble e incrementa cGMP en las células del músculo liso. Si existe una delección en el gen de la eNOS esto nos conduce a una presión sanguínea elevada. El NO liberado hacia el lumen vascular actúa como un potente inhibidor de la agregación y adhesión plaquetaria en la pared vascular. Además de la protección contra la trombosis, este también evita la liberación de factores de crecimiento derivados de plaquetas.

- **Inhibición y adhesión de leucocitos e inflamación vascular.**

El óxido nítrico controla la expresión de genes involucrados en la aterogénesis, puede inhibir la adhesión de leucocitos en la pared vascular al interferir con la capacidad de la molécula de la adhesión de leucocitos CD11/CD18 para unirse a la superficie de la célula endotelial o al suprimir la expresión de CD11/CD18 en los leucocitos. (Pérez-Neri 2015).

- **Control vascular de la proliferación del músculo liso.**

Se ha demostrado que el óxido nítrico inhibe la síntesis de ADN, la mitogénesis y la proliferación de las células vasculares del músculo liso; este efecto antiproliferativo es probable que sea mediado por el cGMP (Pérez-Neri 2015).

- **Estimulación de angiogénesis por el NO derivado de la eNOS.**

El óxido nítrico derivado de la eNOS juega un papel crítico en la angiogénesis post-natal ya que media señales desencadenadas por factores angiogénicos. La eNOS también es importante para la formación colateral y la angiogénesis post-isquemia (Pérez-Neri 2015).

- **Activación de las células progenitoras del endotelio por el NO derivado de la eNOS.**

El •NO derivado de la eNOS juega un papel en la activación de células progenitoras endoteliales. Se ha visto que los ratones que no tienen gen de la eNOS muestran una neovascularización alterada; esto estaba relacionado con un defecto en las movilizaciones de las células progenitoras. Cuando existe una deficiencia en el gen de la eNOS se observa que la movilización de células progenitoras endoteliales por VEGF se reduce; esto sugiere que la movilización de células progenitoras de la médula ósea se ven afectada en la insuficiencia de la eNOS (Pérez-Neri 2015).

- **Papel fisiopatológico de la eNOS.**

Se ha mostrado que en pacientes con factores de riesgo cardiovasculares (tales como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y fumadores, etc.) y pacientes con enfermedad vascular muestran disfunción endotelial y no tienen la posibilidad de generar la cantidad adecuada de NO. En la actual literatura existe una concordancia de que la reducida actividad biológica de NO causada por el estrés oxidativo así como de la reducción de la síntesis ha sido identificada como el mecanismo de mayor relevancia en el proceso multifactorial en la disfunción endotelial y en la participación de las principales disfunciones cardiovasculares; por lo tanto, la reducción del NO y la consecuente disfunción endotelial determinan en el ambiente vascular, el desencadenamiento de los eventos como alteraciones en el tono vascular, disfunciones tromboticas, proliferación y migración de las células musculares lisas y adhesión de los leucocitos; también ocurre un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y estas reducen la disponibilidad de NO endotelial por diferentes vías: inactivación directa de NO por superóxido, con formación de peroxinitrito (ONOO⁻), reducción en la expresión y en la actividad de las sintasas del NO por la alteración de sus sustratos o cofactores, por el aumento en los niveles de dimetilarginina asimétrica (ADMA) y por la oxidación del BH₄, desacopla la eNOS (Pérez-Neri 2015).

8.1 Polimorfismos de la eNOS

Se le llama polimorfismos funcionales aquellos que modifican la expresión o actividad de la proteína. En los últimos años se han identificado diversos polimorfismos de la eNOS y se han asociados a diferentes enfermedades, especialmente los siguientes polimorfismos; el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) localizado en la región promotora (T-786C), la sustitución de una guanina (G) por una timina (T) en el nucleótido 894 en el exón 7 conduciendo a un cambio de aminoácido de ácido glutámico (Glu) a ácido aspártico (Asp) en el codón 298 (Glu298Asp) y el polimorfismo de variable de repeticiones en tándem de 27 paras de bases (pb) (27pb-VNTR) en el intrón 4, estos han recibido atención debido a su funcionalidad para la actividad de la eNOS. El T786C reduce la actividad promotora por lo que afecta la expresión de la proteína así como su actividad; el polimorfismo G894T provoca un cambio en la estructura de la eNOS por lo que reduce la actividad de la proteína; sin embargo en el polimorfismo 27pb-VNTR se ha descubierto dos alelos, en el cual el mayor tiene 5 repeticiones en tándem de 27 pb (eNOS-4b) (GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/GGGGGTGAG) y el menor tiene cuatro repeticiones eNOS4a); el 27 pb-VNTR disminuye la concentración plasmática del NO; a estos polimorfismos se les ha relacionado con enfermedades cardiovasculares así como renales. (Costa et al., 2016; Förstermann et al., 1994; Kim et al., 2003; Thameem et al., 2008).

8.2 Polimorfismo intrón 4ab 27 VNTR (número variable de repeticiones en tándem) del gen NOS3.

Este polimorfismo corresponde a una repetición de 27 pb localizado en el intrón 4. El alelo 4b está conformado por la repetición de 5 veces consecutivas la secuencia de 27 pb, mientras que el alelo 4a presenta 4 veces la secuencia repetida; se ha reportado que la variante 4a presenta niveles plasmáticos de NO más bajos, así como una disminución en la expresión de la eNOS. Este polimorfismo regula la expresión de la eNOS mediante la formación de pequeños RNA (siRNA), las células endoteliales que comprenden cinco copias presentan una mayor cantidad de siRNA y menor cantidad de RNA mensajero, en comparación a las células que presenta cuatro repeticiones (Figura 16).

El polimorfismo 4a/b se ha asociado con diferentes enfermedades como por ejemplo el cáncer, la hipertensión, enfermedades; cardiovasculares, diabetes mellitus con la progresión de nefropatía diabética; hemorragia gastrointestinal. Se ha reportado que en sujetos australianos, japoneses y afroamericanos este polimorfismo está asociado en la aterosclerosis, coronaria e infarto de miocardio, sin embargo, en la población china el polimorfismo 4ab parece ser un factor de riesgo importante de accidente cerebrovascular isquémico (Förstermann et al., 1994; Kim et al., 2003; Costa et al., 201et al., 2004; Ramírez-Patiño et al., 2013; Hassan et al., 2004; Forgerini et al., 2022; Shi et al., 2008).

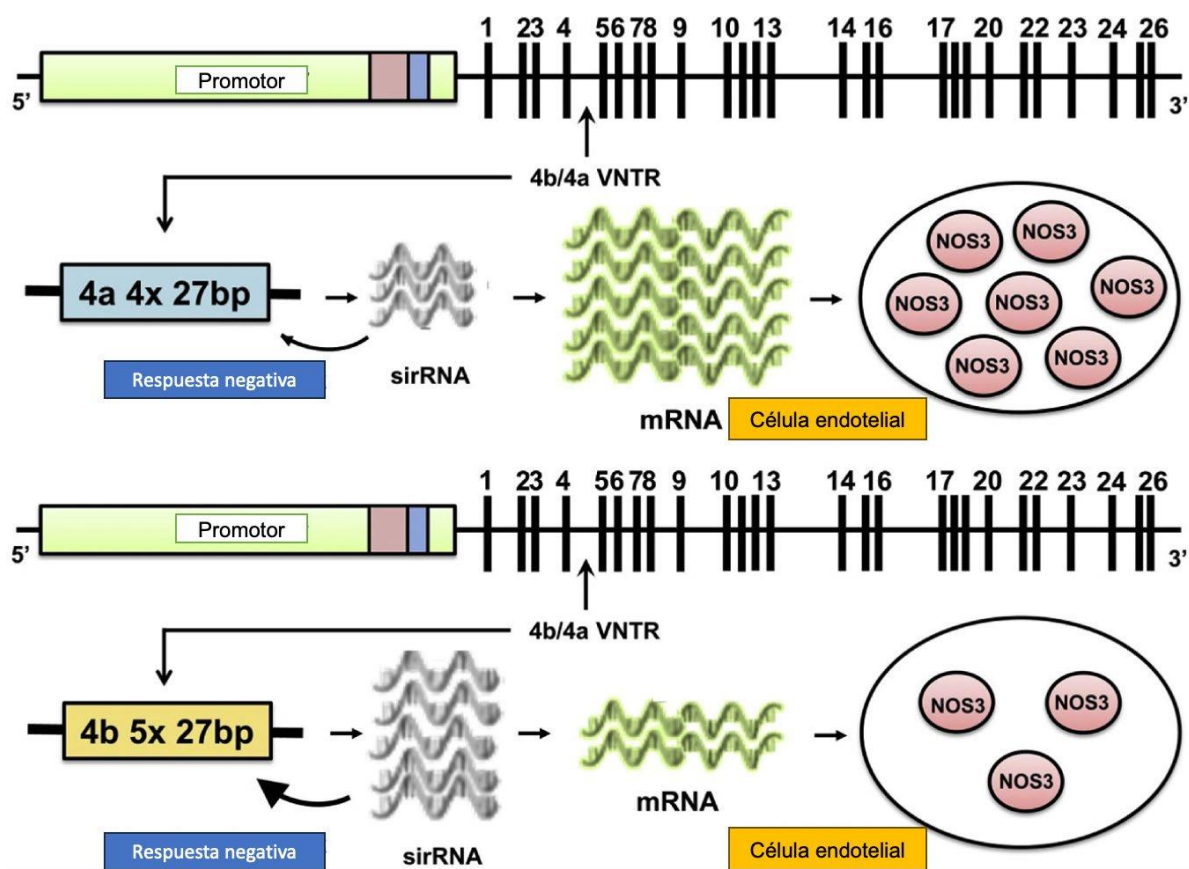


Figura 16. Polimorfismo 4a/4b VNTR. La actividad de este polimorfismo esta relaciona con la formación de siRNA (suprimen la expresión de los genes mediante el corte del RNAm complementario en dos mitades); en la imagen se observa que en células endoteliales que contiene el alelo 4b muestran niveles más altos de siRNA y por consiguiente una disminución en la expresión de eNOS, en comparación de aquellas células que contiene en alelo 4a (imagen de arriba). (Tomado de Oliveira-Paula et al., 2017)

8.3 Polimorfismo G894T del gen *NOS3*

El polimorfismo se ubica en el exón 7 del gen cuya variante 894 G>T da como resultado un cambio en el aminoácido de ácido glutámico por ácido aspártico en la posición 298 de la proteína (Glu298Asp). Este polimorfismo afecta a eNOS en las modificaciones postraduccionales, esto es disminuyendo la unión de la eNOS con caveolina-1 por lo tanto reduce la disponibilidad de la eNOS en las caveolas; dando como resultado una menor cantidad de eNOS disponible para la activación mediante calmodulina activada por Ca^{2+} , por lo que habrá una disminución de la actividad de la eNOS y por consiguiente una reducción de NO. (Figura 17) Se ha demostrado en estudios genéticos la identificación de este polimorfismo con las siguientes enfermedades, coronarias y de arterias carótidas, como el infarto al miocardio (IM) así como la arteriosclerosis carótida, la presencia de este polimorfismo es el responsable de la síntesis reducida de NO y del desarrollo de hipertensión, particularmente en caucásicos y en poblaciones del norte de África, en general se ha reportado que el gen de la eNOS está relacionado con pacientes con EVC isquémico en los indios del norte, en pacientes con diabetes y defectos cardíacos congénitos (Alderton et al., 2001; Bredt y Snyder 1994; Costa et al., 2001; Förstermann et al., 1994; Hassan et al., 2004; Kaur et al., 2015; Kim et al., 2003; Park et al., 2004; Tran et al., 2022)

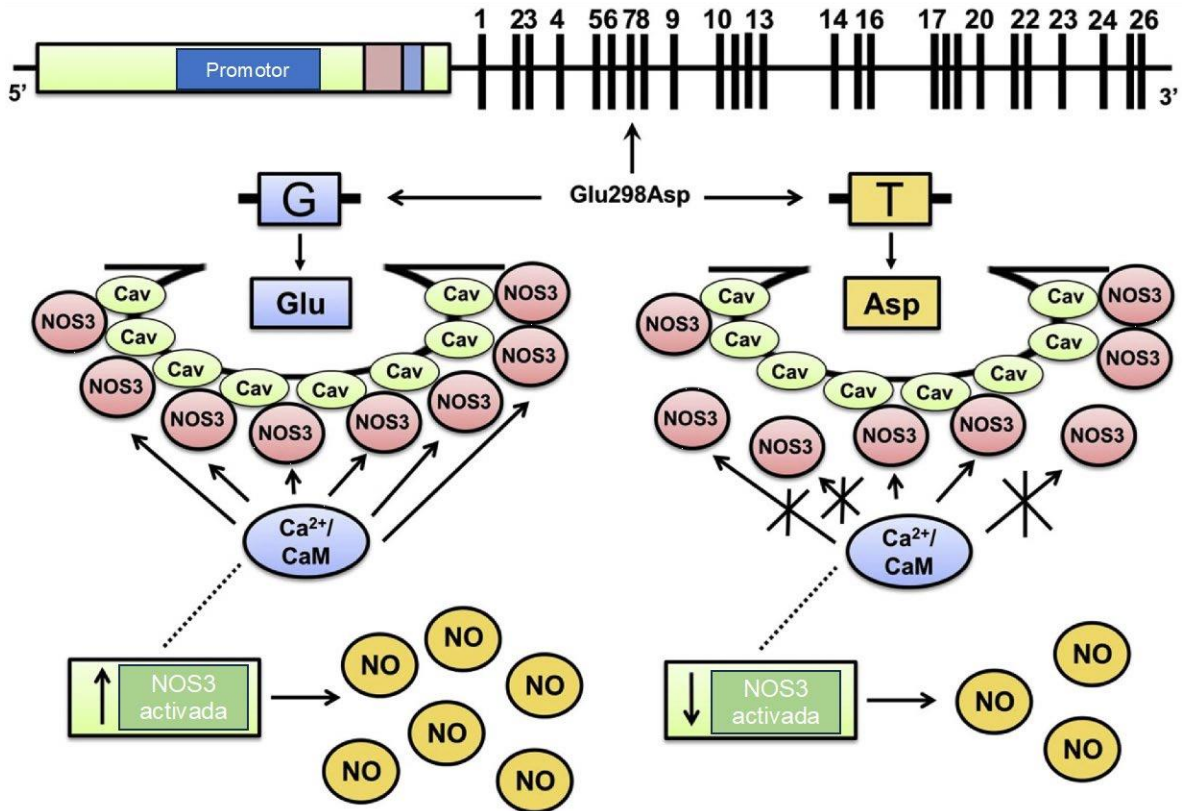


Figura 17. Polimorfismo Glu298Asp. El polimorfismo Glu298Asp corresponde a una sustitución de guanina (G) por timina (T) en la posición 894 del gen *eNOS*, este cambio lleva un cambio de ácido glutámico (Glu) por ácido aspártico (Asp) en la posición 296 de eNOS; dando como resultado una menor unión a caveolina-1 y una menor disponibilidad de eNOS en la fracción caveolar de células endoteliales, dando como resultado menor disponibilidad para la activación de la CaM activada por Ca²⁺, reduciendo la actividad de eNOS y formación de NO. (Tomado de Oliveira-Paula et al., 2017)

9 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La TVC carece de una explicación clara, pero involucra tanto factores adquiridos como factores genéticos. La eNOS es esencial para mantener la homeostasis vascular tanto en la salud como en la enfermedad y cualquier alteración genética como la presencia de un polimorfismo podría afectar su expresión, así como también su estructura proteica, dando como resultado una disfunción endotelial vascular grave.

El óxido nítrico (NO) es un mensajero fisiológico molecular que se produce en el cuerpo humano en una gran variedad de tipos celulares, y participa en procesos como el mantenimiento basal del flujo de sangre cerebral, la vasodilatación cerebral, la integridad vascular, la inhibición de la proliferación del músculo liso, el sistema cardiovascular y en la activación de la respuesta inmune.

Una de las principales consecuencias del mal funcionamiento en la producción o disponibilidad del NO es la autorregulación cerebral, el daño endotelial en la barrera cerebral sanguínea, así como los diversos rasgos característicos del Enfermedades Cerebrales de Vasos pequeños (SVD).

La regulación de este potencial mensajero, está mediada por la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS); en la cual se han identificado tres mutaciones que se asocian con el desarrollo de enfermedades vasculares: la T-786C que se localiza en la región promotora de la transcripción, la eNOS 4ab la cual se encuentra en el intrón 4 la cual está relacionada con la alteración de la actividad del promotor y la localizada en el exón 7 *G894T* que codifican el cambio de un aminoácido glutamato a aspartato (Glu894Asp).

Se ha reportado que estos tres polimorfismos en el gen de la óxido nítrico sintasa endotelial aumentan la disfunción endotelial y se han asociado a enfermedades vasculares; el polimorfismo T-786C, un factor de riesgo independiente para un ataque recurrente de espasmo coronario, el alelo 4a asociado con alteración de función pulmonar, enfermedad de arterias coronarias y estrés oxidativo (EPOC) y el G894T se ha asociado con la enfermedad trombótica incluida la trombosis venos, la aterosclerosis aórtica y la cardiopatía isquémica; los cuales podrían disminuir los niveles de NO.

Por lo anterior, en este proyecto planteamos estudiar la posible asociación de los polimorfismos G894T y el intrón 4ab en el gen de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial en la TVC en la población mexicana.

10 HIPÓTESIS

El riesgo de desarrollar trombosis venosa cerebral está relacionado con la presencia de los polimorfismos G894T y el intrón 4ab en el gen de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial, por lo que serán más frecuentes en los pacientes que en los controles.

11 OBJETIVOS

11.1 Objetivo general

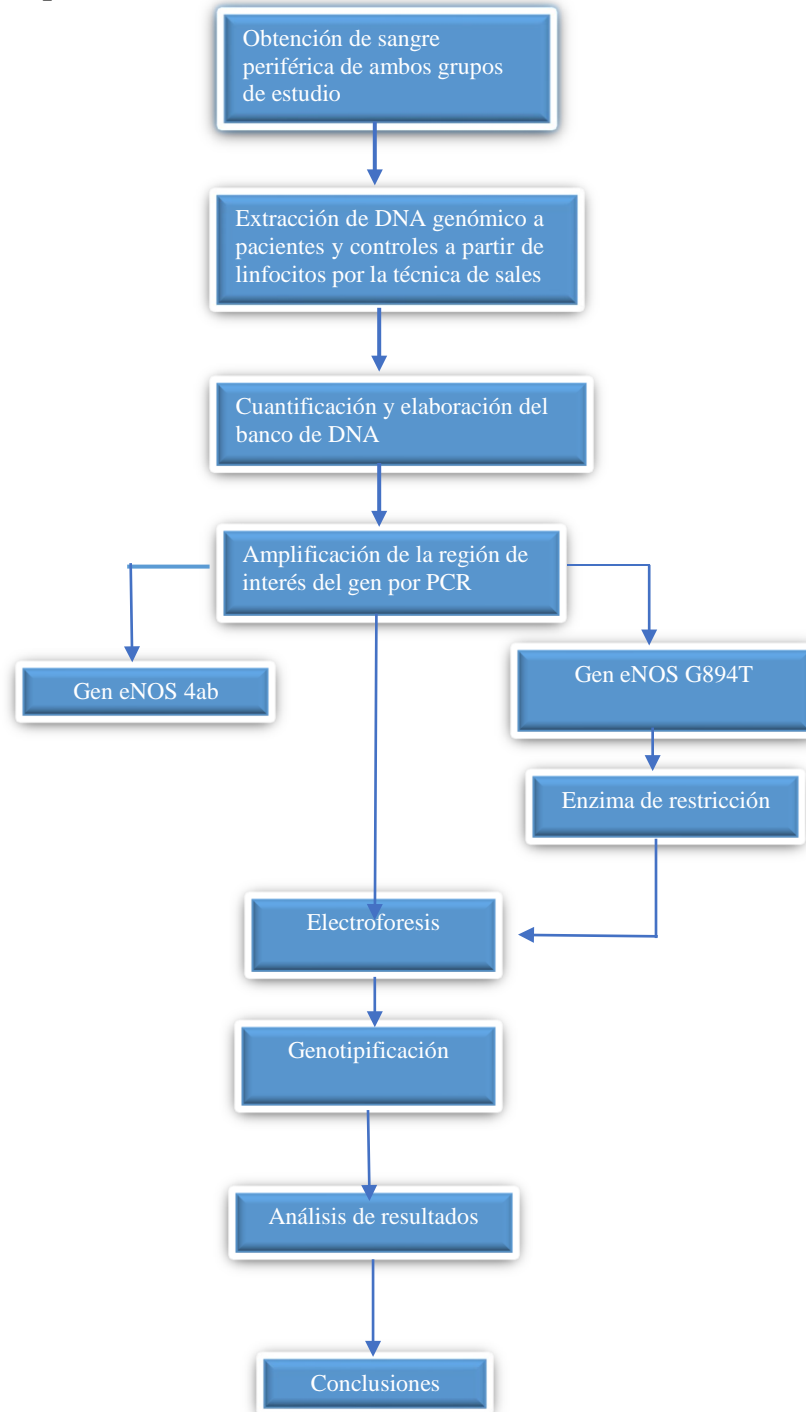
Determinar si existe asociación entre los polimorfismos Glu298Asp y del intrón 4ab de la eNOS con la trombosis venosa cerebral.

11.2 Objetivos específicos

- Determinar y analizar por PCR los polimorfismos en pacientes mexicanos con trombosis venosa cerebral.
- Estudio de los polimorfismos G894T y el intrón 4ab de 27 VNTR del gen de la enzima sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS) en la población mexicana.
- Elaboración de banco de DNA de controles.
- Estandarizar por técnicas moleculares el diagnóstico de polimorfismos en enfermedades cerebrovasculares.
- Determinar la posible asociación de variantes genéticas del gen de la eNOS en la TVC.
- Determinar la frecuencia de estos polimorfismos en pacientes con TVC y controles de la población mexicana.

12 MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 Estrategia experimental



12.2 Listas de materiales, equipo y reactivos.

Agitadores magnéticos	Papel Parafilm
Espátula	Pipetas Pasteur
Gasas	Plástico autoadherible
Guantes estériles	Probetas: 50,100, 250, 500, 1000, y 2000 ml
Jeringas 20 ml	Puntas de plástico
Matraces Erlenmeyer: 250, 500 ml, 3.8 L	Termómetro
Matraces volumétricos: 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml	Tubos de ensayo
Micropipetas: 20,100,200,1000 ml	Toallas de papel
Microtubos: 200, 500, 1000 μ l	Tubos cónicos estériles de 45 ml
Tubos cónicos estériles de 15 ml	Microtubos para PCR
Microtubos eppendorff	Vasos de precipitados: 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml

Equipos

Balanza analítica	Campana de extracción
Balanza granataria	Centrífuga refrigerada
Baño maría	Congelador
Baño seco	Espectrofotómetro
Bomba de vacío	Gradillas
Cámara vertical y horizontal de electroforesis	Horno de microondas
Micropipetas: 20, 100, 200, 1000 ml	Parrillas de calentamiento y agitación
Termociclador	Vórtex
Agitadores magnéticos	Papel Parafilm
Espátula	Pipetas Pasteur
Gasas	Plástico autoadherible
Guantes estériles	Probetas: 50,100, 250, 500, 1000, y 2000 ml
Jeringas 20 ml	Puntas de plástico
Matraces Erlenmeyer: 250, 500 ml, 3.8 L	Termómetro
Micropipetas: 20,100,200,1000 ml	Toallas de papel

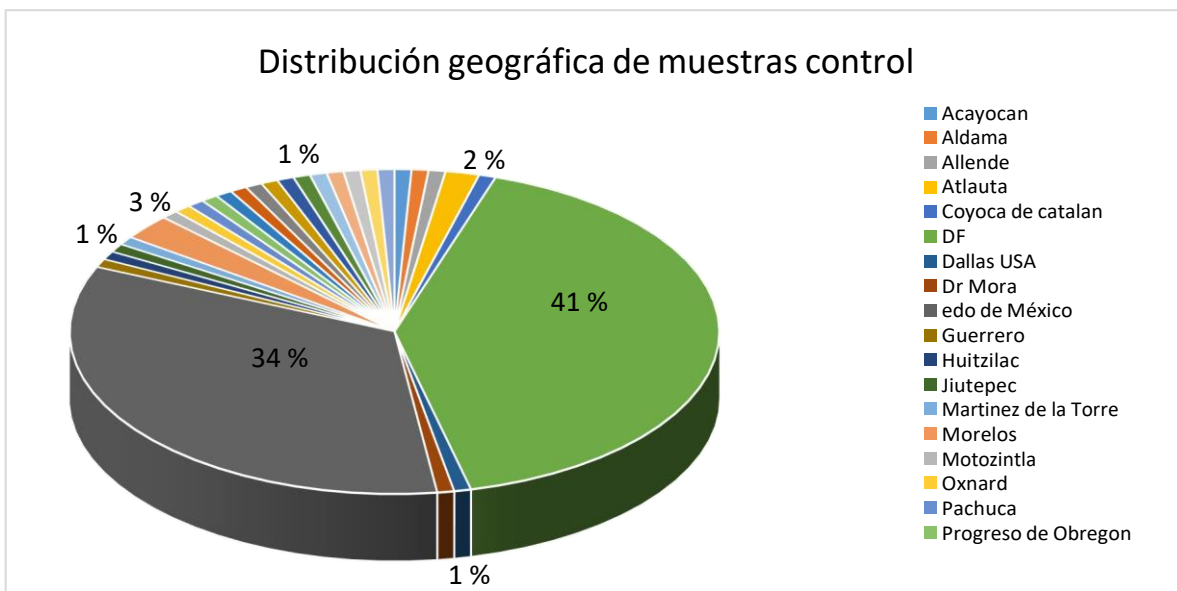
Matraces Volumétricos: 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml	Tubos de ensayo
Microtubos: 200, 500, 1000 µl	Tubos cónicos estériles de 45 ml
Tubos cónicos estériles de 15 ml	Microtubos para PCR
Microtubos eppendorff	Vasos de precipitados: 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 ml

Reactivos

Acrilamida 10 y 40% (Invitrogen)	Solución amortiguadora de lisis de células rojas (ALCR)
Agarosa: 0, 8, 2.0, 3.0, 3.5, y 4.0 % (GIBCO BRL)	Solución amortiguadora de carga o corrida (colorante)
Agua destilada	Bromuro de etidio
Agua inyectable	Cloroformo / alcohol isoamílico
Alcohol etílico 100% (J.T Baker)	Cloruro de Magnesio (Merck)
Solución amortiguadora de lisis de células blancas (ALCB)	Cloruro de Sodio 5 M (J.T. Baker)
Cloruro de Sodio 5 Mm (J.T. Baker)	Cloruro de Sodio Saturado (J.T. Baker)
Dodecilsulfato de sodio 10 % (SDS) (J.T. Baker)	DMSO 7% Y 7.5%
EDTA (Reproquifin)	Enzima Hinf I (Invitrogen)
Enzima Taq I (Invitrogen)	Fenol / Cloroformo / Alcohol isoamílico
Hielo	Hipoclorito de sodio
Taq PCR Mastermix (Qiagen)	Marcadores de peso molecular en escalera de 25 y 100pb (Promega y Roche)
Oligonucleotidos (Alpha DNA y Bio-Synthesis): (eNOS intrón 4ab/G894T)	Persulfato de Sodio 10%
Organopolisiloxano clorado en heptano-SIGMACOTE (Sigma)	Solución amortiguadora TBE 10 X
Solución amortiguadora TBE 1X	Solución amortiguadora TBE 0.5 X
N,N,N,N-Tetrametiletilendiamina- (Sigma)	TEMED

12.3 Sujetos de estudio y recolección de muestras control.

Controles: Se recolectaron muestras de sujetos mexicanos sanos los cuales fueron reclutados del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se les tomó una muestra de sangre periférica para la extracción del DNA por el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico; y fueron utilizadas para la amplificación de las regiones donde se encuentran las mutaciones. Se utilizaron 117 muestras de sujetos mexicanos sanos como controles de diferentes localidades para el polimorfismo G894T (Gráfica 1). y 326 sujetos para el polimorfismo del intrón 4 de 27 pb VNTR del gen de la eNOS.



Gráfica 1. Distribución Geográfica de controles

Pacientes: Se utilizaron muestras de los pacientes con trombosis venosa cerebral del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se utilizaron 61 muestras de DNA de pacientes con TVC idiopática reclutados por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. A todos los sujetos se les preguntó edad y género para el estudio de los polimorfismos G894T y el intrón 4ab del gen de *eNOS* como se muestra a continuación.

a) Polimorfismo G894T del gen de *eNOS*

	GÉNERO	EDAD PROMEDIO
Controles	n = 117	
	F = 56	35 años; (22-57)
	M = 61	34 años; (23-63)
Pacientes	n = 61	
	F = 55	35 años; (23-69)
	M = 6	34 años; (7-50)

b) Polimorfismo del intrón 4ab del gen de *eNOS*

	GÉNERO	EDAD PROMEDIO
Controles	n = 326	
	F = 79	34 años (25-47)
	M = 247	36 años (25-52)
Pacientes	n = 61	
	F = 55	35 años (23-69)
	M = 6	34 años (7-50)

12.4 Lisis celular.

Para la lisis celular se tomaron 25 ml de sangre periférica con 2.5 ml de ACD (anticoagulante), posteriormente la sangre se vació en tubos cónicos estériles de 50 ml y se agregó una solución de BLCR (Amortiguador de Lisis de Células Rojas) hasta aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes del tubo, agitando vigorosamente durante 5 minutos aproximadamente, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante de eritrocitos lisados y se añadió nuevamente la solución BLCR para centrifugar las veces necesarias para obtener el paquete de glóbulos blancos. El paquete de glóbulos blancos se re-suspendió en 1 ml de BLCR y se almacenó a 4°C, para extraer el DNA posteriormente.

12.5 Extracción de DNA por sales (micrométodo).

El botón leucocitario se re-suspendió en 886 μ l de solución BLCB y 308 μ l de cloruro de sodio (NaCl) saturado, se agregó poco a poco 46 μ l de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10 %, 500 μ l de solución BLCB y 308 μ l de NaCl saturado; se mezcló durante 5 min en el vórtex, posteriormente se pasó a un tubo de 15 ml, para centrifugarlo a 5000 rpm a 4° C durante 10 minutos; se recolectó el sobrenadante en un tubo y se le añadió un volumen de fenol/cloroformo, para centrifugarlo a 5000 rpm a 4° C con un tiempo de 10 minutos, a continuación se recolectó nuevamente el sobrenadante en otro tubo y se le adicionó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico, centrifugándolo a 5000 rpm a 4°C durante 10 min; después se retiró el sobrenadante y se precipitó con dos volúmenes de etanol frío o un volumen de isopropanolol (v/v). Se decantó todo el alcohol para luego re-suspender el DNA con 1 ml de agua inyectable colocándolos en microtúbulos de 1 ml para su disolución en baño María a 50°C.

12.6 Cuantificación del DNA.

Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm, mientras que las proteínas absorben a una longitud de onda de 280 nm. Por lo tanto, a estas longitudes la absorción es proporcional a la concentración de DNA. De este modo la concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de la absorbancia de 260nm, mientras que la relación de absorbancias 260/280 se utiliza para evaluar la pureza de las muestras.

Para la purificación del DNA se llevó a cabo el siguiente protocolo: se lavaron las celdas de cuarzo con agua destilada y alcohol al 70%, realizando una dilución 1:20 a partir de DNA genómico con 15 μ l de la muestra y 285 μ l de agua inyectable.

En una de las celdas se adicionó agua destilada como blanco mientras que en la otra celda se colocó la muestra de DNA diluido; posteriormente se lee al espectrofotómetro en el rango visible / ultravioleta (V/UV) a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

Cabe mencionar que la concentración de DNA obtenida está dada en ng/μl. La unidad de absorbancia (Abs) a 260 nm equivale a 50ug/ml de DNA doble cadena: Abs 260nm X factor de dilución X 50 μg/ml DNA. La relación A260/280 es muy estable y se considera que un DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. La pureza de DNA aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6; un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio A260/280 > 2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra.

12.7 Determinación de los polimorfismos por PCR.

Los polimorfismos fueron identificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés), utilizando 100 ng de DNA extraído para ambos polimorfismos, el total de la composición de la reacción para la amplificación de muestra para PCR fue de 20 μL como se observa en la tabla 4 y 5.

Tabla 4. Composición de la reacción para la amplificación de muestras por PCR para G894T TVC y controles.

DNA (100ng /1μL)	1μL
Oligonucleótido (F)	1μL
Oligonucleótido (R)	1μL
Master mix	10μL
H₂O	7μL
Total: 20 μL	

Tabla 5. Preparación para la amplificación de muestras por PCR para el intrón 4ab

	TVC	Controles
DNA (100ng /1μL)	1μL	2μL
Oligonucleótido (F)	2μL	1μL
Oligonucleótido (R)	2μL	1μL
Master mix	10μL	10μL
H₂O	5μL	7μL
Total: 20 μL		

- **Análisis del polimorfismo G894T en el exón 7 del gen de la *eNOS*.**

La presencia del polimorfismo G894T se determinó en todos los sujetos (controles y pacientes) utilizando un par de oligonucleótidos como se observa en la tabla 6. El volumen final se mezcló y se centrifugó durante un minuto en la microcentrífuga, posteriormente se colocó en un termociclador con las condiciones descritas como se muestra en la tabla 7.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para el polimorfismo G894T.

Polimorfismo	Dirección	Secuencia
G894T	<i>forward</i>	5'AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'
	<i>reverse</i>	5'TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'

Tabla 7. Protocolo de PCR

	Temp	Tiempo
Temperatura máxima	94°C	4 min
Inicio	94°C	1 min
Alineación	58°C	1 min
Elongación	72°C	2 min
35 ciclos		
Terminación	72°C	7 min

Los productos de amplificación por PCR fueron digeridos por la enzima de restricción *BanII*, utilizando 2.2 µl de la enzima en reacciones de 33µl de volumen final, la digestión se llevó a cabo durante 16 h a 37°C ver tabla 8.

Tabla 8. Composición de la reacción de restricción

Enzima BanII	2.2µL
Amortiguador	19.8µL
H₂O	11µL
Tiempo de digestión	16 horas a 37°C

Análisis del polimorfismo del intrón 4 del gene de la *eNOS*.

La presencia del polimorfismo 4ab se determinó en controles y pacientes utilizando un par de oligonucleótidos como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para el polimorfismo del intrón 4ab.

Polimorfismo	Dirección	Secuencia
4ab	<i>forward</i>	5'GCATTCAGCACAGGCTGGA-3'
	<i>reverse</i>	5'GCTCCAGGGGCACCTCAA-3'

La reacción se realizó con el protocolo indicado en la tabla 10.

Tabla 10. Protocolo de PCR

	Temp	Tiempo
Temperatura máxima	94°C	5 min
Inicio	94°C	1 min
Alineación	58°C	1 min
Elongación	72°C	1 min
35 ciclos		
Terminación	72°C	5 min

13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias genóticas de los polimorfismos del gen de la *eNOS* se determinaron por conteo directo. Las diferencias entre cada grupo se analizaron usando el programa estadístico EPIINFO (prueba de Chi- cuadrada (χ^2) de Mantel-Haenzel, esta combina tablas de contingencia de 2x2). Se considero un valor de $P < 0.05$ para la determinar la significancia estadística, se utilizó *odds ratio* (OR) como medida de asociación, con intervalos de confianza del 95 % (IC95 %) para cada genotipo comparado con el homocigoto silvestre como referencia entre los grupos.

14 RESULTADOS

14.1 Relación del polimorfismo G894T en pacientes con TVC

Los productos de PCR amplificados se digirieron con la enzima de restricción *BanII*, la cual produce fragmentos de 163 pb y 85 pb, pero no logra escindir el fragmento de 248 que contiene la variante Asp298 mediante la sustitución de G por T en la posición del nucleótido 894. El resultado se ilustra en la Figura 18, detectándose una banda de 248 pb correspondiente al genotipo (T/T) y una de 163 pb correspondiente al genotipo (G/G). Los fragmentos de DNA fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (BET) y se visualizaron con rayos UV.

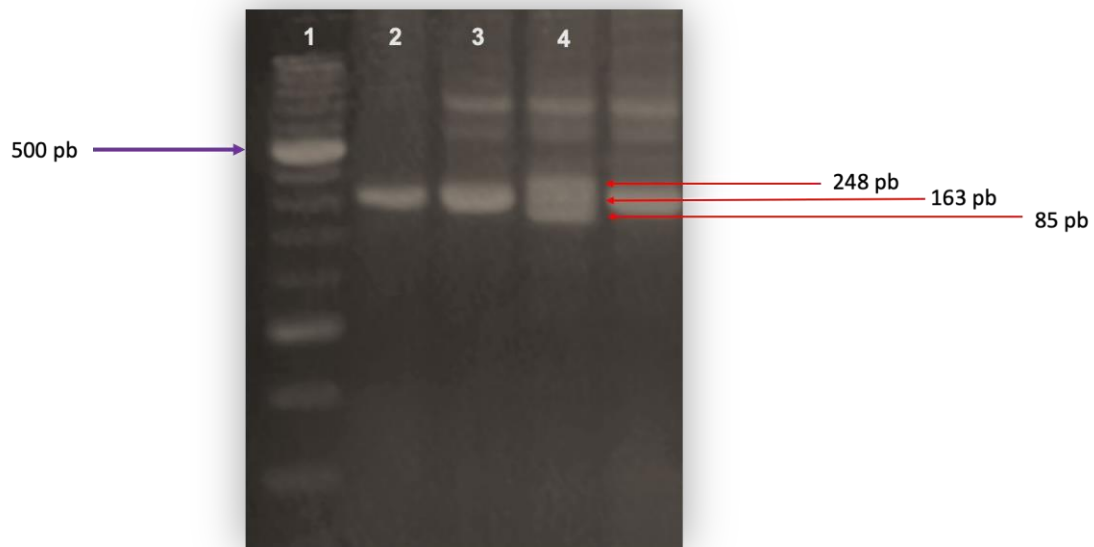


Figura 18. Expresión del polimorfismo Glu298Asp en el exón 7 del gen *eNOS*. Los productos de PCR amplificados se digirieron con la enzima de restricción *BanII* y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio; se muestran los tres fragmentos de restricción después de la digestión Carril 1: marcador de pares de bases; Carriles 2 y 3 fragmento 163 pb que corresponde al homocigoto Glu/Glu; Carril 4 fragmentos de 248 pb, 163 pb y 85 pb que corresponden al heterocigoto (Glu/Asp).

Para evaluar la relación del polimorfismo G894T con la TVC se analizaron 117 controles (61 hombres y 56 mujeres con una edad promedio de 35 años) y 61 pacientes con TVC idiopática (6 hombres y 47 mujeres con una edad promedio de 33 años) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. En la tabla 11 se muestra la frecuencia genotípica del polimorfismo G894T de eNOS, en pacientes, así como en controles.

En la Tabla 12 se observa la comparación del genotipo (TT) mediante Chi-cuadrada (χ^2) con intervalos de confianza al 95 %, obteniéndose una OR de 0.184 y una $p = 0.825$ dando como resultado una asociación no significativa entre el polimorfismo con la enfermedad. En la tabla 13 se observa que las frecuencias génicas por género no presento diferencia significativa.

Tabla 11. Frecuencia genotípica del polimorfismo de la eNOS G894T en Pacientes con TVC y Controles

GENOTIPO	PACIENTES TVC n = 61		CONTROLES n = 117	
	n	(%)	n	(%)
GT	48	78.7	111	94.9
GG	9	14.8	2	1.7
TT	4	6.6	4	3.4

Tabla 12. Frecuencias génicas del polimorfismo G894T en Pacientes con TVC y Controles.

Genotipo T/T					
	Pacientes (%)	Controles (%)	OR	IC 95 %	<i>p</i>
T/T	4.71	4	0.1836	0.4 – 9.0	0.825

Tabla 13. Frecuencias génicas por género del polimorfismo G894T en pacientes con TVC y controles.

Genotipo T/T					
Genero	Pacientes (%)	Controles (%)	OR	IC 95 %	<i>p</i>
F	8.51	1.17	4.70	0.65 – 119.9	0.0849
M	0	4.91	4.31	0.31 – 53.35	0.160

14.2 Relación del polimorfismo del intrón 4ab con la TVC

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio (BET) y se visualizaron con rayos UV. La banda de 420 pb corresponde a la secuencia silvestre de cinco repeticiones de 27 pb (alelo b) y la banda de 393 pb corresponde al mutado con cuatro repeticiones de 27 pb (alelo a) Figura 19.

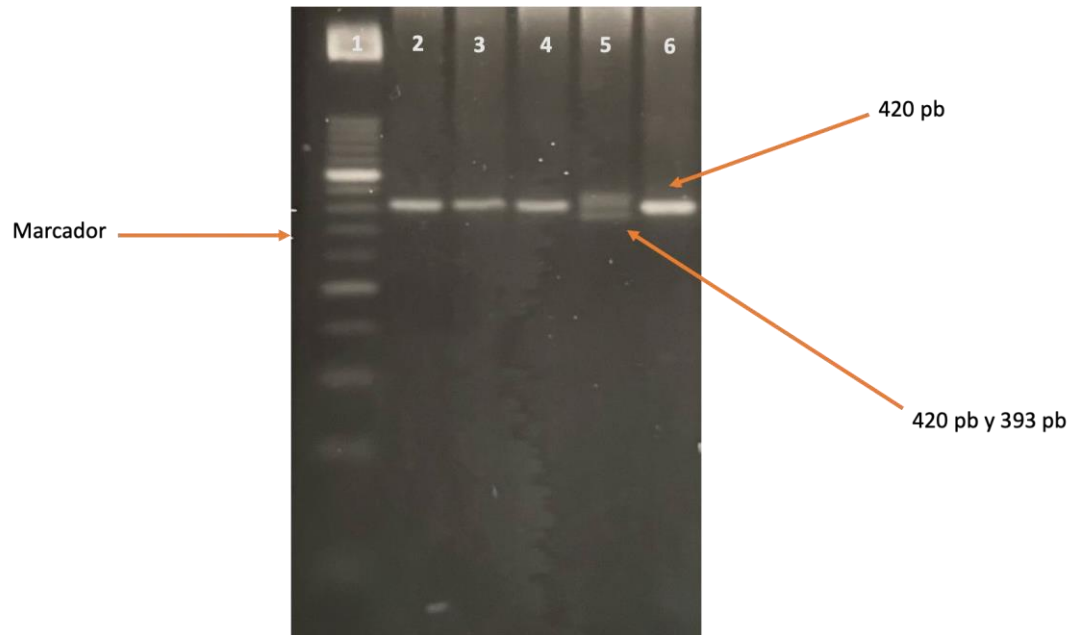


Figura 19. Expresión del polimorfismo VNTR en el intrón 4 de el gen de la *eNOS*. La banda de 420 pb indica las cinco repeticiones de 27 pb y la banda 393 pb corresponde a las cuatro repeticiones de 27 pb. Carril 1: marcador de pares de bases; Carril 2,3,4, y 6: banda de 420 pb corresponde al homocigoto wild type (4b/b); Carril 5: bandas 420 pb y 393 pb corresponde al heterocigoto (4a/4b) muestras de pacientes con TVC.

Para determinar la relación del polimorfismo del intrón 4 de la *eNOS* en pacientes con TVC, se estudiaron 326 controles para el polimorfismo del intrón 4ab (247 hombres y 79 mujeres con una edad promedio de 35 años) y 61 muestras de pacientes con TVC idiopática, se determinó la frecuencia genotípica del intrón 4ab entre los controles y pacientes con TVC como se muestra en la Tabla 14.

En la tabla 15 se muestra el análisis estadístico para determinar la asociación del polimorfismo 4a con la TVC dando como resultado de protección entre el polimorfismo con la enfermedad. De igual manera se compararon las frecuencias genotípicas por género en pacientes como en controles encontrando una diferencia no significativa estadísticamente como se muestra en la tabla 16.

Tabla 14. Frecuencia genotípica del polimorfismo de la eNOS intrón 4a/b en pacientes con TVC y controles.

Genotipo	Pacientes TVC n = 61		Controles n = 326	
	n	%	n	%
4a/4a	2	3.3	55	16.9
4a/4b	12	19.7	11	3.4
4b/4b	47	75.4	260	79.8

Tabla 15. Análisis estadístico del polimorfismo de la eNOS intrón 4a/a en pacientes con TVC y controles.

Genotipo 4a/4a					
Genotipo	Pacientes (%)	Controles (%)	OR	IC 95 %	<i>p</i>
4a/4a	2 (3.3)	55 (16.9)	0.195	0.031-0.69	0.0035

Tabla 16. Frecuencias génicas por género en el polimorfismo de la eNOS intrón 4a/b en pacientes con TVC y controles.

Genotipo 4a/4a					
Genero	Pacientes (%)	Controles (%)	OR	IC 95 %	<i>p</i>
F	3.3	16.4	0.375	0.053 – 1.659	0.111
M	0	83.6	0.989	0.041 – 7.103	0.181

15 DISCUSIÓN

Se sabe que la TVC es un subtipo de las enfermedades cerebro vasculares (EVC), las causas aún no están bien definidas, sin embargo, esta se produce por la obstrucción de las venas las cuales reciben el flujo sanguíneo del cerebro. Por otra parte, sabemos que la eNOS que produce NO. desempeña un papel crucial en la regulación de la vasodilatación en el endotelio, en los cambios hemodinámicos y la remodelación de la pared vascular,

El óxido nítrico juega un papel importante en la homeostasis del endotelio vascular, incluida la regulación de la circulación cerebral, por lo que una disminución de la concentración favorece al desarrollo patológico del endotelio, por lo cual, el gen que codifica para la enzima eNOS se ha identificado como un factor importante para este proceso. Se ha demostrado en varios estudios que los polimorfismos de la eNOS tienen relación con las enfermedades cardiovasculares tales como: la enfermedad arterial coronaria, hipertensión, nefropatía diabética y el infarto cerebral, aunque algunas son inconsistentes (Vecoli, 2014; Akhter et al., 2009; Casa et al., 2006). La influencia de polimorfismos genéticos ha tomado fuerza como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades vasculares ((Reza et al., 2019; Wang et al., 2020).

Por lo anterior se han realizado diversos estudios para investigar la relación o contribución de la presencia de los polimorfismos de la eNOS (G894T, intrón 4 de 27 VNTR y T786C); ya que estos polimorfismos pueden aumentar la susceptibilidad a la progresión de diferentes enfermedades que incluyen aterosclerosis, hipertensión, infarto al miocardio, vasoespasmo coronario, así como la formación de aneurismas aórticos y enfermedades cerebrovasculares isquémicas y la TVC.

Markus y colaboradores reportaron que la variante del exón 7 y el intrón 4 27 VNTR no estaban relacionadas con los accidentes cerebrovasculares, en pacientes blancos,⁷⁹ pero en 1998 Yahashi reporto que en sujetos japoneses con ictus isquémicos tampoco encontró relación con el intrón 4 de 27 VNTR (Yahashi et al., 1998), sin embargo, se ha reportado que el polimorfismo G894T, está relacionado con el tromboembolismo venoso (TEV) en poblaciones asiáticas; de la misma manera el polimorfismo del intrón 4 27 VNTR se relacionó con la susceptibilidad con la TEV (Huang et al.,2021); estos resultados son

respaldados por Lianxing y colaboradores en el 2014 concluyendo que el polimorfismo G894T está involucrado en la enfermedad trombótica en sujetos asiáticos (Lianxing et al.,2014). Shieh y colaboradores en 2017 reportaron que el G894T participa en las enfermedades cerebrovasculares en sujetos chinos, Ömer y colaboradores en el 2019 reportaron la existencia de la relación del polimorfismo G894T y el intrón 4ab VNTR con la EVC-isquémica en la población asiática y en sujetos del norte de India, en sujetos del sur de India también se mostró una asociación del polimorfismo G894T con el accidente cerebrovascular isquémico (Anliacik et al., 2019; Majumdar et al., 2010).

Estudios en ratones *knockout* deficientes en eNOS ha demostrado que son sensibles a la isquemia cerebral focal, presentando anomalías en la pared vascular, el polimorfismo 4ab VTNR se le atribuye a la enfermedad coronaria e infarto al miocardio sobre todo en fumadores⁷⁵ (Akhter et al 2009). La heterogeneidad del G894T se ha reportado significativamente en poblaciones asiática; mientras que el intrón 4ab VNTR se ha presentado en población caucásica (Yang et al., 2015).

En el 2004 Akar y colaboradores reportaron una asociación significativa entre el alelo del intrón 4ab de 27 VNTR en sufrir un accidente cerebrovascular, pero reportaron que no había relación con la trombosis venosa profunda (TVP) en sujetos turcos.

Con base en lo anterior existe una controversia entre los diversos resultados con las diferentes, sin embargo, en nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en los polimorfismos estudiados en pacientes con TVC comparados contra los controles y únicamente encontramos que el genotipo 4a/a es un genotipo de protección. en la población mexicana. Es necesario llevar a cabo más estudios en poblaciones más grandes para afirmar o negar una posible asociación de estos polimorfismos con la TVC.

En nuestro conocimiento esta es la primera vez que se analiza en pacientes con TVC en México, ya que sabemos que para esta enfermedad aún no se conoce la incidencia o los factores que la causan.

16 OBJETIVOS y METAS ALCANZADAS

- Se estandarizó las técnicas de de identificación de dos polimorfismos del gen de la *eNOS* en los pacientes con TVC y controles.
- Se elaboró un banco de datos de DNA de controles.
- Se determinaron las frecuencias genotípicas de dos polimorfismos con en sujetos con TVC y controles en la población mexicana.

17 CONCLUSIONES

- 1.- No existe una asociación entre el polimorfismo G894T y la TVC en la población mexicana.
- 2.- Existe una relación de protección en el polimorfismo 4a/b con la TVC en la población mexicana.

18 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmad A. 2006. Genetics of cerebral venous thrombosis. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 56:11, 488–490.
2. Akar, N., Akar, E., Cin, S., Deda, G., Avcu, F., y Yalçın, A. 1999. Endothelial nitric oxide synthase intron 4, 27 bp repeat polymorphism in Turkish patients with deep vein thrombosis and cerebrovascular accidents. *Thrombosis research*, 94:1, 63–64.
3. Akhter, M. S., Biswas, A., Iqbal, J., Hamali, H. A., Mobarki, A. A., Abdullah, S. M., Dobie, G., & Saxena, R. 2022. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms Increase Risk of Deep Vein Thrombosis by Altering Homocysteine Levels. *Clinical laboratory*, 68(3).
4. Akhter, M.S., Biswas, A., Ranjan, R., Sharma, A., Kumar, S., Saxena, R. 2010. The nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and their association with deep vein thrombosis in Asian Indian patients. *Clinica Chimica Acta*, 411(9), 649-652.
5. Akhter, M.S., Biswas, A., Saxena, R. 2009. Role of endothelial nitric oxide synthase gene in vascular diseases. *Eastern Journal of Medicine* 14, 46-50.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biología molecular de la célula*. 4ta edición. Nueva York: Garland Science; 2002. Vasos sanguíneos y células endoteliales.
7. Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357:3, 593–615.
8. Alimoradi, H., Greish, K., Gamble, A. B., & Giles, G. I. 2019. Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7:4, 279–303.
9. Arriola-Peñalosa, M.A., Arriaga-Dávila, J.J. 2017. Diagnóstico y Tratamiento Temprano de la Enfermedad Vascul ar Cerebral Isquémica en el segundo y tercer nivel de atención. *Catálogo maestro de guías de práctica clínica: S-102-08*. Secretaria de Salud, Ciudad de México.
10. Anliacik S.O., Tokgoz S., Zamani A.G., Yildirim M.S., Iyisoy M.S., 2019. Investigation of the relationship between ischemic stroke and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms [G894T, intron 4 VNTR and T786C], *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49:2, 589-594.

11. Appenzeller, S., Zeller, C. B., Annichino-Bizzachi, J. M., Costallat, L. T., Deus-Silva, L., Voetsch, B., Faria, A. V., Zanardi, V. A., Damasceno, B. P., & Cendes, F. 2005. Cerebral venous thrombosis: influence of risk factors and imaging findings on prognosis. *Clinical neurology and neurosurgery*, 107:5, 371–378.
12. Arauz-Antonio, Ruíz-Franco, Angélica, Enfermedad vascular cerebral. 2012, Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, 3, 11-21
13. Bredt, D. S., & Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual review of biochemistry*, 63, 175–195.
14. Casas, J. P., Cavalleri, G. L., Bautista, L. E., Smeeth, L., Humphries, S. E., & Hingorani, A. D. (2006). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 164(10), 921–935.
15. Caplan, L. R., Searls, D. E., & Hon, F. K. (2009). Cerebrovascular disease. *The Medical clinics of North America*, 93(2), 353–viii.
16. Centelles-Josep J., Esteban-Cristina., Imperial-Santiago. 2004. Óxido nítrico. *OFFARM*, 23 :11, 96-102.
17. Checa CMA. Polimorfismos genéticos 2007. Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mex*; 20:3, 213-221.
18. Cooke, P. John, 1997. NITRIC OXIDE SYNTHASE: Role in the Genesis of Vascular Disease, *Revista médica*, 48:489-509.
19. Costa, E. D., Rezende, B. A., Cortes, S. F., y Lemos, V. S. 2016. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Frontiers in physiology*, 7, 206.
20. Cuéllar-Mata, P., Solís-Martínez, M. O., Sánchez-Leyva, M. D., García-Nieto, R. M., y Arias-Negrete, S. 2010. El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Universitaria*, 20:3, 24-33.
21. Cyr, A. R., Huckaby, L. V., Shiva, S. S., y Zuckerbraun, B. S. 2020. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical care clinics*, 36:2, 307–321.
22. Dmytriw, A.A., Song, J.S.A., Yu, E. Poon, C.S. 2018. Trombosis venosa cerebral: diagnóstico y tratamiento de última generación. *Neurorradiología* 60 , 669–685.

23. dos Santos Bezerra, G. M., Cavalcante, Y. D. S., Matos-Neto, P. R., Cavalcante-Neto, J. F., da Ponte, K. F., Aguiar de Sousa, D., Leal, P. R. L., & Ribeiro, E. M. L. 2022. Cerebral venous thrombosis in Latin America: A critical review of risk factors, clinical and radiological characteristics. *Frontiers in neurology*, 13, 1017565.
24. Ehtisham, A., & Stern, B. J. 2006. Cerebral venous thrombosis: a review. *The neurologist*, 12:1, 32–38.
25. Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F., & Rezzani, R. 2014. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *BioMed research international*, 2014, 801896.
26. Fernández, J.M., Fuentes-Jiménez, F., López-Miranda, J. 2009. Función endotelial y ejercicio físico., *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 2:2, 61-69.
27. Figueroa-Vega, N., Majano-Pedro., Larrañaga-Eduardo., Miguel-Bravo, J., Rodríguez-Ramos, R., González-Amaro, R., Marazuela-Mónica. 2008. Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias, *Endocrinología y Nutrición*, 55:8, 340-345.
28. Forgerini, M., Urbano, G., Rubens de Nadai, T., Fernando Zanelli, C., Roberto Valentini, S., & de Carvalho Mastroianni, P. 2022. VNTR Polymorphism in Intron 4 of the eNOS Gene and the Risk of Gastrointestinal Bleeding: A Case-control Study. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases*, 31:2, 176-183.
29. Forstermann Ulrich, Sessa C. William. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and fuction, *European Heart Journal*, 2012, 33:829-837.
30. Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., & Kleinert, H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 23(6 Pt 2), 1121–1131.
31. Goshi, E., Zhou, G., & He, Q. (2019). Nitric oxide detection methods *in vitro* and *in vivo*. *Medical gas research*, 9:4, 192–207.
32. Green, M., Styles, T., Russell, T., Sada, C., Jallow, E., Stewart, J., Lazariashvili, O., Lubomirova, I., Cotlarciuc, I., Sharma, S., Han, T. S., & Sharma, P. 2018. Non-genetic and genetic risk factors for adult cerebral venous thrombosis. *Thrombosis research*, 169, 15–22.
33. Guenther. G., Arauz. A., 2011. Trombosis venosa cerebral: aspectos actuales del diagnóstico y tratamiento. *Neurología*. 26:8,488-498.

34. Habib, S., & Ali, A. 2011. Biochemistry of nitric oxide. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26:1, 3–17.
35. Hassan, A., Gormley, K., O'Sullivan, M., Knight, J., Sham, P., Vallance, P., Bamford, J., & Markus, H. 2004. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke*, 35:3, 654–659.
36. Huang, G., Deng, X., Xu, Y., Wang, P., Li, T., & Hu, P. 2021. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism and venous thromboembolism: A meta-analysis of 9 studies involving 3993 subjects. *Phlebology*, 36:10, 797–808.
37. Jiménez-González, M.D., Santiago-Germán, D., Castillo-Henkel, E.F., Alvarado-Moreno, J.A., Hernández-Juárez, J., Leños-Miranda, A. Majluf-Cruz, A, Isordia-Salas, I. 2021. Identificación de factores de riesgo genéticos asociados a la enfermedad vascular cerebral de tipo isquémico en jóvenes mexicanos, *Neurología*, 36:5, 337-345.
38. Kaur, K., Uppal, A., y Kaur, A. 2015. An exonic G894T variant of endothelial nitric oxide synthase gene as a risk factor for ischemic stroke in North Indians. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 75:4, 339-350.
39. Kim, J. U., Chang, H. K., Lee, S. S., Kim, J. W., Kim, K. T., Lee, S. W., & Chung, W. T. 2003. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behçet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Annals of the rheumatic diseases*, 62:11, 1083–1087.
40. Ksiazek, P., Wojewoda, P., Muc, K., y Buraczynska, M. 2003. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism in type 2 diabetes mellitus. *Molecular diagnosis: a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology*, 2003, 7:2, 119–123.
41. Lehninger, *Principios de Bioquímica*, 6^a. Ed (USA), Editorial Macmillan. Pag
42. Lianxing Zhao, Chunsheng Li, Qin Yin, Qian Zhang, Rui Shao, Yingying Fang. 2014. Endothelial nitric oxide synthase 894G>T polymorphism and thrombotic disease: A Meta-Analysis of 17 studies involving 8808 subjects, *Thrombosis Research*, 134:5,1057-1065.
43. Li, Q., Youn, J. Y., & Cai, H. (2015). Mechanisms and consequences of endothelial nitric oxide synthase dysfunction in hypertension. *Journal of hypertension*, 33(6), 1128–1136.

44. Lodish, H. 2005 *Biología Celular y Molecular* 7ª Ed, Buenos Aires, Editorial PANAMERICANA, pag 37.
45. Loewe, L., & Hill, W. G. 2010. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365:1544, 1153–1167.
46. Monti, L. D., Barlassina, C., Citterio, L., Galluccio, E., Berzuini, C., Setola, E., Valsecchi, G., Lucotti, P., Pozza, G., Bernardinelli, L., Casari, G., & Piatti, P. (2003). Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*, 52(5), 1270–1275.
47. Mahdieh, N., & Rabbani, B. 2013. An overview of mutation detection methods in genetic disorders. *Iranian journal of pediatrics*, 23:4, 375–388.
48. Majumdar, V., Nagaraja, D., Karthik, N., y Christopher, R. 2010. Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with early-onset ischemic stroke in South Indians. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 17:1, 45-53.
49. Marjot, T., Yadav, S., Hasan, N., Bentley, P., & Sharma, P. 2011. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. *Stroke*, 42:4, 913–918.
50. Markus, S. H., Ruigrok, Ynte., Powell F, A.J. 1998. Endothelial nitric oxide synthase exon 7 polymorphism, ischemic cerebrovascular disease, and carotid atheroma. *Stroke*. 29, 1908-1911.
51. Marrón TA. Genomas. 2da edición. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Capítulo 14, Mutación, Reparación y Recombinación. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21114/>.
52. Mattson Porth Carol, *Fundamentos de Fisiopatología*, 4ª Ed, Philadelphia (USA), Editorial Wolters Kluwer.
53. Mehta, A., Danesh, J., Kuruvilla, D. 2019. Cerebral Venous Thrombosis Headache. *Current Pain and Headache Reports*. 23
54. Micheli F. Tratado de neurología clínica, 1ª Ed, Editorial Medica Panamericana, pag 390-394
55. Micheli, Federico, *Tratado de Neurología Clínica*, Buenos Aries, Editorial Médica Panamericana, pág. 390-394.

56. Miles B, Tadi P. Genetics, Somatic Mutation. 2023. Treasure Island (FL): StatPearls.
57. Nieto de Pascual Héctor R., Guizar Clemente, Ortiz Trejo Juan.F, *Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en el hospital de México, Revista Médica del Hospital Cerebral*, 66:1, 7-12.
58. Oliveira-Paula, G.H., Lacchini, R., Tanus-Santos, J.E. 2017. Clinical and pharmacogenetic impact of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms on cardiovascular diseases. *Nitric Oxide*, 63, 39-51.
59. Park, K. W., You, K. H., Oh, S., Chae, I. H., Kim, H. S., Oh, B. H., Lee, M. M., & Park, Y. B. 2004. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans. *Heart (British Cardiac Society)*, 90:3, 282–285
60. Pérez Neri Iván, 2015. *Casi todo sobre el óxido nítrico*, *Arch Neurocién Mex*, 20:4, 271-280.
61. Piazza, G. 2021. Cerebral Venous Thrombosis. *American Heart Association*, 125, 1704-1709.
62. Pierce A. Benjamin, *Genética un enfoque conceptual*, 3ª Ed, Buenos Aires, Editorial Southwestern University, pág. 472-480.
63. Pollard D. Thomas, *Cell Biology*, 3ª Ed, Philadelphia (USA), Editorial Saunders, 482.
64. Ramírez-Patiño, R., Figuera, L. E., Puebla-Pérez, A. M., Delgado-Saucedo, J. I., Legazpí-Macias, M. M., Mariaud-Schmidt, R. P., Ramos-Silva, A., Gutiérrez-Hurtado, I. A., Gómez Flores-Ramos, L., Zúñiga-González, G. M., & Gallegos-Arreola, M. P. 2013) Intron 4 VNTR (4a/b) polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with breast cancer in Mexican women. *Journal of Korean medical science*, 28:11, 1587–1594.
65. Reza Azarpira, M., Mahdi Ghilian, M., Reza Sobhan M., Mahdinezhad-Yazdi, M., Aghili, K., Ahrar, H., Neamatzadeh, H. 2019. Association of eNOS 27-bp VNTR, 894G>T and 786T>C polymorphisms with susceptibility to legg-calve-perthes disease in Iranian children. *Journal of Orthopaedics*, 16:2, 137-140.
66. Rivera-Góngora F., 2015. Perspective on stroke in Mexico. *Medicina Universitaria*, 17:68, 184-187.

67. Ropper. H. Allan, Samuels. A. Martin, Adams y Victor, *Principios de Neurología* (9^a. ed.) USA. Editorial Mc Graw Hill, pág. 746.
68. Rovira I. 1995. Oxido nítrico [Nitric oxide]. *Revista española de anestesiología y reanimación*, 42:1, 15–23.
69. Rowland P. Lewis, *Neurología de Merritt*, 12^a. Ed, Philadelphia (USA), Editorial Wolters Kluwer, pág. 250-263, 281.
70. Ruiz-Sandoval, J. L., Chiquete, E., Bañuelos-Becerra, L. J., Torres-Anguiano, C., González-Padilla, C., Arauz, A., León-Jiménez, C., Murillo-Bonilla, L. M., Villarreal-Careaga, J., Barinagarrementería, F., Cantú-Brito, C., & RENAMEVASC investigators 2012. Cerebral venous thrombosis in a Mexican multicenter registry of acute cerebrovascular disease: the RENAMEVASC study. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 21:5, 395–400
71. Sánchez-Parada, M., Gómez-Meda B. 2013 Mutaciones. Salazar-Montes, A., Sandoval-Rodríguez, A.S., Armendáriz-Borunda, J (Eds). *Biología molecular fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*, McGraw Hill.
72. Seckin, Y., Yigit, A., Yesilada, E., Gulbay, G., Cagin, Y. F., Gozukara, H., Bilgic, Y., Yildirim, O., Turkoz, Y., & Aksungur, Z. 2016. Association of eNOS Gene Polymorphisms G894T and T-786C with Risk of Hepatorenal Syndrome. *Gastroenterology research and practice*, 2016, 2579626.
73. Shi, C., Kang, X., Wang, Y., & Zhou, Y. 2008. The coagulation factor V Leiden, MTHFR C677T variant and eNOS 4ab polymorphism in young Chinese population with ischemic stroke. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 396:1-2, 7-9.
74. Silvis, S. M., de Sousa, D. A., Ferro, J. M., & Coutinho, J. M. 2017. Cerebral venous thrombosis. *Nature reviews. Neurology*, 13:9, 555–565.
75. Stamler, J. S., Lamas, S., y Fang, F. C. 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 106:6, 675–683.
76. Stryer, *Bioquímica*, 7^a. Ed (USA), Editorial Reverté.
77. Sukhovshin, R. A., Yepuri, G., & Ghebremariam, Y. T. 2015. Endothelium-Derived Nitric Oxide as an Antiatherogenic Mechanism: Implications for Therapy. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 11:3, 166–171.
78. Tadi, P., Behgam, B., & Baruffi, S. (2023). Cerebral Venous Thrombosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

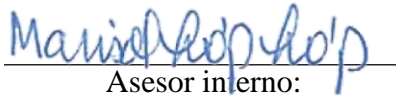
79. Thameem, F., Puppala, S., Arar, N. H., Stern, M. P., Blangero, J., Duggirala, R., & Abboud, H. E. 2008. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diabetes & vascular disease research*, 5:2, 109–113.
80. Torrades-Sandra.,2002. Diversidad del genoma humano: los polimorfismos; *Offarm*, 21:5, 122-125.
81. Tran, N., Garcia, T., Aniq, M., Ali, S., Ally, A., & Nauli, S. M. 2022. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States. *American journal of biomedical science & research*, 15:2, 153–177.
82. Vaca-Villanueva M., Valera-Chávez C., Sánchez-Landers M., 2021. Trombosis Venosa Cerebral: Consideraciones Actuales. *Revista Ecuatoriana de Neurología*. 30:1, 166-173.
83. Wang, Q., Sun, H., Qi, X., & Zhou, M. 2020. eNOS rs2070744 polymorphism might influence predisposition to hemorrhagic cerebral vascular diseases in East Asians: A meta-analysis. *Brain and behavior*, 10:5, e01538.
84. Wang, X. L., & Wang, J. 2000. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Molecular genetics and metabolism*, 70:4, 241–251.
85. Vecoli, C. 2014. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in cardiovascular disease. *Vitamins and hormones*, 96, 387-406.
86. Xu, W., Charles, I. G., & Moncada, S. 2005. Nitric oxide: orchestrating hypoxia regulation through mitochondrial respiration and the endoplasmic reticulum stress response. *Cell research*, 15:1, 63–65.
87. Yahashi, Y., Kario, K., Shimada, K., & Matsuo, M. 1998. The 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial cell nitric oxide synthase gene and ischemic stroke in a Japanese population. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*, 9:5, 405–409.
88. Yang, C., Qi, Z. Y., Shao, C., Xing, W. K., & Wang, Z. 2015. Association between three eNOS polymorphisms and intracranial aneurysms risk: a meta-analysis. *Medicine*, 94:4, e452.

89. Zhao Lianxing, Yin Qin, Zhang Quin, Shao Rui, Fang Yingying. 2014. Endothelial nitric oxide synthase 894G>T polymorphism and thrombotic disease: A Meta-Analysis of 17 studies involving 8808 subjects, *Thrombosis Research*, Volume 134, Issue 5.
90. Zhao, Yingzi., Vanhoutte. Paul M., Leung. Susan W.S., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS, *Journal of Pharmacological Sciences*,129:29, 83-94.
91. Zhou, Li.,Zhu, Dong-Ya. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications., *Nitric Oxide*, 20:4, 223-230.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

1. <https://www.significados.com/nucleotido/>).
2. <https://soclalluna.com/>).
3.
4.
5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557896/>
6. <https://study.com/academy/lesson/types-of-capillaries-continuous-fenestrated-sinusoidal.html>

Vo. Bo. DE LOS ASESORES



Asesor interno:

Dra. Marisol López López

Prof. Titular "C" TC

Departamento de Sistemas Biológicos

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco



Asesor externo:

Dr. Aurelio Jara Prado

Departamento de Genética

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez

