



CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



ARTÍCULO ORIGINAL

Aneurismas intracraneales y su comportamiento clínico-genético



Liliana García-Ortiz^{a,*}, José Gutiérrez-Salinas^b, Salvador Guerrero-Muñoz^c,
María del Carmen Chima-Galán^a y Jonathan Sánchez-Hernández^d

^a División de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México

^b Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México

^c Cirugía Cerebro Vascular, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México

^d Licenciatura en Química, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Estado de México, México

Recibido el 7 de noviembre de 2014; aceptado el 8 de abril de 2015

Disponible en Internet el 16 de julio de 2015

PALABRAS CLAVE

Aneurismas intracraneales;
Síntesis de óxido nítrico endotelial;
Polimorfismos;
Número variable de repeticiones en tándem;
Características clínicas

Resumen

Antecedentes: Los aneurismas intracraneales son dilataciones anormales de las arterias cerebrales. La etiología es desconocida, sin embargo algunos genes se han relacionado con su formación; como el caso del gen *NOS3* que codifica a la síntesis de óxido nítrico endotelial encargada de producir óxido nítrico. Varios polimorfismos en este gen en asociación con un número variable de repeticiones en tándem localizado en el intrón 4 del gen *eNOS4* pueden incidir en la formación de aneurismas. Por eso, la finalidad de nuestro estudio es conocer las frecuencias genotípicas de los genes *eNOS3* y *eNOS4* y su relación con aneurismas intracraneales. **Material y métodos:** Se realizó un estudio prospectivo de casos y controles. Se estudiaron 79 casos con aneurisma intracraneal roto y 93 controles sanos; de todos se obtuvo DNA para el estudio de los genes *eNOS3* y *eNOS4*.

Resultados: El genotipo GG del gen *eNOS3* mostró el mayor número de pacientes (n = 29) con aneurisma intracraneal grande. Mientras que los de tamaño mediano se encontraron en mayor porcentaje (50%) en pacientes con genotipo GT. En cuanto a la evolución de los pacientes, se observó que aquellos con genotipo GG presentaron el mayor porcentaje (43.13%) de recuperación, en comparación con los de genotipo GT (27.27%).

* Autor para correspondencia. División de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, San Lorenzo No. 502, Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, C.P. 03100, México. D.F., México. Tel.: +(55) 52 00 50 03; ext. 14605.

Correo electrónico: garortiz@yahoo.com (L. García-Ortiz).

KEYWORDS

Intracranial aneurysms;
Endotelial nitric oxide synthase;
Polymorphisms;
Variable number tandem repeat;
Clinical features

Conclusiones: Nuestro estudio demuestra que en los casos con aneurismas intracraneales existe una tendencia de asociación entre los genotipos del gen *eNOS3* con el promedio del tamaño del aneurisma, así como con las secuelas clínicas de la enfermedad.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Intracranial aneurysms and their clinical and genetic behaviour

Abstract

Background: Intracranial aneurysms are abnormal dilations of the cerebral arteries of unknown origin. However, some genes have been linked to their formation, as in the case of *NOS3* gene which encodes the endothelial nitric oxide synthase responsible for producing nitric oxide. Several polymorphisms in this gene, in association with a variable number tandem repeat located in intron 4 from *eNOS4* gene, can influence the formation of aneurysms. Therefore, the purpose of this study is to determine the genotype frequencies of *eNOS3* and *eNOS4* genes, and their relationship with intracranial aneurysms.

Material and methods: A prospective case-control study was performed on 79 cases with ruptured intracranial aneurysm and 93 healthy controls. DNA was obtained from all subjects for the study of the *eNOS3* and *eNOS4* genes by molecular techniques.

Results: The GG genotype of *eNOS3* gene showed the largest number of patients (n = 29) with a large aneurysm. While the intracranial aneurysms of medium size were found in a higher percentage (50%) in patients with genotype GT. In terms of patient outcomes, it was observed that those with genotype GG had the highest percentage (43.13%) recovery, compared to genotype GT (27.27%).

Conclusions: The present study shows that there is a tendency of an association between genotypes of *eNOS3* gene with the mean size of the aneurysm, as well as clinical sequelae of the disease in patients with intracranial aneurysms.

© 2015 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

Los aneurismas intracraneales forman parte de las enfermedades cerebrovasculares y son definidos como dilataciones anormales de las arterias cerebrales, localizados generalmente en la bifurcación de las arterias que conforman el polígono de Willis. La incidencia en la población general es del 2-8%¹⁻³.

De acuerdo a su presentación, los aneurismas intracraneales se pueden clasificar en: no rotos, los cuales en la mayoría de los casos son hallazgos incidentales al realizar una angiografía cerebral con diferentes fines diagnósticos o en autopsias¹⁻³; y los rotos, que habitualmente producen una hemorragia subaracnoidea que se manifiesta con cefalea intensa, náuseas, vómito, déficit neurológico focalizado y pérdida de la consciencia, entre otros⁴. La tasa de mortalidad de las personas que padecen aneurismas intracraneales rotos es alta (50%), mientras que otro porcentaje (25%) sufrirá una afección permanente como parálisis corporal, pérdida del habla, de la visión o de la coordinación motora¹.

Hasta ahora la etiología de la formación de aneurismas intracraneales es desconocida; sin embargo, varios factores ambientales como el tabaquismo, la hipertensión arterial sistémica y el alcoholismo están asociados^{3,4}. Asimismo,

los factores genéticos se relacionan con su predisposición; aunque no existe un patrón de herencia mendeliana definido para esta enfermedad, estudios epidemiológicos muestran una mayor transmisión autosómica con riesgo para los parientes de primer grado de un sujeto afectado con aneurisma intracraneal, de 3 a 6 veces mayor en comparación con la población general^{3,4}. Los estudios genéticos también muestran probables sitios de localización de genes susceptibles o loci para la formación de aneurismas intracraneales, sin embargo en muchas poblaciones estos resultados han sido contradictorios, como en el caso del gen que codifica la enzima sintetasa de óxido nítrico (NOS) encargada de producir óxido nítrico^{3,5-9}.

La sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) es una de las 3 isoformas de NOS que se encuentra en el organismo de manera constitutiva¹⁰; la importancia de la producción de óxido nítrico por eNOS radica en el hecho de que es el vasodilatador endógeno más poderoso que se conoce^{10,11}. La eNOS es codificada por el gen *NOS3* y su expresión es, principalmente, a nivel endotelial. Se ha descrito que varios polimorfismos en este gen en asociación con un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), localizado en el intrón 4 del gen *eNOS4*, que pueden afectar la expresión de la enzima y alterar los niveles circulantes de óxido nítrico. Como ejemplo de lo anterior, es conocido el hecho de que

eNOS participa tanto en funciones hemodinámicas como estructurales y su ausencia o disminución podría provocar debilitamiento de la pared vascular o rotura, incidiendo en la susceptibilidad para la formación de aneurismas coronarios y cerebrales^{7,10,12-16}.

En el 2008, Özümlü et al.¹⁴ reportaron que el genotipo TT del polimorfismo G894T del gen *eNOS3* es significativamente frecuente en pacientes con aneurisma intracraneal roto en comparación con la población sana y está asociado con el riesgo de rotura ($p < 0.05$). Sin embargo, otros autores no encontraron esta misma asociación, probablemente debido a las diferencias étnicas en la distribución de los genotipos¹⁴.

Los estudios encaminados a conocer y profundizar en la variabilidad humana nos ayudan a entender la estructura génica de nuestra población, compararla con otras poblaciones y proponer nuevas técnicas de diagnóstico o incluso tratamientos específicos encaminados a la estabilización del paciente.

En la última década México y la genética clínica han experimentado un desarrollo notable, lo cual coincide en parte con los cambios en el perfil nacional de salud. Es así, que nuestro trabajo pretende generar como resultados el conocimiento de las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de los genes *eNOS3* y *eNOS4* y su relación con aneurismas intracraneales rotos en población mexicana.

Sabemos que el retraso en el diagnóstico de aneurismas intracraneales incrementa el riesgo de resangrado, especialmente después de 6 h del evento hemorrágico inicial; la intervención temprana, conocida como «prevención de la hemorragia», resulta ser la mejor estrategia para la disminución de la incidencia y prevalencia de esta enfermedad.

Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo de casos y controles, evaluado y aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional (CMN) «20 de Noviembre», Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE); todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Se estudiaron un total de 172 sujetos, de los cuales 79 eran casos con diagnóstico de aneurisma intracraneal roto, confirmado por panangiografía con sustracción digital; sus características generales y clínicas se describen en la [tabla 1](#). Como controles se incluyeron 93 individuos de la misma área geográfica, seleccionados al azar del Banco de Sangre en donde se realizó una historia clínica, examen físico, biometría hemática y química sanguínea, y se clasificaron como sanos si cumplían con los requisitos. A todos se les tomó una muestra de 5 ml de sangre venosa en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante, para la extracción de DNA por método de expulsión salina¹⁷ y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

El análisis del polimorfismo g.G894T del gen *eNOS3* se llevó a cabo por medio de *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*. El DNA fue utilizado como templado a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por muestra. Posteriormente se amplificó utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5' cat gag gct cag ccc cagaac 3'

y 5' agt caa tcc ctt tgg tgc tca c 3'. La prueba de *polymerase chain reaction* (PCR) utilizó el siguiente material: 1.25 U de TaqDNA polimerasa (Invitrogen®), amortiguador de reacción 1X, MgCl_2 3mM, dNTP's 0.2 mM y oligonucleótidos 10 μM , para un total de reacción de 25 μL . Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización de 95°C durante 7 min, seguido por 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 57°C durante 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg) y un paso final de extensión a 72°C durante 7 min. Para la detección del producto final de PCR de 206 pares de bases, se utilizó una alícuota de 7 μL y se sometió a electroforesis horizontal, utilizando como soporte agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio. El resto del amplicón fue digerido con la enzima de restricción MboI a 37°C durante 4 h; los fragmentos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

Reacción en cadena de la polimerasa

El polimorfismo VNTR del gen *eNOS4* a/b fue detectado por PCR utilizando como templado el DNA genómico (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y amplificado con los siguientes oligonucleótidos: 5'agg ccc tat ggt agt gcc ttt 3' y 5'tct ctt agt gct gtg gtc a 3'. Las condiciones generales para la PCR fueron: amortiguador de reacción 1X, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.4 μM de dNTP's, 0.5 μM de oligonucleótidos y 1.25 U de TaqDNA polimerasa para un volumen final de 25 μL . La PCR se inició con una desnaturalización por 4 min a 95°C , seguido de 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 58°C por 30 seg, extensión a 72°C por 30 seg) y un paso final de extensión a 72°C por 7 min. El polimorfismo VNTR del gen *eNOS4* a/b fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

La información fue recabada usando el software Excel (Microsoft Corporation, EE. UU.). Para los cálculos estadísticos se utilizó el software Graph Pad Prism V-4.00 (GraphPad Software, San Diego, Cal., EE. UU.). En cada polimorfismo fue determinada la distribución de genotipos; para comparar las frecuencias genotípicas entre casos y controles se usó la prueba de χ^2 ; para el estudio de la asociación de genotipos con datos categóricos se utilizó el test de Kruskal-Wallis y prueba ANOVA. En todos los casos, el valor de $p < 0.05$ fue usado como estadísticamente significativo.

Resultados

Las características generales de los casos con aneurismas intracraneales y de los controles incluidos en nuestro estudio ([tabla 1](#)) muestran que la relación femenino/masculino es mayor en el grupo de casos en comparación con el grupo control ($p < 0.001$). Por otro lado, dentro de los antecedentes personales patológicos, el grupo de casos presentó mayor porcentaje de pacientes con diabetes mellitus e hipertensión arterial sistémica, esta última conocida como un importante elemento que incrementa el riesgo para presentar rotura de aneurisma.

Asimismo, tanto en casos como en controles se analizó la distribución de los genotipos de los genes *eNOS3* y *eNOS4*

Tabla 1 Características generales en casos y controles

Variable	Casos	Controles	p
n	79	85	
Edad; años (promedio $\pm$ DE)	55.46 $\pm$ 12.86	35.94 $\pm$ 10.2	0.002*
Femenino/Masculino	58/21	30/55	< 0.001**
Antecedentes personales (%)			
Tabaquismo	29.11	27.05	
Alcoholismo	12.66	21.17	
Diabetes mellitus	27.84	5.88	
Hipertensión arterial	39.24	2.35	< 0.001**
Aneurisma intracraneal roto, n (%)	79 (100)		
Escala de Hunt y Hess, n (%)	I 42 (53.2)		
	II 10 (12.6)		
	III 19 (24.1)		
	IV 8 (10.1)		
	V 0 (0)		
Escala de Fisher	I 33 (41.8)		
	II 10 (12.6)		
	III 10 (12.6) IV 26 (33)		
Tratamiento	Pinzamiento quirúrgico	(100%)	

DE: desviación estándar.

* t de Student.

** χ^2 .**Tabla 2** Distribución de los genotipos para *eNOS3* y *eNOS4* en casos y controles

eNOS3	Genotipos						p*
	GG		GT		TT		
	n	%	n	%	n	%	
Casos	51	64.56	22	27.84	6	7.59	0.001
Controles	75	88.23	8	9.41	2	2.35	
eNOS4	a/b		b/b				0.079
	n	%	n	%			
	n	%	n	%			
Casos	5	6.33	74	93.67			0.079
Controles	1	1.18	84	98.82			

GG: guanina, guanina; GT: guanina, timina; TT: timina, timina.

* χ^2 .

(tabla 2). En el gen *eNOS3* se observó un predominio del genotipo GG tanto para los casos como para los controles (el 64.56% y el 88.23%; respectivamente); mientras que el genotipo GT se presentó con mayor frecuencia en los casos ($p=0.0012$). Por otro lado, los genotipos a/b y b/b del gen *eNOS4* mostraron similares proporciones en cada grupo de estudio, siendo el genotipo b/b el que se presentó en un porcentaje mayor del 90% tanto en casos como en controles.

Debido a que la distribución de los genotipos del gen *eNOS3* mostró mayor heterogeneidad en los casos, se realizó una correlación entre genotipos y la frecuencia de presentación de aneurisma intracraneal de acuerdo con su tamaño; el cual se clasificó en pequeño (< 5 mm), mediano (6-9 mm) o grande (> 10 mm) (tabla 3). Como se puede observar, el genotipo GG mostró la mayor cantidad de pacientes ($n=29$) con un aneurisma grande; sin embargo el genotipo TT tuvo el

mayor porcentaje (83.34%) de pacientes con dicho tipo de aneurisma. Mientras que los aneurismas intracraneales de tamaño mediano se encontraron en mayor porcentaje (50%) en los pacientes con genotipo GT. Esta heterogeneidad en el tamaño de los aneurismas entre los genotipos produjo una tendencia significativa ($p=0.05$) entre ellos.

Por otro lado, tomando en cuenta el tamaño en milímetros de cada aneurisma para cada genotipo, se calculó el promedio del tamaño del mismo y se compararon entre ellos (fig. 1). Tal como se puede observar, el genotipo GT es el que presentó el promedio menor de los 3 genotipos (7.73 ± 0.76 vs. 9.81 ± 0.54 ; y 7.73 ± 0.76 vs. 12.5 ± 1.12 ; para GT vs. GG y GT vs. TT; respectivamente).

Teniendo en cuenta la evolución que presentaron los pacientes durante su hospitalización (muerte, secuelas o recuperación), se observó que existe mayor heterogeneidad

Tabla 3 Distribución del tamaño de los aneurismas de acuerdo con los genotipos del gen *eNOS3* en casos con aneurismas intracraneales

Tamaño	Genotipos			p*
	GG n (%)	GT n (%)	TTn (%)	
Pequeños	7 (13.72)	5 (22.72)	0	0.05
Medianos	15 (29.41)	11 (50)	1 (16.66)	
Grandes	29 (56.86)	6 (27.27)	5 (83.34)	
Total	51 (100)	22 (100)	6 (100)	

GG: guanina, guanina; GT: guanina, timina; TT: timina, timina.

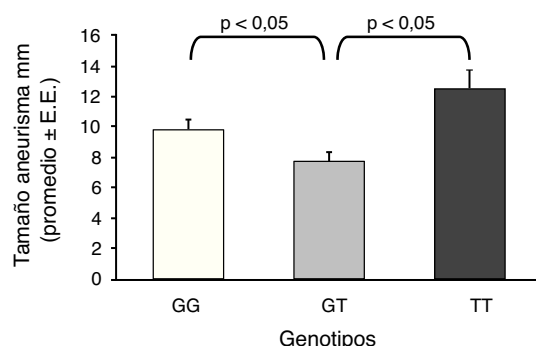
* Test de Kruskal-Wallis.

Tabla 4 Evolución clínica de los casos con aneurismas intracraneales divididos por genotipo

Variable	Genotipo <i>eNOS3</i> n (%)			p*
	GG	GT	TT	
Muertos	9 (17.64)	1 (4.54)	2 (33.33)	p = 0.05
Con secuelas	20 (39.22)	15 (68.18)	2 (33.33)	
Recuperados	22 (43.13)	6 (27.27)	2 (33.33)	

GG: guanina, guanina; GT: guanina, timina; TT: timina, timina.

* ANOVA.

**Figura 1** Promedio del tamaño de los aneurismas distribuidos por genotipos para el gen *eNOS3*.

de resultados en los genotipos GG y GT (tabla 4). De esta forma, se notó que los pacientes con genotipo GG presentaron el mayor porcentaje (43.13%) de recuperación, en comparación con los pacientes con genotipo GT (27.27%). En contraste, los pacientes con genotipo GT presentaron el mayor porcentaje (68.18%) de secuelas y el menor porcentaje de muertos (4.54%).

Discusión

En años recientes, la Secretaría de Salud en México ha reportado que para la población general adulta las principales causas de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, ocupando el segundo y tercer lugar respectivamente¹⁸. Actualmente en México no existen marcadores séricos y/o genéticos que nos permitan identificar de manera anticipada dichas enfermedades. A nivel mundial diversos grupos se han preocupado en realizar estudios de marcadores genéticos con relevancia clínica para aneurismas intracraneales^{6,19-21}; estas investigaciones

indican que la presencia de los polimorfismos g.G894T del gen *eNOS3* y VNTR a/b del gen *eNOS4* se asocia al desarrollo de aneurismas intracraneales^{5,14} y a otras enfermedades del tejido vascular-endotelial^{16,22}.

La presencia de estos 2 polimorfismos se estudió en población caucásica de EE. UU., observando una mayor frecuencia del genotipo GT del polimorfismo g.G894T, seguido por los genotipos GG y TT, mientras que en población negra de Colombia el genotipo GG fue el que presentó una mayor frecuencia, seguido por los genotipos GT y TT^{12,23}. Estos últimos resultados fueron encontrados también en nuestra población.

En el caso del polimorfismo VNTR a/b, los americanos y colombianos tuvieron una mayor frecuencia del genotipo b/b, seguido por los genotipos b/a y a/a^{12,23}.

En nuestro estudio el genotipo b/b también se presentó con mayor frecuencia; sin embargo, no tuvimos ningún caso con genotipo a/a. Esta discrepancia en la distribución de los genotipos podría atribuirse a diferencias étnicas que se deberán de tomar en cuenta para nuestra población, debido a que ancestralmente estamos conformados con diferente proporción de etnias amerindia, europea y africana^{24,25}.

Song et al.⁵ recientemente describieron la relación que existe entre la rotura de los aneurismas y los genotipos; encontrando que en pacientes con aneurisma intracraneal el genotipo heterocigoto se relaciona al tamaño del aneurisma en comparación con los homocigotos silvestres y homocigotos mutantes. Nuestros datos muestran que los pacientes con aneurismas de tamaño mediano y genotipo heterocigoto GT tienen el mayor porcentaje de secuelas por rotura (68.18%) en comparación con los homocigotos GG y TT, por lo que los datos propuestos por Song et al.⁵ y nuestros resultados indican que los genotipos podrían ser utilizados para predecir el riesgo de la enfermedad.

Actualmente en México son escasas las publicaciones que vinculan los polimorfismos del gen *eNOS* con el tamaño,

localización y consecuente rotura de aneurismas por lo que serán necesarios estudios adicionales encaminados a complementar, confirmar o rechazar nuestros resultados para poder tener mayor evidencia de la utilidad de estos polimorfismos en nuestra población.

Conclusiones

Nuestro estudio mostró que los casos con aneurisma intracraneal roto fueron con mayor frecuencia mujeres con un promedio de edad de 55 años y antecedentes de hipertensión arterial sistémica. Asimismo se encontró que existe una tendencia significativa entre los polimorfismos g.G894T del gen *eNOS3* y VNTR del gen *eNOS4* con el tamaño y evolución clínica de los aneurismas intracraneales, por lo que el gen *eNOS* parece ser un importante candidato en la patogénesis de dicha enfermedad.

Esta información podría utilizarse por los médicos neurólogos y neurocirujanos para tener un precedente general del progreso de la enfermedad y ayudar a optimizar el manejo, seguimiento, tratamiento y recuperación del paciente con aneurisma intracraneal.

Así, el examen genético para la búsqueda de individuos de alto riesgo y sus posibles complicaciones podría ser una prueba clínica disponible para el futuro.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

La Dra. Liliana García-Ortiz agradece al CONACyT (Fondo Sectorial en Salud; proyecto salud 2012-01-181582) su apoyo parcial para la realización de este estudio. También agradecen a la División de Registros Hospitalarios del Centro Médico Nacional «20 de Noviembre», ISSSTE a cargo de C. Enrique Díaz Carrillo su apoyo estadístico y al M.A. Hendrik Goss sus comentarios.

Bibliografía

- Peters DG, Kassam AB, Feingold E, Heidrich-O'Hare E, Yonas H, Ferrell RE, et al. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke*. 2001;32:1036-42.
- Gasparotti R, Liserre R. Intracranial aneurysms. *Eur Radiol*. 2005;15:441-7.
- Krischek B, Inoue I. The genetics of intracranial aneurysms. *J Hum Genet*. 2006;51:587-94.
- Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med*. 1997;336:28-40.
- Song MK, Kim MK, Kim TS, Joo SP, Park MS, Kim BC, et al. Endothelial nitric oxide gene T-786C polymorphism and subarachnoid hemorrhage in Korean population. *J Korean Med Sci*. 2006;21:922-6.
- Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Bertsias G, Koutsounaki E, Fragouli E, Raptopoulou A, et al. Association of the nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism with increased risk for both lupus glomerulonephritis and rheumatoid arthritis in a single genetically homogeneous population. *Lupus*. 2007;16:867-74.
- Selmi C, Zuin M, Biondi ML, Invernizzi P, Battezzati PM, Bernini M, et al. Genetic variants of endothelial nitric oxide synthase in patients with primary biliary cirrhosis: Association with disease severity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:1150-5.
- Sobey CG, Faraci FM. Subarachnoid haemorrhage: What happens to the cerebral arteries? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25:867-76.
- Cardon LR, Bell JL. Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet*. 2001;2:91-9.
- Karasneh JA, Hajeer AH, Silman A, Worthington J, Ollier WER, Gul A. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene are associated with Behçet's disease. *Rheumatology*. 2005;44:614-7.
- Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*. 2006;4:53-65.
- Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI, McClelland RL, O'Kane DJ, Meyer FB, et al. Endothelial nitric oxide synthase T-786C single nucleotide polymorphism. A putative genetic marker differentiating small versus large ruptured intracranial aneurysms. *Stroke*. 2003;34:2555-9.
- Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, et al. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol*. 2005;24:218-24.
- Özüm U, Bolat N, Gül E, Özdemir Ö. Endothelial nitric oxide synthase gene [G894T] polymorphism as a possible risk factor in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir*. 2008;150:57-62.
- Hooper WC. The relationship between inflammation and the anticoagulant pathway: The emerging role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). *Curr Pharm Des*. 2004;10:923-7.
- Salimi S, Firoozrai M, Zand H, Nakhaee A, Shafiee SM, Tavilani H, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in patients with coronary artery disease. *Ann Saudi Med*. 2010;30:33-7.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
- Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). México D. F. Secretaría de Salud 2010 [consultado 12 May 2013]. Disponible en: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786>C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999;99:2864-70.
- Dursun H, Noyan A, Matyar S, Buyukcelik M, Soran M, Cengiz N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 a/b VNTR polymorphism in children with APSGN. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:1661-5.
- Pimiento JM, Maloney SP, Tang PCY, Muto A, Westvik TS, Fitzgerald TN, et al. Endothelial nitric oxide synthase stimulates aneurysm growth in aged mice. *J Vasc Res*. 2008;45:251-8.
- Colombo MG, Andreassi MG, Paradossi U, Botto N, Manfredi S, Masetti S, et al. Evidence for association of a common variant of the endothelial nitric oxide synthase gene (Glu²⁹⁸→Asp polymorphism) to the presence, extent, and severity of coronary artery disease. *Heart*. 2002;87:525-8.
- Serrano NC, Díaz LA, Casas JP, Hingorani AD, Moreno-de-Luca D, Páez MC. Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. *BMC Genetics*. 2010;11:54-61.
- Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gómez-Casado E, Longas J, Gonzales-Hevilla M, et al. HLA genes in Mexican Mazatecos, the peopling of the Americas and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens*. 2000;56:405-16.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernández-López JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo population to develop genomic medicine in México. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:8611-6.