

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“Asociación de polimorfismos de los genes del sistema renina
angiotensina en la susceptibilidad al desarrollo
de hipertensión arterial sistémica”

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Genómicas

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. NANCY LUCERO MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Director: Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Co-director: Dr. Mario César López Camarillo

MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2009

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITE TUTORAL

DIRECTOR

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Jefe del Departamento de Biología Molecular
Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”

CO-DIRECTOR

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM

ASESORES

Dr. Sara Frías Vázquez

Profesora investigadora. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM
Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Humberto Nicolini Sánchez

Profesor investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas, UACM
Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci, S.C.

Dr. David Cruz Robles

Investigador en Ciencias Médicas “D”
Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez

Investigador en Ciencias Médicas “C”
Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”

Presentación

El presente proyecto de investigación contó con el apoyo académico y económico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México dentro del programa de maestría en Ciencias Genómicas, este programa pertenece al Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACyT) con número de registro: 000107 y con clave: 007308.



El apoyo otorgado para la realización de esta tesis fue gracias al CONACyT, a través del Convenio de Asignación de Beca Nacional para estudios de Maestría con número de registro 215572.



La presente tesis forma parte del proyecto "*Participación de polimorfismos de los genes del sistema renina-angiotensina en la susceptibilidad al desarrollo de la hipertensión*"; financiado por el fideicomiso del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (SSA /IMSS/ISSSTE-CONACyT) con clave No. 87856.

El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Genómica del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".



Agradecimientos

Al CONACyT por el apoyo brindado al Incremento de la capacidad científica y tecnológica de México y sobre todo a la formación de nuevos investigadores.

A la Maestría en Ciencias Genómicas por haberme recibido en sus aulas y a todos los profesores por su apoyo, interés y dedicación para cada uno de los alumnos de la Maestría.

Al Dr. Gilberto Vargas Alarcón con el que ha sido un auténtico placer trabajar desde hace 6 años; me ha ayudado, dirigido y enseñado a dar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia. Sin su orientación, sin sus consejos, sin su sosiego y tranquilidad en los momentos complicados, y sin su pasión por este trabajo, no se hubiera podido finalizar este proyecto. Muchas Gracias, por darme tantas oportunidades.

Al Dr. José Manuel Rodríguez Pérez, por sus enseñanzas de biología molecular, como de la vida. Y sobre todo por impulsarme a seguir en la investigación cuando más lo he necesitado.

Al Dr. David Cruz Robles, por todos los buenos consejos, anécdotas y su implicación en este trabajo

Al Dr. Mario César López Camarillo, por su apoyo y disponibilidad en el transcurso de la estancia en este Posgrado.

A La Dra. Sara Frías Vázquez y Dr. Humberto Nicolini Sánchez, gracias por sus sabios consejos.

Al Departamento de Biología Molecular, y a cada integrante del Laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cardiología.

Dedicatorias

Quiero agradecer a Dios y especialmente a toda mi familia con los que, indudablemente, he pasado los mejores momentos de mi vida; a mis padres, Rosa y Jesús, y a mi hermana Ady por su apoyo incondicional en todo momento y gracias sobre todo, a mis sobrinos Jesús y Diego, porque ellos hacen que nada sea aburrido y a mis abuelitos Rosa y Rafa. Gracias a todos por dejarme disfrutarlos, sin Ustedes no habría podido concluir esta parte importante de mi vida.

A Luis por todo ese apoyo incondicional, por la comprensión, tolerancia y Amor, por estar conmigo en los tiempos difíciles y enseñarme a seguir adelante, pero sobre todo gracias por ser mi compañero de sueños...

A mis Grandes Amigos Nona, José y Selene por compartir laboratorio, cafés, comida, y muchas agradables y largas tertulias, pero mil gracias por su amistad y su comprensión que ha perdurado a través de los años.

A mis compañeros del laboratorio de Genómica David, Fragoso y Silver, por su apoyo en estos últimos años para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de Maestría, por la convivencia y el apoyo que me brindaron.

A la familia González Granillo por los agradables momentos, por su simpatía, cordialidad y amabilidad.

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
RESUMEN.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE GRÁFICAS.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.- ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA.....	3
1.1. Panorama clínico-epidemiológico de la hipertensión arterial.....	3
1.2. Fisiopatogenia de la hipertensión arterial esencial (HAS).....	7
1.2.1. Factores que regulan el tono vascular.....	7
1.2.2. Óxido nítrico	9
1.2.3. Prostanoides	15
1.2.4. Especies reactivas de oxígeno.....	18
1.2.5. Otros factores.....	23
1.3. Sistema renina-angiotensina.....	24
1.3.1. Mecanismos de señalización de la angiotensina II	26
1.4. Alteraciones vasculares con la hipertensión	31
1.4.1. Alteraciones en el sistema renina-angiotensina.....	34
1.5. La hipertensión como enfermedad inflamatoria.....	37
1.6. Estrategias para el estudio de genes involucrados en enfermedades.....	40
1.6.1. Estudios de asociación alélica	41
1.6.1. Causas de asociación.....	41
1.6.3. El genoma humano y los estudios de asociación	42
1.6.4. Importancia de los SNPs en los estudios genéticos.....	43
2. ESTADO DEL ARTE	45
2.1. Gen del angiotensinógeno (AGT).....	45
2.2. Gen del receptor tipo 1 de angiotensina II (AGTR1).....	51
2.3. Estudios en otras poblaciones	58

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO	60
4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA	61
II. OBJETIVOS.....	63
1. Objetivo general	63
2. Objetivos particulares.....	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
1. Diseño de estudio.....	64
2. Estrategia general	64
3. Sujetos de estudio:.....	66
3.1. Criterios de inclusión:	66
3.2. Criterios de exclusión	67
4. Estudio Genético	68
4.1. Extracción de ADN	68
4.2. Selección de oligonucleótidos de los sitios polimórficos.	69
4.3. Discriminación alélica por la técnica de PCR Tiempo Real usando el sistema TaqMan. .	71
4.4. Análisis estadístico	76
4.5. Haplotipos	76
IV. RESULTADOS	81
1. Características clínicas de los grupos de estudio	81
2. Estudio Genético	82
2.1. Análisis de polimorfismos del gen AGT y del gen AGTR1	82
3. Haplotipos	104
3.1. Haplotipos para los sitios polimórficos del gen AGT	104
3.2. Haplotipos para los sitios polimórficos del gen del AGTR1	107
V. DISCUSIÓN.....	110
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFIA.....	118
Anexo I.....	137

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico	AA	ácido araquidónico
AGT	Angiotensinogeno	AC	adenilato ciclasa
AGTR1	Receptor tipo 1 de angiotensina II	ACh	acetilcolina
ARNm	adenosín ribonucleótido mensajero	ADNc	adenosín desoxirribonucleico complementario
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos básico	AG	aminoguanidina
COX	Ciclooxigenasa	AG	aminoguanidina
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo	AMPc	adenosín monofosfato cíclico
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2	Ang	angiotensina
DP	receptor de PGD2	AP-1	activador de la proteína 1
EDHF	factor hiperpolarizante derivado de endotelio	AT1	receptor de la angiotensina, subtipo 1
EGF	factor de crecimiento epidérmico	AT2	receptor de la angiotensina, subtipo 2
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial	AT4	receptor de la angiotensina, subtipo 4
ENSA	Encuesta Nacional de Salud	CaM	calmodulina
ENSANUT	Encuesta de Salud y Nutrición	CRE	Elemento de respuesta de AMPc
Fa	Frecuencia alélica	DAG	Diacilglicerol
FAD	flavín adenosín dinucleótido	DL	Desequilibrio de ligamiento
FMN	flavín adenosín mononucleótido	ECA	Enzima convertora de angiotensina
FRET	Transferencia de energía fluorescente mediante Resonancia.	EP	receptor de PGE2
GCs	Guanilato ciclasa soluble	ET	Endotelina
GTP	guanosín trifosfato	FAK	quinasas de adhesión focal
HAS	Hipertensión arterial Sistémica	fg	Frecuencia genotípica
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1	FP	receptor de PGF2 α
IMC	Índice de masa corporal	GMPc	guanosín monofosfato cíclico
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática	H2O2	peróxido de hidrógeno
INFγ	interferón- γ	HDL	Lipoproteína de alta densidad

iNOS	óxido nítrico sintasa inducible	IC	Intervalo de confianza
IP3	inositol 1,4,5-trifosfato	IGF-1	factor de crecimiento similar a insulina 1
IRAP	aminopeptidasa regulada por insulina	IL	Interleucina
LCK	quinasa de la cadena ligera de la miosina	IP	receptor de PGI2
LDL	Lipoproteínas de baja Densidad	IκB	proteína inhibitoria del factor nuclear κB
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos	LPS	Lipopolisacárido
MDA	malondialdehído	MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos 1
NAD(P)H	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato, forma reducida	MLC20	cadena ligera de la miosina
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey	NADH	nicotín adenín dinucleótido
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal	NF-κB	factor nuclear de transcripción κB
OMS	Organización Mundial de la Salud	NO	óxido nítrico
ONOO-	Peroxinitrito	O2.-	anión superóxido
PAF	factor activador de plaquetas	PAD	presión arterial diastólica
PAS	presión arterial sistólica	Pb	Pares de bases
PCR-TR	PCR en tiempo real	PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina	PI3K	proteína fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	fosfatidil inositol 4,5-bifosfato	PKA	proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína quinasa C	PKG	proteína quinasa dependiente de GMPc
PLA2	fosfolipasa A2	PLC	fosfolipasa C
PTP	proteínas tirosín fosfatasas	PPAR	receptor activador de la proliferación de peroxisomas
RANTES	quimiocina regulada sobre activación, célula T normal expresada y secretada	RFLP's	Fragmentos de restricción Polimórfica
SDS	dodecil sulfato sódico	RM	Razón de momios
SERCA	ATPasa de retículo sarcoplasmático	ROS	especies reactivas de oxígeno
SHRSP	SHR "Stroke Prone"	RS	retículo sarcoplasmático
SRA	Sistema Renina angiotensina	SHR	rata espontáneamente hipertensa
SSA	Secretaría de Salud.	SNP	Polimorfismo de un solo

STAT	activador de la transcripción y de la señal de transducción	SOD	nucleótido superóxido dismutasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral α	TGF-β	factor de crecimiento transformante- β
TXA2	tromboxano A2	TP	receptor de TXA2
VEGF	factor de crecimiento de células endoteliales vasculares	UTR	región sin transcribir
		VCAM-1	molécula de adhesión de célula vascular 1

RESUMEN

Objetivo: Evaluar si existe alguna asociación entre los polimorfismos del gen del receptor tipo I de angiotensina II (*AGTR1*) y el gen del angiotensinógeno (*AGT*) con el riesgo de desarrollar hipertensión arterial sistémica (HAS) en un grupo de pacientes hipertensos mexicanos.

Material y Métodos: El estudio comprendió a 115 individuos con HAS y 291 individuos normotensos, pareados por características clínico-demográficas. Se analizaron los polimorfismos -777 A/T, -680 A/T, -119 A/G, 43732 C/T y 44221A/G del gen *AGTR1* y los sitios -532 C/T, -217 A/G, -6 A/G, 235 M/T y 174 T/M del gen *AGT* con ensayos Taqman por PCR en tiempo real. Las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron por conteo directo, evaluando el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de chi-cuadrada. El riesgo relativo (RR) se evaluó como razón de momios (RM) usando el método de Woolf. La construcción y análisis de haplotipos se realizó usando el programa Haploview versión 4.1.

Resultados: Las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos de estudio en las posiciones -532 C/T, -6 A/G y 235 M/T del gen *AGT* fueron similares, en cuanto a la posición -217 A/G los hipertensos mostraron incremento del genotipo AG al comparar con el grupo control ($p=0.026$; $RM=1.86$). De igual forma, en el sitio 174T/M los hipertensos mostraron un incremento del genotipo MM al compararse con el grupo control ($p=0.046$; $RM=1.52$). En ambos grupos de estudio las frecuencias alélicas y genotípicas de las posiciones -777 A/T, -680 A/T, -119 A/G y 44221 A/G fueron similares. Los hipertensos presentaron un incremento en la frecuencia del alelo C del polimorfismo 43732 C/T al comparar con el grupo control ($pC=0.046$, $RM=1.42$). Por otro lado, los hipertensos presentaron disminución en la frecuencia del alelo T de este mismo polimorfismo ($pC=0.046$, $RM=0.70$). Se detectaron 6 haplotipos del gen del *AGTR1*, de ellos 2 (TTATA y TTACA) presentaron diferencias en su distribución. Los hipertensos mostraron incremento en la frecuencia del haplotipo TTACA, y disminución del haplotipo TTATA al comparar con el grupo control ($p=0.0041$, $RM=1.58$; $p=0.025$, $RM=0.70$, respectivamente). Las frecuencias en los otros 4 haplotipos (AGGCA, TTACG, TTATG y AGGTA) fueron similares en ambos grupos de estudio.

Conclusiones: Los datos sugieren que el genotipo AG del sitio -217 A/G y el genotipo MM del sitio 174 T/M podrían conferir un riesgo mayor al desarrollo de HAS. El alelo C del polimorfismo 43732 C/T podría conferir susceptibilidad genética para el desarrollo de HAS, mientras que el alelo T podría ser un marcador de protección en este padecimiento. En el caso de los haplotipos, se detectó un bloque que confiere mayor riesgo para HAS (TTACA) y uno que podría ser protector (TTATA).

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Mecanismos intracelulares implicados en la contracción muscular.	19
2	Mecanismos de relajación inducidos por el NO.	23
3	Síntesis y mecanismos de acción de prostanoides.	28
4	Vías de señalización dependientes de especies reactivas de oxígeno.	30
5	Mecanismos de contracción y relajación producidos por especies reactivas de oxígeno.	31
6	Componentes del sistema renina angiotensina.	36
7	Mecanismos de señalización mediados por la angiotensina II (AngII).	41
8	Procesos celulares mediados por angiotensina II.	45
9	Ejemplo de polimorfismo (SNP).	53
10	Localización del gen <i>AGT</i> en el cromosoma 1.	59
11	Localización del gen <i>AGTR1</i> en el cromosoma 3.	65
12	Receptor tipo 1 de angiotensina II.	65
13	Estrategia experimental en el presente estudio.	73
14	Fundamento de sondas Taqman.	82
15	Mapa de haplotipos del gen <i>AGT</i> .	83
16	Meiosis informativa y no informativa	88
17	Mapa de haplotipos del gen <i>AGT</i> .	113
18	Mapa de haplotipos del gen <i>AGTR1</i> .	116

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Diferentes efectos de angiotensina II mediados por los receptores AT1 y AT2.	37
2	Relación entre polimorfismos y enfermedades que han sido previamente reportados en diferentes poblaciones.	66
3	Polimorfismos incluidos en el presente estudio.	78
4	Componentes del ensayo Taqman.	80
5	Condiciones de termociclado para los ensayos Taqman.	80
6	Características clínicas y demográficas de sujetos hipertensos y normotensos.	91
7	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C-532T del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	92
8	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A-217G del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	94
9	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A-6G del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	96
10	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo M235T del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	98
11	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo T174M del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	100
12	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A 44221 G del gen <i>AGT</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	102
13	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo G-680T del gen <i>AGTR1</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	104
14	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A -119G del gen <i>AGTR1</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	106
15	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A-777T del gen <i>AGTR1</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	108
16	Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C43732T del gen <i>AGTR1</i> en el grupo de hipertensos y de individuos normotensos.	110
17	Resultados de equilibrio de ligamiento de los sitios del gen <i>AGT</i> .	114
18	Haplotipos para el gen <i>AGT</i> .	114
19	Resultados de equilibrio de ligamiento de los sitios del gen <i>AGTR1</i> .	117
20	Haplotipos para los sitios del gen <i>AGTR1</i> .	117

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Descripción	Página
1	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo C y T del sitio C-532T.	93
2	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo CC, CT y TT del sitio C-532T.	93
3	Comparación de frecuencias alélicas (<i>fa</i>) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-217G.	95
4	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A-217G.	95
5	Comparación de frecuencias alélicas (<i>fa</i>) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-6 G.	97
6	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A-6G.	97
7	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo M y T del sitio M235T.	99
8	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo MM, MT y TT del sitio M235T.	99
9	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo M y T del sitio T174M.	101
10	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo MM, MT y TT del sitio T174M.	101
11	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A 44221G.	103
12	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A 44221G.	103
13	Comparación de frecuencias alélicas del sitio G-680T entre hipertensos e individuos normotensos del alelo G y T.	105
14	Comparación de frecuencias genotípicas del sitio G-680T entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo GG, GT y TT.	105
15	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-119G.	107
16	Comparación de frecuencias genotípicas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG, GG del sitio A-119G.	107
17	Comparación de frecuencias alélicas entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y T del sitio A-777T.	109

18	Comparación de frecuencias genóticas entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AT, TT del sitio A-777T.	109
19	Comparación de frecuencias alélicas del sitio C43732 T entre hipertensos e individuos normotensos del alelo C y T.	111
20	Comparación de frecuencias genóticas C43732T entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo CC, CT y TT.	111

I. INTRODUCCIÓN

La Hipertensión Arterial Sistémica (HAS), representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Whitworth J.A., 2003). Desde el punto de vista clínico la Organización Mundial de la Salud (OMS), la clasifica como una enfermedad cuya manifestación "visible" se presenta con una elevación sostenida de la presión arterial sistólica \geq a 140 mmHg y una presión diastólica \geq a 90 mmHg. De acuerdo a estos parámetros el 25% de la población adulta de las sociedades industrializadas está afectada por esta enfermedad (Mosterd A., et al. 1999). La hipertensión arterial, es considerada como una "señal de alerta" de alto riesgo, con probabilidad de poder padecer algún tipo de enfermedad cardiovascular, como infarto o accidente cerebrovascular, las cuales son la primera causa de muerte en México, provocando un 30% de las defunciones en adultos mayores (Conapo., 2003). Este enemigo silencioso generalmente no causa síntomas durante muchos años, hasta que lesiona un órgano vital como el corazón, el cerebro o los riñones (García-Barreto., 2009).

La hipertensión arterial es una enfermedad compleja en la cual hay una interacción importante entre factores genéticos y ambientales para producir su desencadenamiento. La contribución genética a la variación en la presión sanguínea se estima entre 30 y 50%. (Lifton R.P, et.al., 1995) Diversos estudio de ligamiento genético en familias con múltiples casos han permitido la detección de diversos genes candidatos como responsables de este padecimiento. Un grupo de estos genes son aquellos que codifican para los componentes del Sistema Renina Angiotensina (SRA) (Karet F.E.,et.al., 1997; Corvol P.,et.al.,1997). El SRA es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. La renina es secretada por las células yuxtglomerulares en el túbulo contorneado distal de las nefronas renales. Esta enzima cataliza la conversión del angiotensinógeno (AGT), proteína secretada en el hígado, en angiotensina I (Ang I) que, por acción de la enzima convertora de angiotensina (ECA), la cual es secretada por las células endoteliales de los

pulmones, es convertida en el vasoconstrictor más potente del organismo: la angiotensina II (Ang II). Además, estimula la secreción de ADH (también llamada vasopresina, u hormona antidiurética) por la neurohipófisis, la cual estimula la reabsorción a nivel renal de agua y produce la sensación de sed; y de la hormona aldosterona (en las glándulas suprarrenales) con lo que produce la reabsorción de sodio a nivel renal. (Guyton A.C., 1997). La angiotensina es el nombre genérico dado a diversos péptidos bioactivos provenientes de la degradación enzimática del angiotensinógeno (AGT). Por su importancia biológica, el principal de ellos es la angiotensina II, sin embargo, también se han descrito acciones biológicas para angiotensina (I), angiotensina (1-7) y angiotensina (1-9). Aunque la función principal de estas hormonas es el control de la presión sanguínea. Desde hace ya varias décadas, se sabe que también ejercen acciones reguladoras muy importantes a nivel de procesos inflamatorios y profibróticos y es un efectivo tratamiento en las complicaciones cardiovasculares asociadas con la hipertensión (Burnier M., et al., 2000)

Se sabe que los genes que codifican las proteínas que forman el SRA presentan variación genética, la mayoría considerados como polimorfismos. Estas variantes tienen un efecto pequeño por separado sobre la presión arterial, pero su combinación posee un efecto acumulativo que podría dar lugar a un aumento en la presión sanguínea asociado a un mayor riesgo de episodios cardiovasculares como ataques cardíacos y enfermedad cerebrovascular (Jeunemaitre X., 1992; Porto P.I., 1998).

La presente investigación tiene por objeto establecer el papel genético de los polimorfismos del gen *AGT* y del *AGTR1* en la susceptibilidad genética al desarrollo de la HAS en la población mexicana.

1.- ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1. Panorama clínico-epidemiológico de la hipertensión arterial

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es uno de los principales factores de riesgo para sufrir un evento cardiovascular mayor, incluyendo la muerte. Existen más de 900 millones de hipertensos en el mundo, en 2001 aproximadamente 7.6 millones de personas fallecieron por causas vinculadas a la hipertensión, lo que equivaldría a más de 20 mil muertes por día (WHO/ISH., 2003). Por lo tanto, desde ese año hasta la actualidad se estima que 50 millones de personas han fallecido por esta enfermedad, y muchas más sufrieron algún grado de discapacidad. El 80% de estas muertes se produjo en países en vías de desarrollo. (Lewington S. et.al., 2002).

En México, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA, 2000) informó una prevalencia del 30.05%, entre las personas de 20 a 69 años, esta condición afecta a más de 20 millones de adultos en México, de los cuales 10 millones además de la presión elevada, tienen alguna otra complicación y menos del 10% están controlados adecuadamente. (Mortalidad SSA., 2001).

México sufre el 80% de la carga total por hipertensión arterial y solo se dispone del 10% de los recursos que se invierten en el mundo para el diagnóstico y control de este grave problema. En nuestro país se gastan cada año 2.500 millones de dólares en asuntos relacionados a la hipertensión arterial y se sabe que menos del 5% de los mexicanos están controlados (Arredondo A, et al., 2005)

La hipertensión arterial, es una enfermedad crónica degenerativa que causa daño vascular sistémico, disminuye la calidad de vida y es uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de padecimientos cardiovasculares y cerebrovasculares.

En términos generales se puede afirmar que la HAS afecta a uno de cada 4-5 adultos. Dado que su prevalencia aumenta con la edad, y que la sociedad actual evoluciona hacia el envejecimiento de la población, es de esperar que dentro de una década, la HAS afecte a más del 50% de las personas adultas.

Por ello, la HAS es el principal factor responsable de los ictus cerebrales aterotrombóticos; el segundo factor responsable de los infartos de miocardio y el tercer factor responsable de la enfermedad aterosclerótica. Estos datos muestran un panorama del papel que desempeña la HAS en la elevada morbimortalidad asociada a la aterosclerosis. Además, la HAS daña la estructura y la función de los parénquimas de aquellos órganos considerados diana, como son: cerebro, corazón y riñón. Por ello, la HAS es un determinante crítico del desarrollo de deterioro cognitivo cerebral, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal, ya que este padecimiento es crónico, degenerativo, no curable, progresivo y con una alta tasa de secuelas. Es importante señalar que mientras que la incidencia y la prevalencia de complicaciones ateroscleróticas asociadas a la HAS ha descendido en las dos últimas décadas, no obstante, la frecuencia de aparición de alteración funcional en otros órganos crece de manera exponencial en la población hipertensa. Dado que el envejecimiento natural de la población facilita el desarrollo de este problema, se comprende bien la dimensión casi epidémica que puede llegar a alcanzar en las próximas décadas.

El panorama de la HAS debe contemplar ciertos factores determinantes y de comorbilidad para adecuar las estrategias terapéuticas por lo que es bueno considerar el impacto de la edad en la HAS. Un análisis por subgrupos de edad de toda la población hipertensa, demostró que posiblemente los mecanismos fisiopatológicos y de progresión de daño vascular son dinámicos y cambiantes. Así entre los 20 y 40 años de edad, el tipo predominante de HAS fue el de hipertensión diastólica pura, mientras que, entre los 50 y 69 años, el predominio fue de hipertensión sisto-diastólica. Por otra parte, la hipertensión sistólica pura represento el porcentaje más bajo, sin embargo, está demostró también cambios progresivos en frecuencia a partir de los 50 años. (ENSA; 2000)

Lo anterior es de gran interés ya que en países desarrollados, la prevalencia de hipertensión sistólica va en aumento, dado que existe cada vez más población de edades avanzadas. El conocimiento de este comportamiento epidemiológico puede orientar a las estrategias terapéuticas que en México se deben realizar. Así

las estrategias actuales para el tratamiento en hipertensión arterial deben contemplar no solo el diagnóstico sino también los mecanismos fisiopatológicos subyacentes de cada forma de HAS (diastólica, sisto-diastólica sistólica) y su entorno metabólico-inflamatorio; ya que el conocimiento actual dictamina que el control integral del paciente hipertenso va más allá de la simple reducción de las cifras de presión arterial.

La edad resulta, ser sin lugar a dudas un factor determinante en la prevalencia del subtipo de hipertensión arterial, sin embargo, su combinación con otras características tales como el género y factores comórbidos como la obesidad y la diabetes, permitirá implementar y adecuar la estrategia terapéutica. En mujeres pre-menopáusicas (menores de 50 años), la hipertensión diastólica pura ocupó el 41% de todos los tipos de HAS, mientras que, en el hombre de edad similar ocupó el 61.1%. Después de los 50 años, la hipertensión diastólica pura en la mujer ocupa el 28% de los subtipos de HAS y en el hombre de edad similar es de 36%. Un comportamiento similar ocurre en el subtipo sisto-diastólico, pero no en el sistólico puro. Un dato alarmante, es que la tasa de hipertensión en adolescentes es mayor en la ciudad de México que en otras ciudades de América Latina e incluso de Europa.

En cuanto a la HAS y diabetes mellitus tipo II (DM-2) se ha observado que la influencia en la prevalencia de HAS y DM-2 es bidireccional. En la ENSA 2000 se confirmó dicho postulado, ya que el ser hipertenso representó un riesgo de ser diabético, 2 veces mayor. Por otra parte, de toda la población diabética el 46.2% fue hipertenso, mientras que, en toda la población no diabética, la prevalencia de HAS fue de 28.1%. Lo anterior representó un riesgo de ser hipertenso de 1.6 veces más cuando se es diabético. Así la ENSA 2000 confirma la interacción bidireccional y reitera la necesidad de profundizar el conocimiento de los mecanismos esenciales que vinculan a ambas entidades.

La obesidad y la HAS han sido tradicionalmente relacionadas. Así los datos procedentes del NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey) en Estados Unidos muestra que la prevalencia de HAS ajustada por edad se

incrementa progresivamente conforme se incrementa el índice de masa corporal (IMC). El índice de masa corporal (IMC) es una medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo, en donde un individuo con un IMC normal es de 18.5 a 25 kg/m², sobrepeso >25kg/m² y obesidad >30 kg/m². De acuerdo a NHANES III, la HAS en sujetos obesos con un IMC \geq 30 kg/m² fue de 38.4% para el hombre y de 32.2% para la mujer, comparado con sujetos normales con un IMC < 25 kg/m² fue del 18.6% en hombres y 16.5% en mujeres, es decir, un riesgo relativo de 2.1 para el hombre y un 1.9 para la mujer. En México según ENSA 2000, la prevalencia de HAS en la población obesa (IMC>30), fue de 40.5%; presentándose en el género masculino 46.1% y en el femenino 36.0%. Lo anterior sugiere que la obesidad como problema de salud en México y como factor de riesgo cardiovascular puede incluso ser superior a lo informado en países desarrollados. La prevalencia de HAS en la población no obesa fue de 24.6%, lo cual representa un riesgo de 2.56 veces más de ser hipertenso si se es obeso. El incremento en la prevalencia de HAS de la población obesa fue consistente en todos los grupos de edad y género.

Otro factor importante es la proteinuria, que es la presencia de proteína en la orina en cuantía superior a 150 mg en la orina de 24 horas. Esta ha sido documentada como un factor de riesgo adicional para mortalidad en accidente vascular cerebral e insuficiencia renal. La proteinuria también es un marcador de progresión de daño a órgano blanco. En la ENSA 2000, se encontró una prevalencia de proteinuria de 9.15%. Sin embargo, de todos los proteinúricos cerca del 40% fueron hipertensos. Cuando se combino HAS y DM-2 se observó que de toda la población diabética sin HAS, la prevalencia de proteinuria fue del 9.3%, mientras que, si se es diabético con HAS la prevalencia se incrementa a 19.3%. La ENSA 2000, confirma que la HAS en el paciente diabético es un factor de riesgo para la prevalencia de proteinuria.

En el estilo de vida, la HAS y el tabaquismo están fuertemente relacionados, la prevalencia de HAS es mayor en sujetos con hábito de fumar, esto resultado de interés ya que esta relación es más significativa a edades entre los 20 y 40 años. Sin embargo, en este mismo periodo donde el por ciento de fumadores activos predomina, sobre todo en el género masculino. Por lo que es difícil atribuir una relación de casualidad. No obstante, ha sido demostrada la participación del tabaquismo como factor de riesgo cardiovascular.

1.2. Fisiopatogenia de la hipertensión arterial esencial (HAS)

1.2.1. Factores que regulan el tono vascular

El principal determinante de la contractilidad del músculo liso vascular es el nivel de Ca^{2+} libre intracelular. Tanto la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, como su salida desde los depósitos intracelulares promueven el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Diversos son los mecanismos que originan este aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Así, la activación de receptores acoplados a proteínas G por agonistas de naturaleza contráctil, promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC) que genera diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5- trifosfato (IP3) a partir de fosfatidil inositol 4,5- bifosfato (PIP2). El DAG estimula la proteína quinasa C (PKC), mientras que el IP3 promueve la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático (RS) por activación del receptor-IP3 de la membrana del retículo. Por otra parte, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que se activan por despolarización de la membrana, así como los canales de Ca^{2+} acoplados a receptores, también van a contribuir al incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Horowitz, et.al., 1996). Cuando los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan, se produce un acoplamiento del mismo a la calmodulina (CaM); el complejo Ca^{2+} -CaM se une a la enzima cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que se encuentra en forma inactiva, formando un complejo enzimático que cataliza la transferencia de grupos fosfato a la cadena ligera de la miosina (MLC20), incrementando así la actividad ATPasa de la miosina y la contracción muscular (Gao, et.al., 2001) (Fig. 1).

La activación de proteínas G acopladas a receptores, no sólo estimula la PLC, sino que también puede activar la fosfolipasa A2 (PLA2) y la biosíntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (AA); además, puede activar Rho-quinasas y cascadas de proteínas cinasa activada por mitógenos (MAPK-Ras). La PKC, Rho-quinasa y MAPK pueden fosforilar directamente la MLC20, incrementando la actividad ATPasa de la miosina. Además el AA, la PKC y la Rho-quinasa inhiben a la enzima miosina fosfatasa, manteniendo de esa forma la fosforilación de la MLC20 (Abdel-Latif, 2001) (Fig. 1).

La relajación del músculo liso se produce como resultado de la eliminación del estímulo contráctil, o por la acción directa de sustancias que estimulan la inhibición de los mecanismos contráctiles. Los procesos de relajación requieren la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y el incremento de la actividad miosina fosfatasa (Webb, et.al., 2003). Múltiples compuestos van a generar segundos mensajeros intracelulares que promueven el inicio de una cascada de señalización molecular para producir relajación. Los nucleótidos cíclicos como adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín monofosfato cíclico (GMPc), a través de la activación de las proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA) y cinasa dependiente de GMPc (PKG), respectivamente, son los mensajeros que promueven la relajación del músculo. La activación de PKA y PKG promueve la activación de proteínas que inhiben la Ca,Mg-ATPasa del retículo sarcoplasmático, activan la Ca,Mg-ATPasa del sarcolema o inhiben canales de Ca^{2+} , participando así en la recaptación del Ca^{2+} hacia el retículo y la salida del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y disminuyen, por tanto, la $[Ca^{2+}]_i$. Además, la activación de PKA puede inhibir a la PKC disminuyendo la síntesis de IP3 y de DAG (Bomzon, et.al., 2001). El AMPc es el principal mediador de la relajación inducida por agonistas β -adrenérgicos, mientras que el GMPc media la relajación inducida por óxido nítrico y péptido natriurético auricular entre otros (Carvajal, et.al., 2000).

El tono vascular está regulado por factores vasodilatadores y vasoconstrictores liberados en gran parte, por el endotelio vascular y por la propia célula muscular lisa en respuesta a estímulos químicos o mecánicos. Algunos de esos factores como el óxido nítrico, los prostanoides o los radicales libres, los veremos más en detalle a continuación.

1.2.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es un gas que se difunde fácilmente a través de las membranas celulares y que posee potentes acciones vasodilatadoras. La NO sintasa (NOS) es la enzima encargada de sintetizar NO y L-citrulina a partir de L-arginina (L-Arg) y O₂. (Marín et.al., 1997). La NOS es funcional cuando se encuentra en forma de dímero; cada una de las subunidades contiene un dominio reductasa C-terminal y un dominio oxigenasa N-terminal. El dominio con actividad reductasa, que mantiene una gran homología con la citocromo P-450 reductasa, tiene sitios de unión para el NADPH, FAD y FMN, mientras que en el dominio con actividad oxigenasa encontramos el grupo hemo y los sitios de unión para el sustrato, L-Arg, y para BH₄ (Andrew et.al.,1999; Alderton et.al.,2001) (Fig. 3).

Muchos tipos de células son capaces de sintetizar ON. Hasta el momento se han identificado tres isoformas de la NOS, que se diferencian en su expresión y actividad. Dos de ellas se expresan de forma constitutiva en las células (cNOS) y otra se induce por estímulos inmunológicos (iNOS o tipo II). Dentro de las isoformas constitutivas, se conocen dos subtipos, eNOS (NOS III) y nNOS (NOS I).

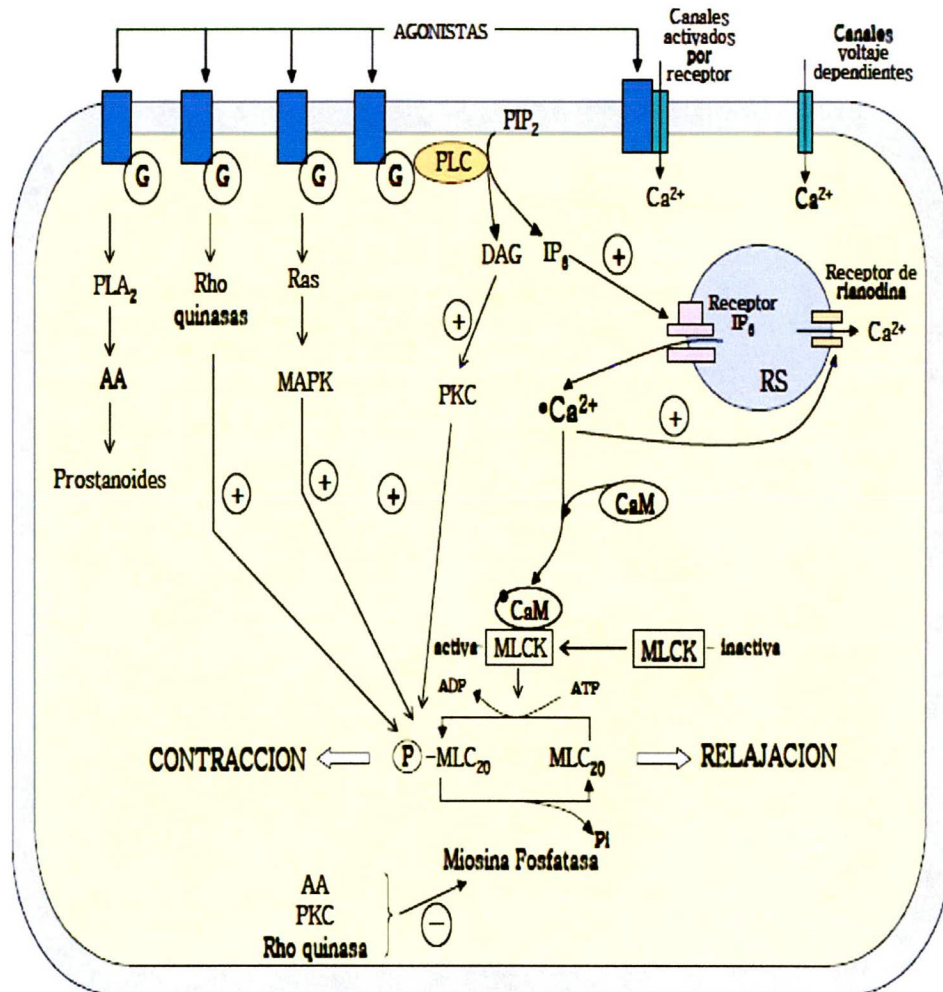


Figura 1: Mecanismos intracelulares implicados en la contracción muscular.: AA: ácido araquidónico, CaM: calmodulina, DAG: diacilglicerol, IP₃: inositol 1, 4,5-trifosfato, MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos, MLC₂₀: cadena ligera de la miosina, MLCK: cinasa de la cadena ligera de la miosina, PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, PKC: proteína quinasa C, RS: retículo Sarcoplásmico. (Adaptado de Abdel-Latif, 2001).

La isoforma eNOS se expresa constitutivamente en células endoteliales, aunque también se ha encontrado en plaquetas; nNOS se expresa en células neuronales del sistema nervioso central y periférico, y en epitelios de tráquea y bronquios. La actividad de las isoformas constitutivas es dependiente de Ca^{2+} -CaM. La isoforma inducible (iNOS) se puede expresar en macrófagos, células endoteliales, neutrófilos o células musculares lisas durante estados de inflamación o después de ser estimuladas con moléculas como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citocinas como la interleucina (IL) 1β . Su actividad, al contrario que la de las isoformas constitutivas, es independiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular. La iNOS es capaz de producir grandes cantidades de NO (Nathan, 1997), y dependiendo de las concentraciones de L-Arg, va a poder sintetizar NO, anión superóxido (O_2^-) o incluso ambos (Andrew et.al., 1999). A su vez, la interacción entre ON y O_2^- . Forma peroxinitrito (ONOO^-) (Stoclet et.al., 1999). También eNOS y nNOS, en ausencia de L-Arg o del cofactor BH4, son capaces de sintetizar O_2^- y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Andrew et.al., 1999). Cada una de las isoformas de la NOS es codificada por un gen diferente; así los genes de nNOS, iNOS y eNOS se localizan en los cromosomas 12, 17 y 7, respectivamente (Marín et.al., 1997), y su estructura genómica es similar (Alderton et.al., 2001). La regulación de las distintas isoformas de NOS es diferente; así, la isoforma inducible se regula a nivel transcripcional y post-transcripcional, mientras que las isoformas constitutivas se van a regular a nivel post-transduccional mediante la unión a diversas proteínas y por señales de fosforilación (Papapetropoulos et.al., 1999).

En condiciones fisiológicas, la producción de ON en las células endoteliales se estimula por una variedad de agonistas y por las fuerzas de rozamiento producido por el flujo sanguíneo. El ON así producido está implicado en la regulación del tono vascular y la resistencia periférica, contribuyendo, de este modo, al control de la presión arterial. El ON también interviene en la modulación de la contractilidad cardíaca, tiene propiedades vaso protectoras y antiateroscleróticas, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión a la pared vascular, y previene la liberación

del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula la proliferación de las células musculares lisas (Marín et.al., 1997; Li et.al., 2000).

La vida media del ON es del orden de segundos; por ese motivo el ON ejerce su acción sobre células cercanas al lugar de producción. La activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) es el principal mecanismo intracelular por el que el ON produce relajación (Fig. 2).

Esta enzima posee un grupo hemo al que se une el ON produciendo un cambio conformacional en la estructura que va a activar el centro catalítico (Lucas et.al; 2000; Carvajal. et.al., 2000), convirtiendo el GTP en GMPc. El GMPc, en las células musculares lisas, activa la PKG que dispara reacciones de fosforilación que provocan la relajación de las células musculares lisas (Lincoln et.al., 2001) como consecuencia de la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y la reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil. Así, la PKG activa canales de K^+ Dependientes de Ca^{2+} , de forma que se produce una hiperpolarización de la membrana celular, que conduce a la inhibición de la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Estos canales de Ca^{2+} pueden también ser fosforilados directamente por la PKG, lo que provoca su inactivación en las células musculares lisas y la consiguiente disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. Otras dianas de la PKG son las Ca^{2+} -ATPasas de la Membrana plasmática y de la membrana del retículo sarcoplasmático (SERCA), de forma que se activa la salida de Ca^{2+} de la célula a través de la primera, y la recaptación de Ca^{2+} al interior del retículo a través de la segunda. Además, la PKG fosforila el receptor de IP3 de la membrana del retículo sarcoplasmático, cuya función es promover la salida de Ca^{2+} al citoplasma, disminuyendo así su actividad (Carvajal et.al., 2000). Por otro lado, la PKG fosforila la MLCK, inhibiendo así su actividad, lo que provoca que disminuya la fosforilación de la MLC20 y, por tanto, se produce inhibición de la contracción muscular (Marín et.al., 1997; Lincoln et.al., 2001)

El ON promueve otros efectos independientes de la activación de la GCs, como son la activación directa de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , que contribuye a la relajación en algunos vasos (Bolotina, 1994). Además, es capaz de inhibir la citocromo C oxidasa (complejo IV de la mitocondria) y la enzima convertora de Angiotensina (ECA), o interaccionar con la ciclooxigenasa (COX) (Stoclet et.al., 1999). Otra reacción natural y habitual del ON es la formación de S-nitrosotioles (SNO). Estos compuestos han sido implicados en muchas de las propiedades biológicas del ON, fundamentalmente en su propiedad de unirse covalentemente a componentes críticos de proteínas celulares, como son los tioles o los metales de transición, pudiendo modificar así la función de dichas proteínas. Este es el caso de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (Bolotina et.al., 1994) y los canales de Ca^{2+} sensibles a rianodina localizados en el retículo sarcoplasmático (Stoclet et.al., 1999). Además, como ya se ha comentado, el ON puede reaccionar con el O_2^- rápidamente formando $ONOO^-$, que está implicado en procesos de citotoxicidad, de peroxidación de lípidos y nitración de proteínas. Además de su efecto vasodilatador, el ON inhibe la agregación y activación plaquetaria, la proliferación de células musculares lisas de la pared vascular, la expresión de moléculas de adhesión celular, las interacciones plaqueta-leucocito y previene la oxidación lipídica. Todo ello va a contribuir a la disminución de la trombosis o a la reducción del reclutamiento de leucocitos, entre otras acciones protectoras del ON (Naseem, 2005).

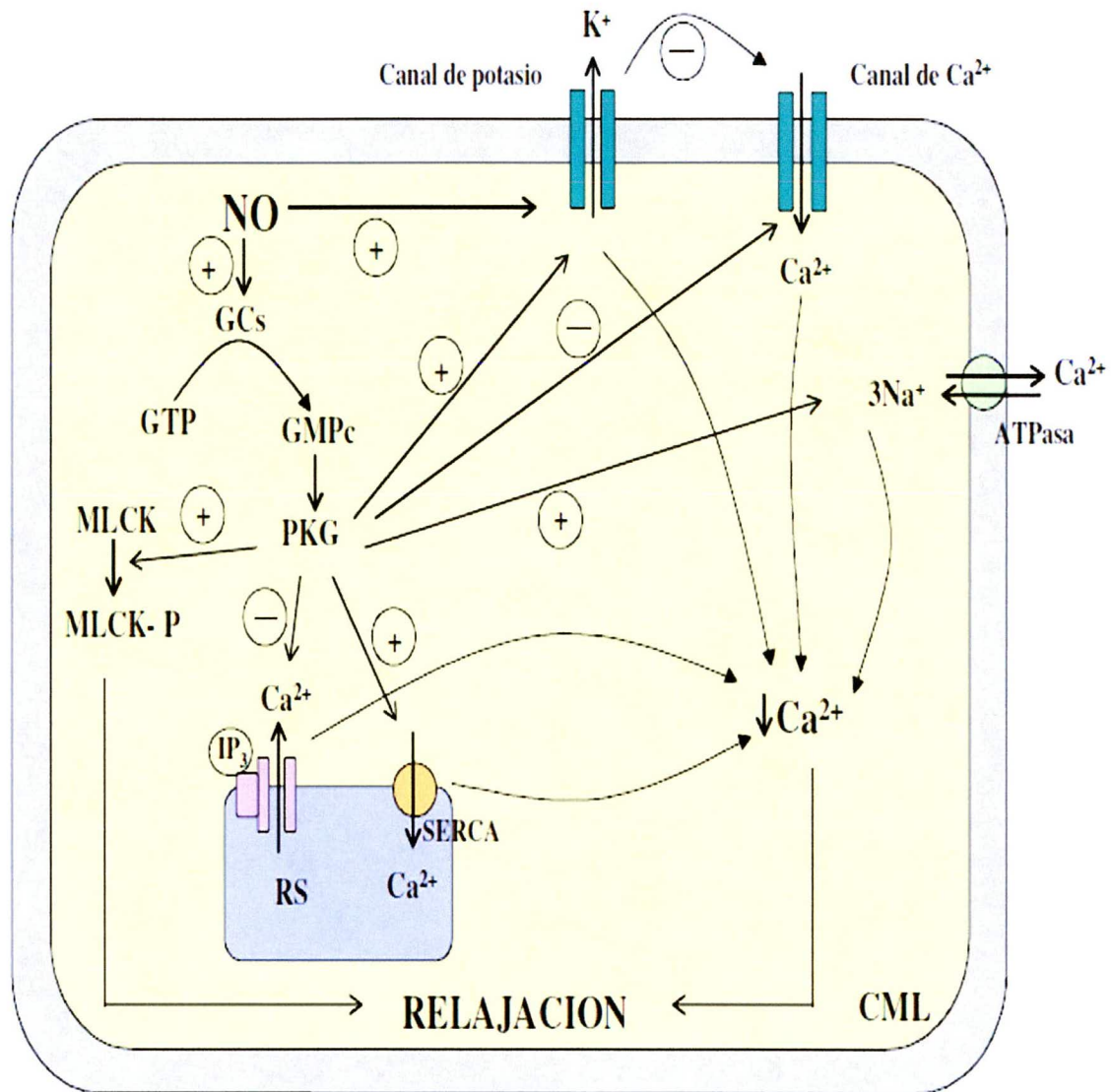


Figura 2: Mecanismos de relajación inducidos por el ON: GCs: guanilato ciclasa soluble, PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc, RS: retículo sarcoplásmico, SERCA: Ca²⁺ ATPasa del retículo sarcoplásmico, MLCK: quinasa de la cadena ligera de la miosina, IP₃: inositol 1, 4,5-trifosfato, CML: célula muscular lisa.

1.2.3. Prostanoides

Otros factores que están implicados en la regulación del tono vascular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, son los prostanoides. Dichos factores median muchas funciones fisiológicas, entre otras, la maduración del óvulo, inducción al parto, generación de fiebre, regulación de la agregación plaquetaria (Funk, 2001) y la contracción y relajación del músculo liso vascular (Wright et.al., 2001). Los prostanoides mejor caracterizados son la prostaglandina (PG) E₂, PGF₂α, PGD₂, PGI₂ y tromboxano (TX) A₂. Todos estos prostanoides van a ejercer sus efectos a través de receptores acoplados a proteínas G (Wright et.al., 2001) (Fig. 3). La enzima clave encargada de sintetizar los prostanoides es la prostaglandina H sintasa, denominada también ciclooxigenasa (COX). Todos ellos derivan del ácido araquidónico (AA), que se libera de los fosfolípidos de membrana tras la activación de la PLA₂. Posteriormente, la COX transforma el AA en PGH₂, que es el precursor de los prostanoides. La producción de cada uno de los prostanoides dependerá de las isomerasas que existan en cada tipo celular. Así, en las plaquetas se produce principalmente TXA₂ mediante la tromboxano sintetasa, mientras que en el endotelio es la PGI₂ el principal, aunque no el único, prostanoides sintetizado. La disponibilidad de AA y la actividad de la ciclooxigenasa, son puntos clave en la producción de las prostaglandinas. La COX posee dos actividades catalíticas, una ciclooxigenasa, que incorpora dos moléculas de O₂ al AA para dar PGG₂, y otra peroxidasa, que cataliza la reducción de PGG₂ a PGH₂ (Davidge, 2001) (Fig. 3).

Se han descrito dos isoformas diferentes de la COX. COX-1 es una enzima que se expresa de forma constitutiva en la mayoría de las células. COX-2 se expresa en muchos tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios como LPS o citocinas como la IL-1β; sin embargo, se ha demostrado también que se expresa constitutivamente en determinadas zonas del cerebro y del riñón (Vane et.al., 1998), por lo que la expresión de COX-2 se relaciona, sobre todo, con estados de

inflamación. En arterias mesentéricas la COX-2, se expresa en células endoteliales y adventiciales; tras la incubación con IL-1 β , la expresión de COX-2 puede ser detectada, además, en células musculares lisas (Briones et.al., 2005). Los genes de ambas isoformas se sitúan en los cromosomas 9 y 1, respectivamente. Existe un 65 % de homología entre las dos isoformas de una misma especie y su actividad catalítica es similar, pero no su regulación (Davidge, 2001). Ambas proteínas están localizadas en la membrana del retículo sarcoplasmático y en la envoltura nuclear en proporciones iguales (Spencer et.al., 1998). El gen de COX-1 consta de 11 exones y da lugar a un ARNm de 2,8 Kb y a una proteína de 70 KDa. El promotor del gen de COX-1 no posee caja TATA; sin embargo, posee sitios de unión al factor activador Sp1 en el extremo 5'. La estructura del promotor de COX-1 es característica de genes "housekeeping" o genes con actividad constitutiva. Aunque la expresión de COX-1 es constitutiva en la mayoría de tejidos, se ha descrito expresión inducible del gen de COX-1 en varios tipos celulares, bajo diferentes estímulos (Tanabe et.al., 2002; Ramsay et.al., 2003). El gen de COX-2 está formado por 10 exones y da lugar a un transcrito de 4,6 Kb y a una proteína con un peso molecular similar a la de COX-1. La expresión de COX-2 está regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. El promotor del gen de COX-2 contiene varios elementos reguladores, incluyendo una caja TATA, un sitio de unión para NF-IL6, dos sitios para AP-2, tres sitios para Sp1, dos para el factor nuclear kappa B (NF κ B), un motivo CRE (elemento de respuesta de AMPc) y un sitio E-box (Tanabe et.al., 2002). NF κ B es uno de los principales factores que van a regular la expresión de COX-2. Multitud de factores como IL1 β , LPS, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón- γ (INF γ) o factores de crecimiento van a inducir la expresión de COX-2 a través de una cascada de señalización mediada por MAPK. El estrés mecánico y el estrés producido por el fluido sanguíneo, también inducen la síntesis de COX-2. Por otro lado, ligandos del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR) y glucocorticoides reprimen la inducción de la expresión de COX-2. El ARNm de COX-2 posee una región 3'UTR; dicha región se transcribe pero no se traduce y

está involucrada en la regulación post-transcripcional de la expresión de COX-2. La región 3'UTR posee numerosas secuencias ATTTA que desestabilizan el ARNm y promueven su degradación. Algunas MAPK como p38, promueven la Estabilización del ARNm (Tanabe et.al., 2002; Ramsay et.al., 2003) Los prostanoïdes son liberados de las células que los sintetizan a través de transportadores y ejercen sus efectos por su unión con sus respectivos receptores. Así, nos encontramos con ocho receptores diferentes para los distintos prostanoïdes: TP es el receptor para TXA₂, IP el receptor para PGI₂, FP para PGF₂α, DP para PGD₂ y para PGE₂ se han caracterizado 4 subtipos de receptores (EP1-EP4). Todos estos receptores se han agrupado en tres grupos en base a su homología y a las propiedades atribuidas; IP, EP2, DP y EP4 conforman el grupo de receptores cuya activación provoca relajación muscular; están acoplados a proteínas G_s y su activación estimula la adenilato ciclasa (AC) incrementando, por tanto, el AMPc y la relajación del músculo liso. El segundo grupo lo forman EP1, FP y TP, que están acoplados a proteínas G_q y van a mediar el incremento de Ca²⁺ intracelular provocando también vasoconstricción. El tercer grupo lo constituye el receptor EP3, que está acoplado a proteínas G_i y su activación inhibe la AC, disminuyendo los niveles de AMPc y provocando vasoconstricción (Wright et.al, 2001; Funk, 2001) (Fig.3). El receptor TP también puede ser estimulado por otros prostanoïdes diferentes al TXA₂ como PGI₂, PGF₂α o PGE₂ (Dorn et.al., 1992; Williams et.al., 1994). Otros productos que inducen contracción mediada por el receptor TP son los isoprostanos, que son isómeros de la PGF₂α. Estos mediadores se producen a partir de ácidos grasos poli insaturados, por un mecanismo no enzimático catalizado por radicales libres (Cracowski et.al., 2001). Sin embargo, algunos estudios han descrito la formación de isoprostanos a través de una vía dependiente de COX (Klein et.al., 1997; Jourdan et.al., 1997; Klein et.al., 2001). En condiciones fisiológicas se produce un equilibrio entre la formación de prostanoïdes vasodilatadores y vasoconstrictores generados por COX, participando de ese modo en el mantenimiento del tono vascular; sin embargo, en algunas patologías vasculares, la producción de

prostanoides de naturaleza contráctil va a estar incrementada (Davidge, 2001; Vanhoutte et.al., 2005).

1.2.4. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas reactivas derivadas de oxígeno que se producen en todas las células aerobias y se caracterizan por tener electrones desapareados. Algunas de estas especies son altamente reactivas, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), y otras, como $\text{O}_2\cdot^-$ y ONOO^- , son menos reactivas. El H_2O_2 no es un radical libre puesto que no tiene electrones desapareados, pero se genera a partir de ellos. Las especies reactivas de oxígeno participan en los mecanismos de señalización celular, afectando así a las funciones celulares como son la contracción muscular, la expresión de genes, la proliferación, la migración y la muerte celular. Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros actuando en cascadas de señalización en numerosos tipos celulares.

Los agentes oxidantes van a inducir un incremento en la fosforilación de tirosinas debido a una inactivación de las proteínas tirosín fosfatasas (PTP). Receptores como PDGF-R y EGF-R, y proteínas como Src, JAK2, STAT, Ras, Akt/PKB, con actividad tirosina quinasa también son reguladas por ROS. Además, las MAPK son proteínas sensibles al estado redox, y van a ser activadas por las especies reactivas de oxígeno, probablemente por inactivación de fosfatasas de las MAP quinazas (MKP), que son proteínas que regulan su actividad (Touyz, 2004b).

Factores de transcripción como NF- κ B y el activador de la proteína 1 (AP-1) son redox sensibles y son activados por ROS. Estos factores de transcripción son responsables de la expresión de genes pro inflamatorios como interleucinas, moléculas de adhesión celular y proto-oncogenes (Griendling et.al., 2000a; Touyz, 2004b) (Fig. 4).

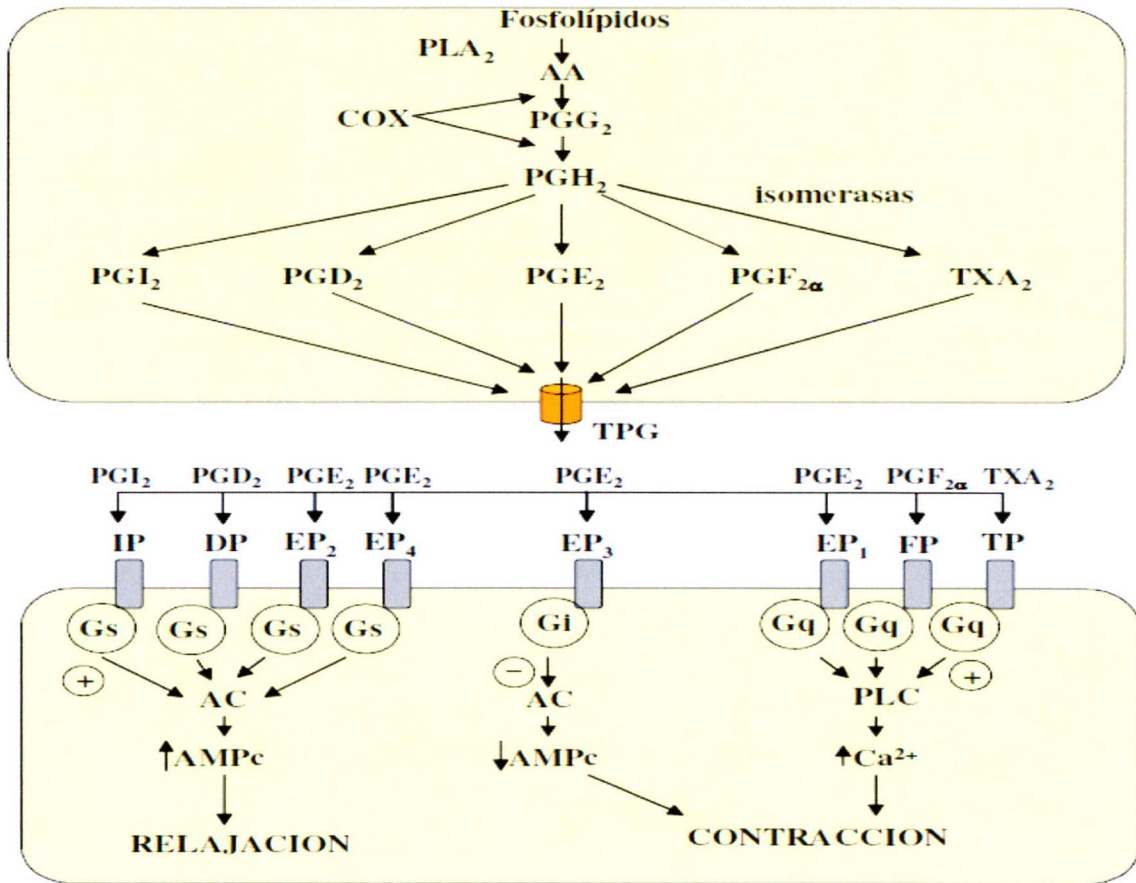


Figura 3: Síntesis y mecanismos de acción de prostanoideos: AA: ácido araquidónico, AC: adenilato ciclasa, AMPc: Adenosín monofosfato cíclico, DP: receptor de la PGD₂, EP: receptor de PGE, FP: receptor de PGF_{2α}, IP: receptor de PGI₂, TP: receptor del TXA₂, PLA₂: fosfolipasa A₂, PLC: fosfolipasa C, TPG: transportador de prostaglandinas.

La AngII es uno de los factores vaso activos más importantes en la vasculatura que van a estimular la producción de O_2^- a través de la activación de la NAD (P) H oxidasa. La activación por AngII de la PKC, de Src, de PI3K y de Rac parecen jugar un papel importante en la activación de NAD (P) H oxidasa (Cai et.al., 2003; Brandes et.al., 2005).

El O_2^- es una importante molécula de señalización intracelular que participa en la regulación del crecimiento y en los mecanismos de defensa de fagocitos. Así, las ROS van a inducir apoptosis, expresión de moléculas de adhesión o angiogénesis en células endoteliales, y crecimiento, migración celular y expresión de genes implicados en la inflamación en células musculares lisas vasculares; NF κ B es uno de los factores de transcripción que se activa por O_2^- (Taniyama et.al., 2003). Por otro lado, el O_2^- induce contracción vascular (Tosaka et.al, 2002; Didion et.al., 2002), vasodilatación (Marín et.al., 1995) y modula la contracción a diferentes agonistas (Srivastava et.al., 2002). El O_2^- puede tener efectos contráctiles por su capacidad para inactivar el ON, y respuestas vasodilatadoras a través de la formación de ONOO-, que va a estimular la GCs, y de la formación de un factor relajante de naturaleza desconocida que abre canales de K^+ sensibles a glibenclamida (Marín y et.al., 1995). La excesiva producción de O_2^- ha sido implicada en el desarrollo de la hipertensión y otras patologías cardiovasculares (Dhalla et.al., 2000). (Fig. 5).

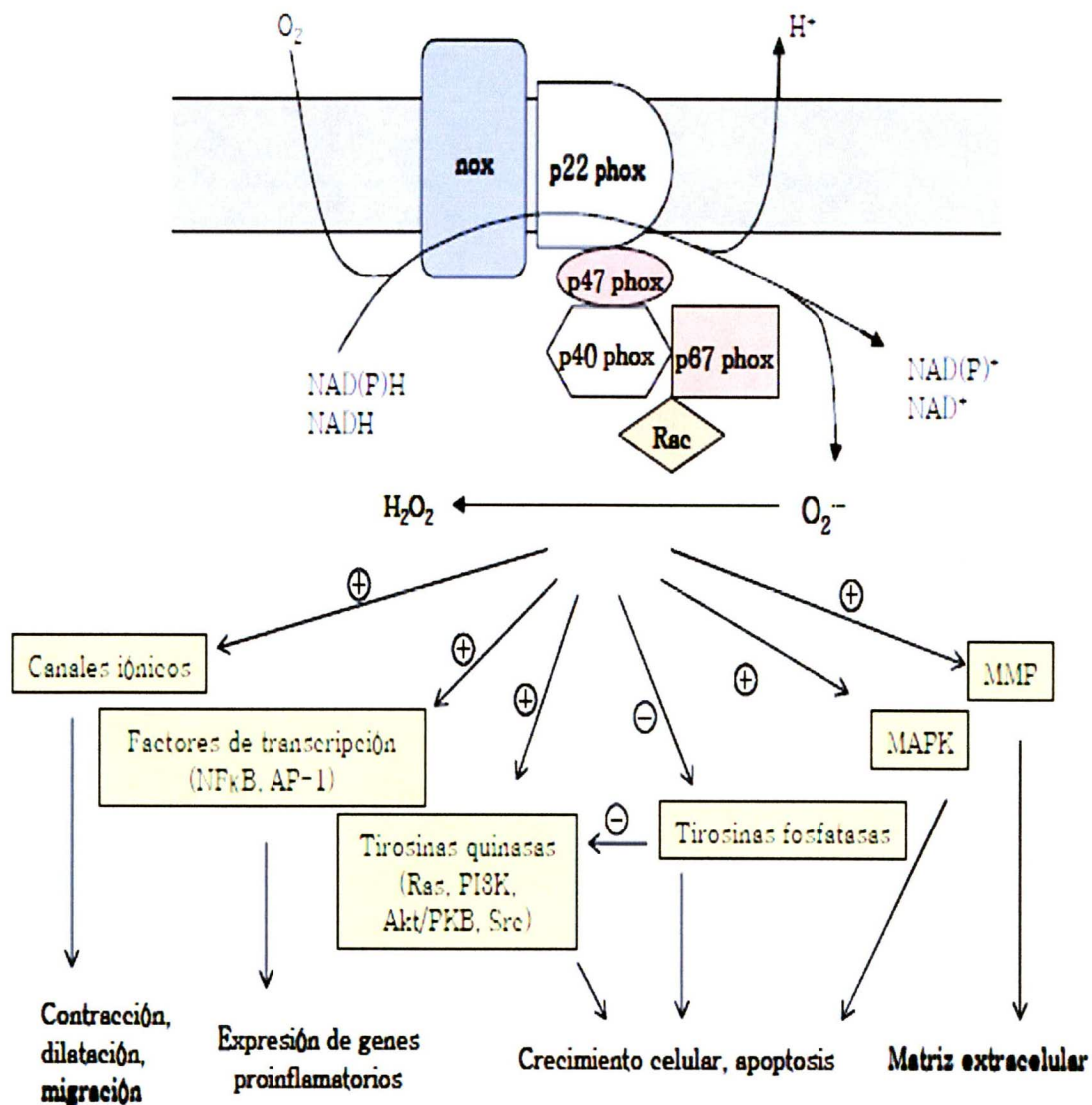


Figura 4: Vías de señalización dependientes de especies reactivas de oxígeno. Akt/PKB: proteína cinasa AKT/PKB, AP-1: activador de la proteína 1, NFkB: factor nuclear kB, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MMP: metaloproteínas, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa. Modificado de Griendling et.al., 1997 y de Touyz, 2004.

1.2.5. Otros factores

La endotelina (ET) es otro importante factor vasoconstrictor sintetizado por células endoteliales y musculares lisas (Yanagisawa et.al., 1988). Existen tres isoformas diferentes de la ET, de las que la ET-1 es la principal forma sintetizada por el músculo liso. Medio su efecto a través de su unión a los receptores de la ET, habiéndose descrito dos subtipos, ETA y ETB. Ambos receptores se expresan en células musculares lisas, con mayor predominio de ETA, donde vasoconstricción y regulación del crecimiento celular. En células endoteliales, sin embargo, los receptores ETB van a inducir vasodilatación a través de la producción de ON y PGI2 (White et.al., 2002; Schiffrin, 2005).

Existe un factor endotelial, diferente a los anteriormente mencionados, que media vasodilatación de los vasos, al que se ha denominado factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) (Chen et.al., 1988). La dilatación mediada por EDHF parece tener más importancia en arterias de resistencia y arteriolas (Tomioka et.al., 1999). Se sabe que este factor media relajación a través de la activación de canales de potasio dependientes de Ca^{2+} , provocando la hiperpolarización de las células musculares lisas. Aunque aún no se conoce la naturaleza del EDHF, se ha sugerido que pueda tratarse de un derivado del metabolismo del ácido araquidónico como son los ácidos epoxieicosatrienoico o hidroxieicosatetraenoico, sintetizados por la epoxigenasa y la lipoxigenasa, respectivamente. Otros posibles candidatos que pueden actuar como EDHF son el catión monovalente K^+ o el H_2O_2 (Bryan et.al., 2005).

1.3. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y de la homeostasis de los fluidos corporales. Originalmente fue considerado como un sistema circulante; sin embargo, se ha demostrado la existencia de un SRA local con todos los componentes del sistema, presentes en diferentes tejidos como el cerebro, el riñón, la corteza adrenal, el corazón y los vasos sanguíneos (Bader M et al, 2001). La angiotensina (Ang) II es el efector principal del SRA; se sintetiza por la acción de dos enzimas, renina y la enzima convertora de angiotensina (ECA). La renina, proteína codificada por un solo gen, es sintetizada en las células yuxtglomerulares de las arteriolas renales aferentes. En primer lugar se forma un péptido no activo, prepro-renina, que va a sufrir modificaciones post-transduccionales para dar lugar a pro-renina. A través de una proteólisis intracelular, la pro-renina va a dar lugar a renina activa (Lumbers ER, 1999). El angiotensinógeno, precursor de la AngII y sintetizado en el hígado, va a ser transformado por la renina en AngI, un péptido formado por diez aminoácidos. La ECA va a actuar sobre la AngI para dar lugar al octapéptido AngII. A través de una aminopeptidasa A, que va a degradar el extremo N-terminal de la AngII, se forma AngIII. Esta, a su vez, es modificada por una aminopeptidasa B, que va a degradar el extremo N-terminal, dando lugar a AngIV. La AngII puede, a su vez, ser modificada por diferentes endopeptidasas de tejido que van a sintetizar AngII (1-7) (Fig.6) (Lavoie JL et al., 2003).

Recientemente ha sido descrita una isoforma de la ECA, ECA2, que va a transformar la AngII en Ang (1-7) (Ferreira AJ et al, 2005). La AngII media sus acciones biológicas a través de su unión a receptores específicos anclados en la membrana plasmática celular. Han sido identificados dos subtipos diferentes de receptores, AT1 y AT2. El gen del receptor AT1, ubicado en el cromosoma 3 en la especie humana, codifica para una proteína de 359 aminoácidos con siete dominios transmembrana, y acoplada a proteínas G heterotriméricas. En roedores

se han determinado dos subtipos del receptor AT1, AT1a y AT1b, que son codificados por genes situados en los cromosomas 17 y 3, respectivamente. El receptor AT2 está codificado por un gen en el cromosoma X y está formado por 363 aminoácidos. Contiene siete dominios transmembrana unidos a proteínas G heterotriméricas (Allen AM et al.2000) y posee un 37% de homología con el receptor AT1. Además de AT1 y AT2, otro receptor identificado ha sido AT4 o también conocido como IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina), que se va a unir a AngIV (Touyz et.al., 2000). La farmacología de este receptor aún no está bien caracterizada. La Ang II (1-7) es ahora considerada un miembro activo del SRA. La importancia de dicho péptido ha sido reforzada por la identificación de su receptor, Mas, acoplado a proteínas G heterotriméricas (Ferreira AJ, et al. 2005). El receptor AT1 está presente en células musculares lisas y en la adventicia de los vasos, y es apenas detectable en el endotelio. En riñón, glándulas adrenales, corazón, cerebro y pulmón también existen receptores AT1. Por su parte, AT2 está presente en tejidos fetales pero su presencia disminuye después del nacimiento, lo que sugiere un importante papel de estos receptores en el desarrollo. Además, se han observado receptores AT2 en páncreas, corazón, riñón, en la adventicia y en tejidos con funciones reproductivas.

En adultos, la expresión del receptor AT4 es detectable en corazón, pulmón, riñón, cerebro e hígado (Touyz RM et al. 2000). ARNm del receptor Mas para la AngII (1-7) ha sido detectado en corazón, testículos, riñón y cerebro (Ferreira AJ, et al. 2005).

La AngII juega un papel muy importante en la regulación de las funciones renales, vasculares y cardíacas. Así, estimula la transmisión sináptica, la secreción de vasopresina (hormona anti diurética), la vasoconstricción y la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, y modula la ingesta de agua y la excreción renal de Na⁺. Además, participa en la regulación del tono vasomotor, del crecimiento celular, de la apoptosis y de la migración celular; induce la producción

de los componentes de la matriz extracelular y posee características pro inflamatoria (Tabla). Las múltiples acciones de la AngII están mediadas por complejos sistemas de señalización que se ponen en marcha cuando AngII se une a su receptor. La mayoría de las acciones de la AngII están mediadas a través del receptor AT1 (Touyz RM, et al. 2000).

1.3.1. Mecanismos de señalización de la angiotensina II

Cuando AngII se une al receptor AT1, en dominios especializados de la membrana denominados caveolas, se estimula la hidrólisis del PIP2 por la PLC produciendo un aumento en la formación de IP3 y DAG (Ishizaka N, et al.1998). El IP3 estimula la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmático, aumentando la [Ca²⁺]_i, y, por tanto, provocando la contracción de las células del músculo. Por otro lado, el DAG estimula la PKC, que se transloca a la membrana plasmática para fosforilar y activar proteínas que intervienen en funciones vasculares como la contracción y el crecimiento celular. La PKC media también la alcalinización intracelular del medio a través de la activación del intercambiador Na⁺/H⁺, el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y la Na⁺/K⁺ ATPasa lo que también produce contracción muscular debido al aumento de las concentraciones intracelulares de Na⁺ y Ca²⁺ y al aumento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al Ca²⁺. Además, la PKC activa proteínas tirosín quinasas, que van a modular el crecimiento celular.

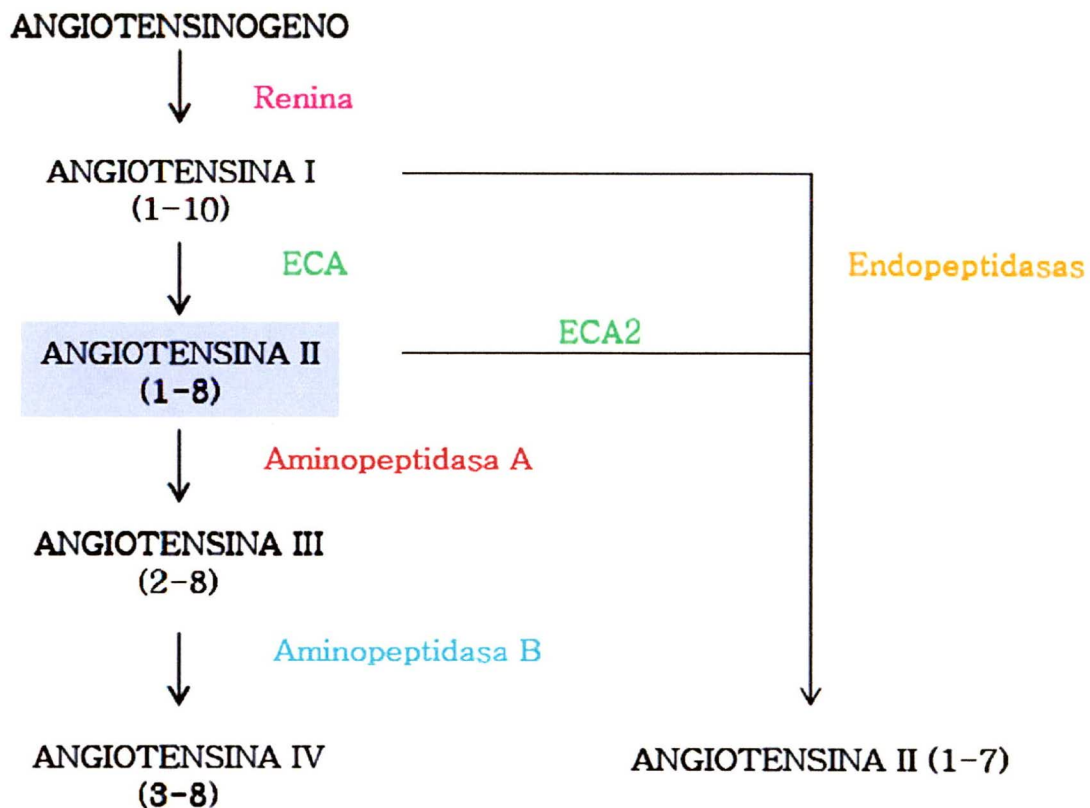


Figura 6: Componentes del sistema renina angiotensina. Simplificación del sistema renina angiotensina. La enzima de conversión de angiotensina 2 (ACE2) convierte angiotensina I en angiotensina 1-9 en el corazón y el riñón y puede balancear los efectos de la actividad de la enzima de conversión. Aunque la angiotensina 1-9 no tiene efectos conocidos sobre los vasos sanguíneos, es convertida por la enzima de conversión (ACE) a angiotensina 1-7, que es un vasodilatador. La Angiotensina II y la angiotensina III son vasoconstrictores.

Tabla 1: Diferentes efectos de angiotensina II mediados por los receptores AT1 y AT2.

Receptor AT1	Receptor AT2
-Vasoconstricción	-Desarrollo de tejido fetal
-Síntesis y secreción de aldosterona	-Inhibición del crecimiento y proliferación celular
-Reabsorción de Na ⁺ en túbulos renales	-Vasodilatación
-Incremento en la secreción de vasopresina	-Modulación de la matriz extracelular
-Disminución del fluido renal	-Regeneración celular
-Inhibición de la renina renal	-Diferenciación celular
-Hipertrofia cardíaca	-Apoptosis
-Contractilidad cardíaca	
-Proliferación de células musculares lisas vasculares	
-Incremento de la actividad noradrenérgica Periférica	
-Modulación de la actividad del sistema nervioso central	
-Formación de matriz extracelular	
-Aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno	

La activación de MAPK promueve la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, en la contracción, de proteínas del citoesqueleto como proteínas asociadas a microtúbulos, proteína básica de la mielina o caldesmina, COX-2, canales de Ca^{2+} , e intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$, proteínas todas ellas, que van a modular la contracción y el crecimiento celular (Touyz RM, et al, 2000). Además, AngII activa PLA2, la cual está implicada en la síntesis de eicosanoides, importantes mediadores en la regulación del tono y la presión vascular arterial. La activación de la PLA2 es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II y de la activación de MAPK. La AngII también activa la PLD, que va a hidrolizar principalmente fosfatidilcolina para formar ácido fosfatídico y DAG, un importante mensajero en la cascada de señalización activada por la AngII. Esta es la principal vía por la que la PKC va a permanecer activada (Fig.7) (Touyz RM, et al. 2000). Los mecanismos de señalización mediados por el receptor AT2 han sido estudiados en menor medida y no están tan definidos como los del receptor AT1. La AngII a través del receptor AT2 media la activación de proteínas tirosín fosfatasas (PTP2A) que van a inhibir el crecimiento celular a través de la inhibición de MAPK (ERK). Aunque el mecanismo aún no está claro, AT2 media vasodilatación a través de la liberación de ON y de nucleótidos cíclicos (Horiuchi M, et al. 1999) (Fig.7). También se ha relacionado el incremento de la producción de ceramidas, que pueden estar involucradas en el proceso de apoptosis celular, con la activación del receptor AT2 (Kaschina E, et al. 2003). Por otro lado, se ha descrito que el receptor AT2 puede estar involucrado en la respuesta inflamatoria observada en el daño renal a través de la activación del factor de transcripción NFκB. Así, la activación de NFκB en riñón con obstrucción unilateral del uréter, solamente es disminuida tras el tratamiento de los animales con antagonistas de ambos receptores AT1 y AT2 (Esteban V, et al.2004). La AngII (1-7), tiene efectos opuestos a los observados para la AngII: produce vasodilatación, mejora la función endotelial y tiene efectos beneficiosos a nivel cardiaco. Muchos estudios han mostrado que las acciones vasculares de la Ang II (1-7) pueden estar mediadas por el incremento en la

producción de prostanoïdes vasodilatadores, de ON y de factor hiperpolarizante derivado de endotelio. Además, la Ang II (1-7) es capaz de potenciar los efectos vasodilatadores de la bradicidina (Ferreira AJ, et al 2005). Además de los efectos ya comentados, AngII estimula la generación de radicales libres, principalmente O₂·-, por activación de la NAD (P) H oxidasa (Griendling KK, et al, 1994; Touyz RM et al., 2000). Las especies reactivas de oxígeno actúan como segundos mensajeros intracelulares e intercelulares y van a jugar un papel fundamental en el tono vascular, en el crecimiento celular y en la inflamación, como se describirá en el siguiente apartado. La AngII estimula la producción de factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF-β (factor de crecimiento transformante β), IGF-1 (factor de crecimiento similar a insulina), bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) o PAF (factor activador de plaquetas). Además, induce la síntesis de agentes contráctiles como endotelina-1, moléculas de adhesión como son ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM-1 (molécula de adhesión de célula vascular), E-selectina e integrinas, e induce la síntesis de factores quimiotácticos como TNF-α (factor de necrosis tumoral α) o MCP-1 (proteína quimioatrayerente de monocitos) e interleucina-6 (IL-6) (Touyz RM, et al, 2000; Das UN, 2005). En la producción de todos estos mediadores pro inflamatorios, el papel que juega el NFκB es fundamental. Es un factor de transcripción temprana que modula la expresión de genes; es un heterodímero formado por dos subunidades, la subunidad transactivadora p65 y la subunidad de unión al ADN p50. En células sin estimular, NFκB está unido a la proteína inhibitoria κB (IκB), que previene la translocación del factor de transcripción al núcleo celular y la unión de este al ADN. AngII incrementa la transcripción de genes pro inflamatorio bajo el control del NFκB. La infusión de AngII incrementa la activación de dicho factor de transcripción asociada a una sobreexpresión de citocinas y quimiocinas; además, el tratamiento con antagonistas del receptor AT1 disminuye la activación de NFκB y la expresión de TNF-α a nivel renal, y la inhibición del NFκB con pirrolidin ditiocarbamato, mejora la inflamación y el daño tisular (Ruiz-Ortega M, et al, 2003).

La activación del NFκB es dependiente tanto de AT1 como de AT2, como ya se ha comentado, y el mecanismo por el cual se produce activación del NFκB vía AT1 es dependiente de señales redox, de la activación de tirosín cinasas y de MAPK, mientras que la activación de NFκB vía AT2 parece ser mediado por la producción de ceramidas (Ruiz-Ortega M, et al, 2003). Recientemente, se ha demostrado que AngIV, a través de la unión a su receptor AT4, puede también incrementar el proceso inflamatorio y la activación de NFκB (Esteban V, et al. 2005) (Fig.7).

1.4. Alteraciones vasculares con la hipertensión

La hipertensión se caracteriza por un incremento en la resistencia vascular periférica acompañada de un incremento en la presión arterial. Alrededor de un 25% de la población de países desarrollados tiene aumentada la presión arterial, lo que implica un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En el último informe del Comité Nacional Conjunto en Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial, se determinó establecer tres estados de hipertensión y uno de pre hipertensión (Chobanian et.al., 2003). Así, los individuos con una presión arterial sistólica (PAS) de entre 120-139 mmHg y una presión arterial diastólica (PAD) de entre 80-90 mmHg, estarían en un estado pre hipertenso; individuos con una PAS de entre 140-159 mmHg y una PAD de 90-99 mmHg, se encontrarían en el estado 1 de hipertensión, individuos con una PAS > 160 mmHg y una PAD > 100 mmHg presentarían un estado 2 de hipertensión y por ultimo el estadio 3 se presentaría con cifras >110 mmHg y >180 mmHg (Chobanian et.al., 2003). MAPKK quinasa, MKP-1: fosfoproteína de MAPK, PA: ácido fosfatídico, PC: fosfatidilcolina, PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa, PKC: proteína quinasa C, PLA2: fosfolipasa A2, PLC: fosfolipasa C, PP2A: proteínas tirosín fosfatasa 2A, STAT: activador de la transcripción y de la señal de transducción.

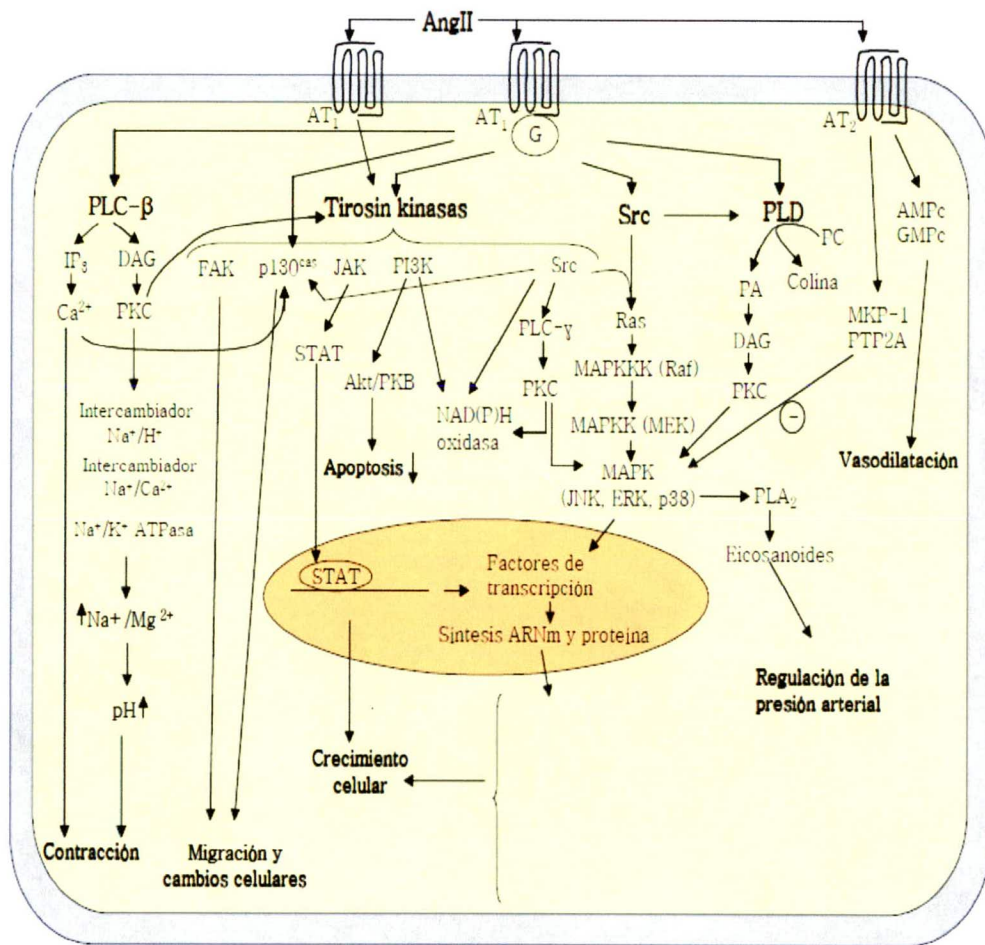


Figura 7: Mecanismos de señalización mediados por la angiotensina II (AngII). Akt/PKB: proteína cinasa AKT/PKB, AMPc: adenosina monofosfato cíclico, DAG: diacilglicerol, ERK: quinasa regulada por señal extracelular, FAK: quinasa de adhesión focal, GMPC: guanosina monofosfato cíclico, IP3: inositol 1,4,5-trifosfato, JAK: quinasa de la familia Janus, JNK: quinasa N-terminal de c-Jun, MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos, MAPKK: MAPK cinasa, MAPKKK:

La hipertensión arterial sistémica se clasifica etiológicamente en dos grupos: primaria o esencial y secundaria. En un 5% la hipertensión secundaria y es aquella cuyas causas son conocidas, entre las que se incluyen alteraciones reno vasculares, coartación de la aorta, hiperaldosteronismo o hipertiroidismo o bien inducida por drogas o fármacos (Akpunonu et.al., 1996). La etiología de la hipertensión esencial presente en un 95% no se conoce y la causa puede ser multifactorial, aunque existen factores ambientales y genéticos que contribuyen al mantenimiento de la elevada presión arterial (Carretero, et.al., 2000). La hipertensión arterial esencial es un desorden heterogéneo, puede haber considerables variaciones en la participación de los factores causales en diferentes periodos y estadios, y en diferentes individuos.

Como se ha comentado anteriormente, los factores liberados por el endotelio juegan un importante papel en la regulación de la homeostasis de la pared vascular. Variaciones en la función endotelial son consideradas uno de los principales factores responsables del incremento y mantenimiento de la presión arterial. Así, en determinados modelos de hipertensión se ha observado una disminución de las relajaciones dependientes de endotelio (Marín et.al., 1997). Sin embargo, se han descrito también respuestas aumentadas (Dowell et.al., 1999) y normales (Lüscher et.al., 1988) dependiendo del lecho vascular o el modelo de hipertensión estudiado. Además de la disfunción endotelial observada con la hipertensión, se han observado también diferencias en las respuestas contráctiles a diferentes agonistas. Así, podemos encontrar respuestas aumentadas tras la estimulación con diferentes agonistas (Dowell et.al., 1999; Dohi et.al., 1996; Zerrouk et.al., 1998) o respuestas disminuidas (Rossoni et.al., 2002a; 2002b). Por otra parte, numerosos estudios han relacionado la hipertensión con un incremento del tono simpático y con alteraciones en la biodisponibilidad de Ca^{2+} , entre otras modificaciones (Marín, 1993). Además de los cambios funcionales, la hipertensión produce cambios estructurales y bioquímicos en las distintas capas de la pared vascular. Las alteraciones estructurales, como el remodelado vascular, que

ocurren en los vasos de resistencia, van a ser consecuencia o causa del incremento de la resistencia periférica (Mulvany, 2002). Los vasos están formados por tres capas bien diferenciadas, íntima, media y adventicia. La capa íntima está formada por el endotelio y está separada de la capa media, formada básicamente por células musculares lisas, por la lámina elástica interna. La adventicia está formada por terminaciones nerviosas, fibroblastos y fibras de colágeno (Mulvany, 2005). Muchos estudios han demostrado que la hipertensión está asociada a un remodelado de los vasos de resistencia. Así, puede observarse remodelado eutrófico, cuando se produce una disminución del diámetro externo e interno (lumen) y/o un aumento en la relación media: lumen, sin observar aumento en el área de la sección media, y acompañado de un reordenamiento celular (Schiffrin y Touyz, 2004). Por otro lado, también podemos encontrar un remodelado hipertrófico cuando se produce un aumento en el área de la sección media, asociado a un aumento de material. En este caso, se produce un aumento en la síntesis de matriz extracelular, sobre todo de proteínas como el colágeno y la fibronectina. Además la actividad de enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular, metaloproteínas, también puede estar disminuida con la hipertensión, de forma que el aumento en la síntesis de proteínas de matriz se deba a una disminución en su degradación y no a un aumento en su producción (Touyz, 2005).

1.4.1. Alteraciones en el sistema renina-angiotensina

La AngII no solo produce vasoconstricción a través de la activación de PLC, sino que desencadena la activación de tirosín cinasas, que están asociadas con el crecimiento, inflamación, migración y fibrosis celular. Esto sugiere que AngII es crucial en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la pared de los vasos, y que podría jugar un importante papel en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, entre otras (Fig.8). Las terapias con inhibidores de la ECA o con antagonistas del receptor de la AngII AT1 son muy utilizadas y efectivas para el tratamiento de la hipertensión arterial, evidenciando

un importante papel del SRA en el mantenimiento de la hipertensión. De hecho, la infusión de AngII en ratas incrementa la presión arterial y disminuye las relajaciones dependientes de endotelio (Rajagopalan S, et al.1996), que son restauradas tras el tratamiento con losartán, un antagonista de los receptores AT1 de la AngII.

La AngII media daño tisular a través de la inducción de un proceso inflamatorio en el que se observa un incremento en la expresión de citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión celular e infiltración de leucocitos/monocitos. Este proceso es dependiente del estrés oxidativo mediado por AngII. Además, AngII participa en el remodelado vascular a través de la regulación del crecimiento celular, hipertrofia/hiperplasia, y de la fibrosis tisular. Este crecimiento inducido por AngII está principalmente mediado por factores de crecimiento como bFGF, PDGF, factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), y TGF- β (Cheng Y, et al. 2005). Las alteraciones en la estructura de la pared vascular, derivan en el desarrollo de varias complicaciones vasculares. Así, en la hipertensión, la fibrosis vascular se asocia a un incremento en la producción de proteínas de la matriz extracelular como son el colágeno y la fibronectina, destrucción de fibras elásticas, e hipertrofia de células musculares lisas, siendo la AngII, a través de la inducción del TGF- β , un importante mediador de estas alteraciones estructurales (Ruiz-Ortega M, et al.2003).

Por otra parte, la infusión de AngII en ratas produce la deposición de proteínas de matriz en arterias y riñón y, además, regula la expresión de factores de crecimiento profibróticos (Lombardi DM, et al. 2001). Todo ello desemboca en hipertrofia cardiaca, vascular y renal que disminuye con inhibidores del SRA, además de la disminución en la expresión de los factores de crecimiento (Kim S, et al.2000; Cheng Y, et al. 2005).

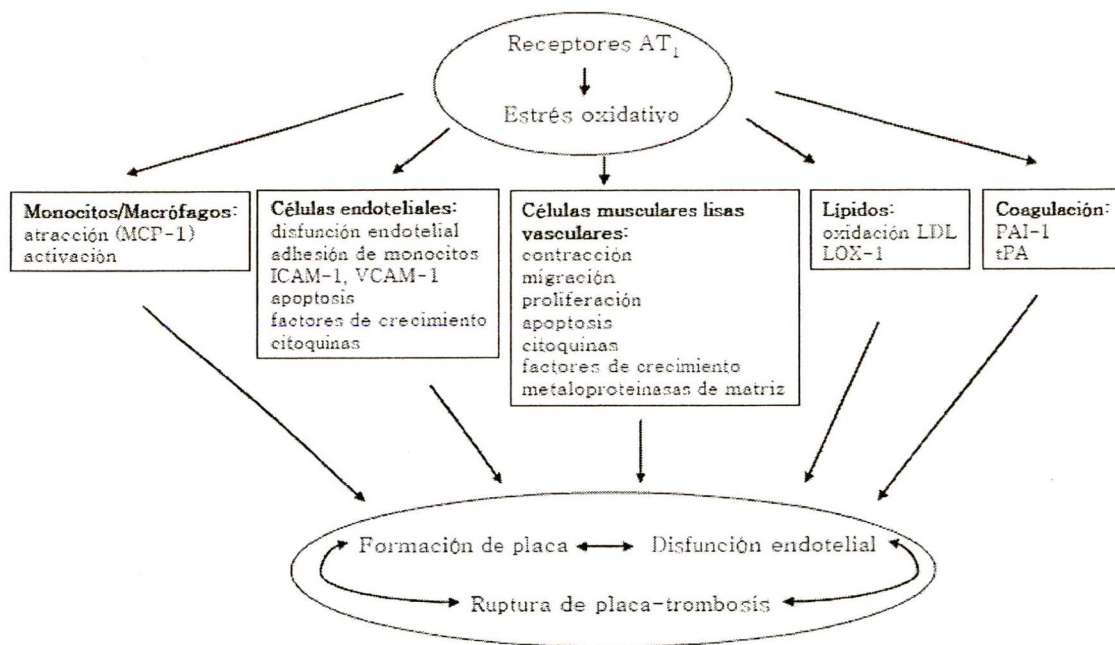


Figura 8: Procesos celulares mediados por angiotensina II. ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1, LDL: lipoproteína de baja densidad, LOX-1: lipoxigenasa, MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos, PAI-1: inhibidor de la actividad deplasminógeno 1, tPA: activador de plasminógeno tisular, VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular 1. (Modificado de Nickenig; 2002).

La disminución en la degradación de las proteínas de la matriz por las metaloproteínas, también es responsable de su acumulación. Así, en pacientes hipertensos, con elevados niveles de precursores del colágeno, las concentraciones de determinadas metaloproteínas están reducidas (Laviades C, et al. 1998). La inducción del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1) por AngII está involucrado en los efectos trombóticos y fibrosos de la AngII (Ruiz-Ortega M, et al, 2003). En los últimos años, se ha descrito un nuevo factor profibrótico, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Este factor ha sido involucrado en el desarrollo de varias enfermedades asociadas con la fibrosis, el infarto de miocardio y el daño renal. En células musculares lisas vasculares, CTGF regula la proliferación, migración y producción de proteínas de matriz. La

expresión de CTGF y la fibrosis a la que se asocia, están incrementadas en ratas infundidas con AngII. La expresión de este factor, disminuye tras el tratamiento con antagonistas del receptor AT1 de la AngII; además, el incremento de la expresión de CTGF inducido por AngII está mediado por TGF- β (Rupérez M, et al, 2003). Entre los mecanismos moleculares que median fibrosis vascular inducida por AngII, se encuentra la activación de MAPK, de tirosín quinasas, de factores de transcripción como AP-1, de PKC, o de proteínas Rho quinasas. En ratas SHR, se ha descrito un aumento en la producción de AngII y un aumento en la expresión del ARNm del receptor AT1 y de la ECA (Otsuka S, et al.1998). Además, los procesos intracelulares de señalización mediados por la AngII vía receptor AT1 están incrementados con la hipertensión, lo que va a contribuir a las alteraciones en la contractilidad, en el crecimiento celular y desarrollo de la pared de los vasos, en la expresión de genes pro inflamatorios o en la formación de proteínas de la matriz extracelular (Touyz RM, et al, 2000). Por otra parte, se ha observado un aumento en las respuestas contráctiles a AngII en aorta de animales hipertensos, asociado a un aumento en la producción de prostanoïdes contráctiles derivados de COX-2 (Zerrouk A, et al, 1998). Además, la AngII induce disfunción endotelial y en pacientes hipertensos, la inhibición del SRA aumenta las relajaciones endotelio-dependientes, al contrario que el antagonista de los receptores β atenolol, que no mejora las relajaciones a pesar de disminuir la presión arterial (Schiffrin EL, et al, 2002), lo que implica al SRA en el deterioro de la relajación endotelial. La formación de O₂- por la NAD (P) H oxidasa tras la activación con AngII podría estar participando en la disminución de la relajación endotelio dependientes observadas en la hipertensión (Rajagopalan S, et al 1996).

1.5. La hipertensión como enfermedad inflamatoria

Se ha dado especial importancia al proceso inflamatorio de la pared vascular en la patogénesis de la hipertensión y de otras enfermedades cardiovasculares. La reacción inflamatoria implica complejos procesos de interacción entre células

inflamatorias como los neutrófilos, linfocitos o macrófagos y las células vasculares van a responder incrementando la expresión de moléculas de adhesión, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Viridis A, et al. 2003). Existen evidencias epidemiológicas que relacionan la hipertensión y el daño renal y vascular producido en la hipertensión con procesos inflamatorios. En pacientes con hipertensión arterial se han descrito elevados niveles circulantes de moléculas inflamatorias como proteína C reactiva (PCR), citocinas (TNF- α , IL-6), quimiocinas (MCP-1) y moléculas de adhesión celular (P-selectina, ICAM-1), además de observar en modelos animales de hipertensión infiltración de monocitos/macrófagos en la pared vascular y en determinados órganos como el riñón, corazón y cerebro (Pauletto P, et al,2006; Savoia C, et al. 2006). Los mecanismos que provocan esta respuesta inflamatoria no están claros, pero pueden incluir mecanismos de estrés de la pared vascular dependientes de presión y efectos pro inflamatorios de factores humorales como la AngII. La AngII puede actuar como una citocina pro inflamatoria (Cheng ZJ, et al. 2005; Ruiz-Ortega MM. Et al, 2006). Así, AngII causa disfunción endotelial, aumenta la permeabilidad celular, y puede activar células inmunes circulantes. Además, AngII participa en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión; así, moléculas como ICAM-1, VCAM-1, P-E-L-selectinas e integrinas, ven incrementada su expresión en distintos tipos celulares tratados con AngII y en modelos animales infundidos con AngII. Además, antagonistas de los receptores de AngII e inhibidores de la ECA disminuyen la expresión de estas moléculas en modelos animales de hipertensión, como ratas SHR-SP o ratas transgénicas para los genes de la renina y del angiotensinógeno, y en pacientes con hipertensión esencial (Ruiz-Ortega M, et al. 2006). Por otra parte, en aorta de ratas SHR y tejidos de animales hipertensos la expresión de citocinas pro inflamatorias como la IL-1 β , IL6, TNF- α está aumentada. La AngII también regula la producción de citocinas y quimiocinas que van a jugar un papel fundamental en el reclutamiento de células inmunes en el endotelio vascular. La infusión de AngII va a incrementar los niveles TNF- α y de IL-6 a nivel renal y en células vasculares. Además, AngII

aumenta los niveles de MCP-1, de osteopontina, que es un factor quimiotáctico de macrófagos y de RANTES (quimiocina regulada sobre activación, célula T normal expresada y secretada). Inhibidores de SRA disminuyen la expresión de quimiocinas y citocinas en modelos experimentales de enfermedad renal y vascular (Suzuki et al, 2003; Ruiz-Ortega M, et al.2006). Entre los mecanismos moleculares que están implicados en la regulación de esta respuesta inflamatoria, destacan mecanismos redox sensibles, la activación de proteínas cinasas como Rho, y la activación de NFκB. La AngII, va a estar implicada en el desarrollo de todos estos mecanismos. Los procesos redox sensibles incluyen expresión de moléculas pro inflamatorias, activación de factores de transcripción redox sensibles (NFκB, AP-1), transactivación de EGF-receptor, activación de cinasas redox sensibles y, además, participan en el remodelado vascular. En células musculares lisas, AngII activa NAD (P) H oxidasa, aumentando las ROS como O₂·- y H₂O₂ que van a regular, la expresión de genes pro inflamatorios (Touyz RM, et al 2004). AngII participa en la activación de la proteína quinasa Rho; la inhibición de esta proteína mejora el daño renal, disminuye la infiltración celular y la expresión de MCP-1 o TNF-α, indicando que esta proteína posee un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios (Ruiz-Ortega M, et al.2006). El NFκB es considerado el principal factor de transcripción mediador de la respuesta inflamatoria (Barnes PJ, et al. 1997). El daño renal y vascular inducido por la hipertensión, ha sido asociado a un aumento en la actividad de NFκB; los inhibidores del SRA mejoran ese daño vascular y disminuyen la actividad de NFκB. Además, se ha observado que la expresión de NFκB está aumentada en aorta de ratas SHR y tejidos de animales hipertensos, y disminuye cuando se bloquea el receptor AT1 (Tummala PE, et al 1999; Pueyo ME, et al. 2000; Serrano M, et al. 2001). La inhibición de NFκB en modelos de hipertensión como en las ratas que sobre expresan los genes del SRA humanos, mejora el daño de órganos y disminuye la presión arterial (Müller DN. Et al. 2000). La activación del NFκB por la AngII es dependiente tanto de AT1 como de AT2, y la respuesta inflamatoria se revierte solamente si ambos receptores están bloqueados (Esteban et.al., 2004).

La transcripción de las isoformas inducibles de la NOS y la COX, que dependen de la actividad de NFκB (Beswich et.al., 2001), y cuyos derivados participan en la regulación del tono vascular, también está incrementada con la hipertensión. Se ha descrito que esta incrementada expresión puede ser modulada por la acción del SRA (Manucha W et al. 2004). Por otra parte, algunos estudios, sugieren que la ET-1 podría ser un importante mediador en el proceso inflamatorio crónico de la pared vascular (Virdis A, et al. 2003).

1.6. Estrategias para el estudio de genes involucrados en enfermedades

Actualmente se encuentran disponibles una gran variedad de estrategias para identificar los factores genéticos involucrados en las enfermedades mendelianas y complejas. El análisis de ligamiento, y los estudios de asociación son dos métodos analíticos complementarios, utilizados para detectar tanto las regiones genéticas específicas como genes que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Debido a que la HAS es una enfermedad compleja en la cual intervienen múltiples factores genéticos que interactúan con los factores de riesgo que se encuentran en el medio ambiente, los estudios de ligamiento poco pueden hacer en este tipo de análisis donde el efecto genotípico y fenotípico de cada gen es pequeño y además aditivo. Por otro lado, los estudios de asociación son los que ofrecen una excelente herramienta metodológica para identificar alelos de susceptibilidad con poca contribución genética a la enfermedad, pero cada uno de los genes candidatos presentan una susceptibilidad en la etiología de la HAS, y solo cuando la interacción de los genes es aditiva, alcanzan y rebasan el umbral de susceptibilidad y es cuando se presenta la enfermedad. Los estudios de asociación a diferencia de los de ligamiento generalmente no dan una asociación causal, pero si contribuyen en la búsqueda de genes con poco efecto genotípico de las enfermedades comunes, por lo tanto estos estudios dan un riesgo relativo del alelo que está siendo analizado con respecto a la enfermedad. Los estudios de asociación son los que han identificado varios de los genes que actualmente se

han reportado involucrados en dicha patología, aunque mucho de esto depende de la geografía y etnicidad de cada población (Wyszynski, 1998).

1.6.1. Estudios de asociación alélica

A diferencia de los análisis de ligamiento, los cuales escanean todo el genoma o una región grande del genoma, los estudios de asociación se emplean para estudiar pequeñas regiones y/o segmentos del genoma. Este tipo de estudios han dado resultados excelentes para identificar genes ubicados en las regiones genómicas que han dado ligamiento en diversas enfermedades, con estos estudios se pueden identificar regiones cromosómicas pequeñas, además de genes de pequeño efecto en la enfermedad. Este tipo de diseño se puede realizar en: a) casos y controles y b) basados en familias; padres e hijo afectado o pares de hermanos afectados. En el primer caso se analizan enfermos (casos) e individuos normotensos (controles) no relacionados y se compara la frecuencia de marcadores polimórficos en ambos individuos, si la frecuencia del alelo específico del marcador se encuentra en mayor frecuencia en los casos que en los controles, con un poder estadístico mayor a 0.8 entonces decimos que el marcador está asociado a la enfermedad. El hecho de que haya una asociación entre un marcador y una enfermedad generalmente se toma como evidencia preliminar de ligamiento entre el marcador y el locus que causa la enfermedad (Baca, et al. 2004).

1.6.1. Causas de asociación

Se conoce que la asociación se puede deber por: a) Efecto directo del marcador alélico en estudio; en algunas ocasiones el polimorfismo estudiado en ciertas enfermedades es la causa directa de asociación por estar involucrado en la susceptibilidad de la enfermedad. b) Desequilibrio de ligamiento; la asociación puede ser debida no al polimorfismo que se está estudiando sino a otro

polimorfismo que este cercano a él y sea el verdadero causante de la susceptibilidad. c) Estratificación poblacional; muchas poblaciones presentan subgrupos que no se mezclan, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de los subgrupos (Baca, et al. 2004).

1.6.3. El genoma humano y los estudios de asociación

Gracias a la secuenciación completa del genoma humano se pudo conocer la distribución exacta de los genes en los cromosomas (Venter, et al. 2001), también se conocieron cuales eran las variantes más comunes en el genoma. Las dos variantes más comunes son los repetidos cortos en tándem (STRs) o microsatélites y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs. De hecho dos individuos cualquiera comparten el 99.9% de su genoma, el 0.01% restante representa la variabilidad de cada individuo. Los SNPs. son una herramienta cada vez más importante para el estudio de la estructura e historia de nuestro genoma (Brookes, 1999). El uso más común de SNPs. es para los estudios de asociación, que buscan una asociación estadística entre los alelos y los fenotipos (generalmente enfermedades), para establecer claramente a genes candidatos causantes de la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Riva, et al. 2004).

Los SNPs. se han encontrado distribuidos a través de todo el genoma humano, esto ha resultado en grandes avances en la determinación de marcadores polimórficos en las enfermedades comunes, de hecho actualmente los SNPs. son los mejores marcadores para realizar análisis de asociación. Estos polimorfismos son variaciones normales en el ADN que se transmiten de forma mendeliana y se encuentran en la población con una frecuencia mayor al 1 %, su distribución en el genoma es amplia y gracias a ellos se han realizado mapas físicos de alta resolución (Sebastiani, et al. 2005; Riva, et al. 2002). Se estima que los SNPs se encuentran aproximadamente cada 500 bases o menos lo cual lleva a que se

proponga un número mayor a 7,7 millones reportados (Riva, et al. 2004), de hecho se calcula que existen entre 10 y 20 millones de SNPs distribuidos a través de todo el genoma (Newton, 2005).

1.6.4. Importancia de los SNPs en los estudios genéticos

La importancia de los estudios genéticos con SNPs se debe a lo siguiente: a) muchos los SNPs son heredados de forma mendeliana de una generación a otra, de esta manera que se puede estudiar la evolución de las especies y además de las poblaciones (Riva, et al. 2002), b) los SNPs pueden ser los responsables de causar enfermedades ya que pueden alterar de la secuencia de ADN en una región codificante o reguladora, los SNPs no sinónimos han sido implicados en diversas enfermedades porque pueden alterar la función de la proteína, su estabilidad, los sitios de corte y empalme (splicing), etc. (Riva, et al. 2002; Stitzel, et al. 2004), c) finalmente los SNPs se pueden emplear para los estudios de ligamiento y asociación (Mayeux, 2005). Estos marcadores presentan algunas características importantes como por ejemplo la mayoría de ellos son bialélicos, son muy abundantes en el genoma, tienen baja tasa de mutación, son fáciles de genotipar con medios automatizados y no se requiere de una gran cantidad de ADN para su análisis (Zhang, et al. 2004). Los SNP's se pueden localizar en cualquier zona del genoma, su importancia fenotípica dependerá de la localización.

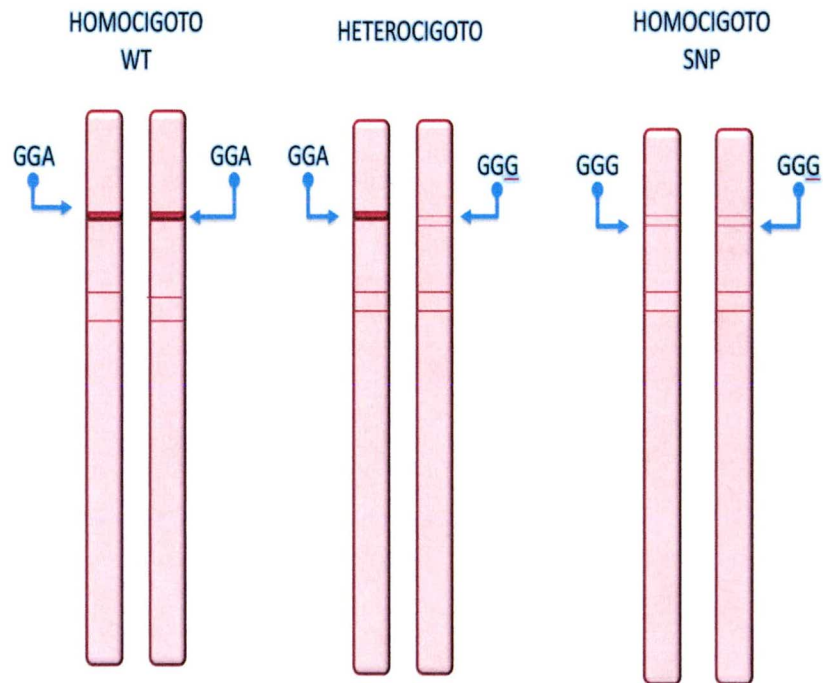


Figura 9: Ejemplo de polimorfismo (SNP). Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (Single Nucleotide Polymorphism, pronunciado esnip) es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de una secuencia del genoma.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. *Gen del angiotensinógeno (AGT)*

El angiotensinógeno es una glicoproteína que contiene en su extremo amino el decapeptido angiotensina I (AngI) el cual es liberado por la acción proteolítica de la enzima renina (Kageyama et al; 1984). A partir de la AngI se produce enzimáticamente angiotensina II (AngII), el péptido biológicamente activo del sistema renina angiotensina (SRA).

El gen del angiotensinógeno de humano, rata y ratón tiene homología. En humano este gen se ubica en el cromosoma 1 en la región q42-q43, mide 12 kb, consta de 5 exones y 4 intrones, y produce una proteína de aproximadamente 50kD (Ohkubo et al; 1983).

La estructura del angiotensinógeno tiene similitud con varios inhibidores de proteasas de serina producidas por el hígado, como la alfa-1- antitripsina (AAT) y la Antitrombina III (AT3) (Ohkubo et al; 1983). Esta similitud ha conducido a la búsqueda de otros papeles fisiológicos del angiotensinogeno, además de su papel como sustrato de renina. La biosíntesis hepática del angiotensinógeno está regulada por diferentes factores hormonales incluyendo glucocorticoides, estrógenos, hormona tiroidea, insulina y AngII. Actualmente la clonación del gen del angiotensinógeno ha ofrecido la oportunidad de estudiar esta regulación a nivel transcripcional. En base a los resultados obtenidos con este tipo de estudios parece ser que la regulación de la síntesis de esta proteína se da principalmente a nivel transcripcional, es decir, por la regulación de la expresión.

En su región 5'UTR se han identificado múltiples elementos reguladores tales como los de respuesta de fase aguda, y respuesta a glucocorticoides, estrógenos y triiodotironina, además de los promotores e intensificadores comunes. (Gaillard et al; 1989).

En estudios de expresión del angiotensinógeno y las enzimas del sistema renina-angiotensina donde se detectaron la Catapsina D y G (Karlsson et al; 1998) así como los elementos necesarios para su conversión a la angiotensina II, descubrieron que esta se lleva a cabo por el tejido adiposo humano.

Usando modelos de hipertrofia cardíaca se explicó que el estrés causa la liberación mecánica de angiotensina II a partir de miocitos cardíacos y que la angiotensina II actúa como un mediador inicial de la respuesta hipertrófica, con esto se define una parte más de la fisiopatología en cuanto al papel local del sistema renina-angiotensina (Sadoshima et al; 1993).

Otras observaciones demostraron que la aldosterona aumenta con los niveles de angiotensina II que es inducida por PAI-1 (Inhibidor de plasminógeno-1) in vitro (Sawathiparnich et al.; 2003). Con esto se puso a prueba la hipótesis de que la aldosterona y el receptor tipo 1 de angiotensina II (*AGTR1*) pueden reducir el antagonismo entre PAI-1 en los seres humanos.

Otros estudios demostraron que el aumento de Ang II a través de la endocitosis de albúmina era mediado por el receptor *Agtr2* y activado por proteína cinasa B en la membrana plasmática y que depende de la actividad basal de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Caruso-Neves et al.; 2005). También se encontró que FAK (proteína de adherencia focal) y la fosforilación de serina paxillin inducen la migración de células endoteliales umbilicales humanas (HUVECs) a través de vías de señalización dependientes de PI3K, de la familia de cinasas SRC y la fosforilación de EGFR. (Montiel et al.; 2005).

En cuanto a los estudios genéticos realizados en polimorfismos, las posiciones más reportadas son las del sitio T174M y M235T. Los primeros estudios de ligamiento genético en hipertensión esencial proporcionaron evidencia de la participación del *AGT* en la patogénesis de este padecimiento. Se puso de

manifiesto que el aumento de las concentraciones de *Agt* en plasma de hipertensos estaban asociadas con las variantes M235T y T174M, estando estas en desequilibrio de ligamiento e identificándose como factores de riesgo (Jeunemaitre et al.; 1992).

Estudios en una población japonesa étnicamente más homogénea, demostraron que la variante T235 se asocia con hipertensión esencial (Hata et al., 1994). Debido a la participación del angiotensinógeno en la homeostasis de la sal, quizá el sitio T235 puede ser un marcador de las formas sensibles a sal de la hipertensión esencial. Los estudios epidemiológicos realizados en este tipo de poblaciones muestran un gradiente de aumento de la prevalencia de la hipertensión y la mortalidad por accidentes cerebro vasculares al sur y norte de Japón (Takahashi et al., 1957), que se correlaciona con un aumento en el promedio diario de ingesta de sal (Sasaki, 1964).

Con estos resultados la información de que los niveles de *Agt* en plasma se correlacionan con la presión arterial ha sido de particular interés y por ello se les ha dado un seguimiento en el estudio en familias y se sugiere que el gen del *agt* puede tener un papel importante en la hipertensión esencial. (Caulfield et al.; 1994), Se ha investigado el ligamiento del gen *AGT* y la hipertensión esencial en población caucásica (Weeks, 1988) y en poblaciones aisladas de América del Norte (Hostetler, 1974, Hegele et al. 1994) en donde en el codón 174 se encontró una asociación con la variación en la presión arterial sistólica (3.1% de la variación total). (Hegele et al.; 1996). Otro estudio realizado en una población Afrocaribeña proporcionó información sobre esta asociación con el genotipo de *apoB* en el codón 4154 pero no se encontró asociación con las variantes del sitio M235T (Caulfield et al.; 1995).

Se investigó si los genes T174M y M235T están igualmente implicados en la patogénesis de la hipertensión esencial en población china, este análisis no reveló

ninguna evidencia de ligamiento del gen *AGT* y la hipertensión, sugiriéndose que el origen étnico puede hacer una diferencia significativa en la función de diversos genes en ciertos rasgos complejos (Niu et al.; 1998).

Se ha analizado la influencia del polimorfismo M235T sobre el aumento de los niveles de *Agt*, Ang I, Ang II en plasma inducido por fármacos (Azizi et al.; 2000). Un estudio en familias de población caucásica asocio al alelo T235 del gen *AGT* con un aumento de la secreción de *Agt* en plasma (Brand et al.; 2002). En una población caucásica de la región anglo-australiana se excluye al gen del *AGT* en la etiología de la hipertensión (Wang et al.; 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, los estudios más fuertes que implican a un gen como la causa de la hipertensión esencial son los relacionados con el *agf*. Se han realizado algunos estudios encaminados a determinar si los elementos del sistema renina-angiotensina humana pueden reemplazar funcionalmente elementos del sistema renina-angiotensina de ratón. Se estableció que la renina humana y los genes del angiotensinógeno pueden reemplazar funcionalmente el gen en el ratón. Esto es importante por que se podrá examinar la regulación de los elementos del sistema renina-angiotensina en humanos y probar la importancia de las variantes genéticas de este sistema, por una combinación de genes transgénicos. (Jeunemaitre et al., 1992, Davisson et al.; 1997).

En un análisis de segregación con modelos de genes recesivos se presentan valores bajos de *Agt*, alrededor del 13% (Guo et al.; 1999).

Entre los estudios de SNP's relacionados con la región promotora de *agf* se ha estudiado el sitio C -532T en familias caucásicas en donde se correlaciona a los niveles de presión con niveles de *Agt* en plasma, en donde los niveles de *Agt* en padres representan un 4.3% y un 5.5% en los hijos. En este mismo estudio se mostro que los sitios -6G-A, M235T y 2054C-A se encontraban en desequilibrio de ligamiento (Brand et al.; 2002).

Se identificó una mutación en la posición -30 del aminoácido del péptido señal del *agt*, en individuos heterocigotos en donde la arginina fue sustituida por una prolina R-30P, se tuvo una baja en los niveles plasmáticos de *Agt*. La importancia que se ha observado en esta posición en humanos es en cuanto al ARNm del *agt* que lleva la traducción en dos fases el codón de inicio (AUG) que comienza río arriba a 39 y 66 nucleótidos del sitio del cap en donde R-30P se encuentra en un grupo básico de residuos junto al codón de inicio AUG que pueden afectar intracelularmente a la clasificación de la proteína naciente. (Nakajima et al.;1999) El polimorfismo -6 G/A que se encuentra en la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción (-A-6G;) influye en cuanto a la función del promotor del *agt*. Se sugiere un posible papel del factor YB-1(Y-box factor binding protein 1) en la modulación de la expresión de *agt*, y probablemente esta función se produzca en el contexto de la participación compleja de la interacción con otros factores nucleares (Nakajima et al. 2002).

En un estudio de casos-controles se encontró que los sujetos con genotipo AA o AG en la posición -793 A-G, fueron significativamente más propensos a tener hipertensión RM = 1,88. (Markovic et al.; 2005).

Se ha examinado la hipótesis de que múltiples variantes genéticas en el sistema renina-angiotensina pudieran actuar juntas en la regulación de la presión arterial, a través de fenotipos intermedios, en donde las variantes genéticas en las regiones reguladoras del gen *AGT* muestran una fuerte asociación con la reactivación de la presión arterial (Gu et al. 2005).

En cuanto a la relación de estos sitios con otras patologías se ha analizado en la fibrilación auricular estructural no familiar asociación con los sitios M235T,-6G-A y-217G-A (Tsai et al. 2004).

En un estudio de pacientes con enfermedad coronaria en Nueva Zelanda se llegó a la conclusión de que el alelo T235 de *AGT* es un factor independiente que produce aproximadamente 2 veces mayor riesgo de enfermedad coronaria (Katsuya et al.; 1995).

Se ha asociado al genotipo AA del polimorfismo -6G-A con la enfermedad de Crohn (Hume et al.; 2006). En los individuos con diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID) que desarrollan retinopatía proliferativa (MVCD3) se encontró evidencia de una interacción entre el polimorfismo I/D de la ECA y el sitio M235T del gen *AGT*, observándose que el sitio M235T no contribuye por sí solo (Marre et al., 1997).

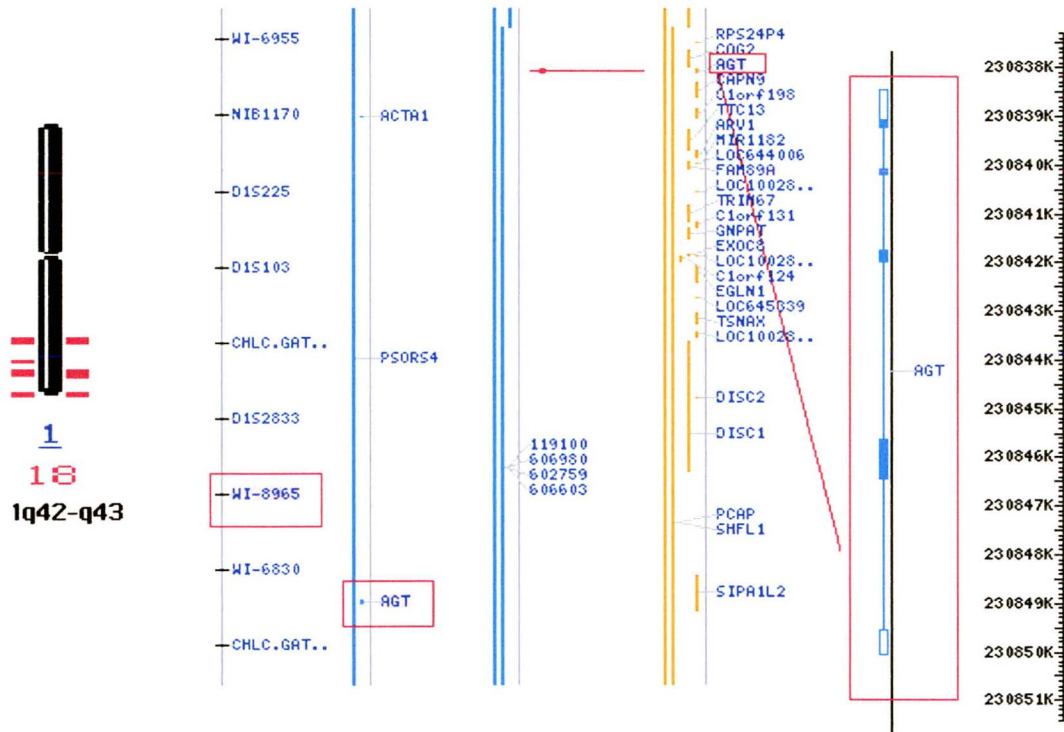


Figura 10: Localización del gen *AGT* en el cromosoma 1 (NCBI Map Viewer, disponible en URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=1&MAPS=genec,ugHs,genes-r&cmd=focus&fill=40&query=uid\(16316628\)&QSTR=AGT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=1&MAPS=genec,ugHs,genes-r&cmd=focus&fill=40&query=uid(16316628)&QSTR=AGT)).

2.2. Gen del receptor tipo 1 de angiotensina II (*AGTR1*)

La angiotensina II es un importante efector que controla la presión arterial y el volumen en el sistema cardiovascular. Su importancia se refleja en la eficacia de la enzima convertora de angiotensina, inhibida en el tratamiento de la hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva. La angiotensina II interactúa con 2 distintos subtipos de receptores, los de tipo 1 y 2. (*Agtr1* y *Agtr2*). Los receptores tipo 1 parecen mediar los principales efectos cardiovasculares de la angiotensina II (Murphy et al., 1991).

Los primeros estudios para discernir la estructura de la secuencia genómica del *agtr1* demostraron que la región codificante figura en un solo exón (Furuta et al.; 1992). Posteriormente al comparar el ADN genómico y las secuencias de ADNc, (Guo et al; 1994) se demostró que el gen *AGTR1* consiste en 5 exones cuatro de estos exones codifican en la región 5'-UTR, mide aproximadamente 55 kb y el tamaño de los exones oscila entre 59 a 2.014 pb.

El gen *AGTR1* se localiza en el cromosoma 3q (Curnow et al.; 1992; Szpirer et al.; 1993,) en las regiones q21-25 (Gemmill y Drabkin, 1991). Se trata de un receptor de membrana celular con una estructura con siete dominios transmembrana (R7DTM) que actúa acoplado a proteína Gq. Los receptores AT1 y AT2 son polipéptidos que contienen aproximadamente 360 aminoácidos que recubren la membrana celular 7 veces (Mukoyama M; 1993) y sólo existe homología de su secuencia en el 30 %. El gen para el receptor AT1 está localizado en el cromosoma 3 y el gen del receptor AT2 es el cromosoma X. (Szpirer C, 1993).(Fig. 12).

El tipo AT1, es un receptor de membrana acoplado a proteínas G, y cuyos segundos mensajeros varían generalmente tras unirse con la A II, el receptor AT1 se acopla a proteínas del subtipo G alfa, se desprende la subunidad alfa, que activa la fosfolipasa C, la cual induce incrementos de inositol trifosfato (I3P) y de diacilglicerol (DAG) que causan un aumento del calcio intracelular, este último mediante la activación de la proteincinasa C (PKC). En otras células, como la renal o la hepática, el receptor AT1 se acopla a proteínas del subtipo Gi alfa, que actúa inhibiendo la adenilatociclasa y, por lo tanto, reduciendo el AMPc (Lassegue B,et.al., 1991).

Mediante técnicas de biología molecular, se ha logrado subclasificar el receptor así como comprender su función; en cuanto al receptor AT1 se ha observado la existencia de 2 subtipos del mismo: AT1A y AT1B, que se diferencian en la

secuencia de aminoácidos de la zona C-terminal de su estructura molecular. El receptor AT1A está altamente expresado en hígado, riñón, aorta, útero, ovario, bazo, pulmón y cerebro. El receptor AT1B se encuentra expresado en la pituitaria, glándula adrenal, riñón, útero e hígado y está ausente en el corazón, cerebro y bazo (Bergsma et al. 1992 y Mauzy et al.; 1992).

El receptor del tipo AT2 es también un receptor de membrana, pero se desconoce si está acoplado a proteínas y cuáles son sus segundos mensajeros, este se expresa fundamentalmente en tejido embrionario, su función es desconocida y se ha implicado en el crecimiento y desarrollo dada su amplia distribución en tejidos fetales y su expresión aumentada en heridas cutáneas o en la neoíntima, después de una lesión vascular. Sin embargo, existen evidencias de que el receptor AT2 media un efecto antiproliferativo y, por lo tanto, es posible que a efectos de proliferación y crecimiento celular los 2 subtipos de receptores actúen contrabalanceando sus efectos (AT1 proliferativo, AT2 antiproliferativo) más que actuar ambos favoreciendo el crecimiento. Se encontró un segundo gen del receptor de la angiotensina en el genoma humano. Los 2 subtipos del receptor tipo 1 de angiotensina II, 1A y 1B (*AGTR1B*) (Mauzy et al.; 1992), se han identificado en humanos, rata y ratón. Estos receptores son variantes de splicing (Scott, 2001). El receptor 1A de la angiotensina II parece predominar en muchos tejidos, pero no en suprarrenal o hipófisis, y la expresión de los 2 tipos de receptores pueden ser diferencialmente regulados en el corazón y las glándulas suprarrenales. Esta diferencia de distribución de tejidos y de la regulación de los subtipos de receptores de la angiotensina II puede servir para modular los efectos biológicos de la angiotensina II. Se afirmó que el tejido humano expresa *AGTR1* sintetizando 4 distintas alternativas (isoformas) por splicing en la transcripción de su ARNm, mostrando que la abundancia relativa de esta transcripción de ARNm varía ampliamente en los tejidos humanos, lo que sugiere que cada variante de splicing es funcionalmente distinta. (Martin et al., 2001).

Para estudiar la actividad del promotor de *agtr1* se realizaron ensayos de luciferasa que fueron inyectados en los corazones de ratas con hipertrofia cardíaca, en donde la actividad de este reportero aumentó en un 160% en comparación con el miocardio normal, este efecto fue bloqueado por la introducción de mutaciones en cualquier región de AP-1 o en la región GATA que son sitios consenso de unión con el promotor de *AGTR1*, pero estas mutaciones no afectaron la actividad basal del reportero. La sobrecarga de presión incremento el nivel de unión del ADN al sitio AP-1 con un incremento parecido entre c-Fos y Jun- B. Estos resultados demostraron que la región reguladora de *AGTR1* está activa en el músculo cardíaco y sugirió que parte de la respuesta de la sobrecarga de presión está mediada por la interacción de los sitios consenso AP-1 y GATA. (Herir et al., 1997).

Numerosos estudios han demostrado la asociación de polimorfismos con el gen *AGTR1* y la hipertensión arterial (Bonnardeaux et al., 1994), también apoyan la idea de que el receptor *Agt1* es el objetivo más importante para el control de la hipertensión dependiente de angiotensina II. A pesar de la excelente disponibilidad de medicamentos para el control de la hipertensión, se ha explorado la posibilidad del uso de terapia génica. Demostrando que por medio de un mediador retroviral antisentido se lleva a cabo la atenuación selectiva de las acciones celulares de la angiotensina II, esto en neuronas de ratones espontáneamente hipertensos (SH). Una sola inyección normaliza la presión arterial en la rata SH. Se propuso el uso de este método en pacientes. (Iyer et al.; 1996). Posteriormente el uso de terapia génica mostró la normalización de la presión arterial con el gen antisentido para el receptor tipo 1 de angiotensina II (*AGTR1-AS*), esto impedía los cambios fisiopatológicos en el desarrollo de insuficiencia renal vascular y cardíaca. La inyección Intracardiaca de *AGTR1-AS* en ratas neonatas impedía el desarrollo de hipertensión en ratas SH, por lo menos 120 días. (Martens et al.; 1998).

En un estudio de biopsias de miocardio; de corazones normales y con miocardiopatía dilatada o isquémica se mostró que los niveles de ARNm del gen *AGTR1A* en corazón normal era de 2,5 veces más baja, este hallazgo puede influir en el uso de antagonistas específicos de *AGTR1* en pacientes con insuficiencia cardíaca (Haywood et al.; 1997).

Se ha visto que los pacientes que desarrollan preeclampsia generan auto anticuerpos contra el segundo bucle extracelular del receptor AT1. El efecto parece estar mediado por la proteína cinasa C ya que el inhibidor de PKC la Calphostin C impide el efecto estimulador. Estos anticuerpos pueden participar en la inducción de angiotensina II por lesiones vasculares en pacientes con preeclampsia. (Wallukat et al.; 1999)

Se ha demostrado que las variantes de splicing del ARNm del gen *AGTR1B* generan una isoforma larga y *AGTR1A* genera una isoforma corta. Las diferencias funcionales entre estas isoformas de angiotensina II permiten que se dé la respuesta ajustada por la regulación de la abundancia relativa de la isoforma larga y corta de *AGTR1* expresadas en un determinado tejido humano. (Martin et al., 2001)

El vasopresor angiotensina II regula la contractilidad vascular y la presión sanguínea por la unión a el receptor tipo 1 de angiotensina II. La bradicidina, un vasodepresor, un antagonista funcional de angiotensina II. Estos dos sistemas de hormonas están interconectados por la enzima convertora de angiotensina. (Abdalla et al.; 2000). El receptor tipo 1 de la angiotensina II y los receptores B2 de la bradicinina se comunican directamente entre sí formando heterodímeros estables, que causan el aumento de la activación de las proteínas G-alfa-q y G-alfa-i, las 2 principales proteínas de señalización activadas por el receptor tipo 1 de la angiotensina II. Además, la vía endocítica de ambos receptores cambia con la heterodimerización.

La consecuencia final del incremento de angiotensina II y su unión al receptor AT1 es un aumento intracelular de la concentración de calcio y una mayor contractilidad de las fibras citoesqueléticas. Todo ello a nivel cardiovascular aumenta la contractilidad y la frecuencia cardíaca (inotropía y cronotropía positivas) y aumenta el tono arterio-venoso. En la médula adrenal, se aumenta la síntesis de aldosterona. Además, la actividad del receptor induce la expresión de varios genes encargados de la síntesis proteica y de ADN, esta vía nuclear sería la responsable del estímulo de proliferación y diferenciación celular observado tras perfusiones de angiotensina II. Por último, la angiotensina II activa a la fosfolipasa A2, responsable de sintetizar el ácido araquidónico desde fosfatidilcolina, este ácido es el precursor de los eicosanoides.

En resumen, las acciones de la angiotensina II a través del receptor AT1 incluyen: La reabsorción distal de Na^+ por aumento de aldosterona en la médula adrenal, reabsorción proximal de Na^+ , activación del centro de la sed y síntesis de vasopresina a nivel del SNC, aumento de la liberación de noradrenalina en las terminaciones nerviosas del Sistema Nervioso Vegetativo Simpático, vasoconstricción arterial a nivel vascular, Inotropía y cronotropía positivas a nivel cardíaco, promueve la proliferación y diferenciación celular y genera ácido araquidónico, precursor de los eicosanoides.

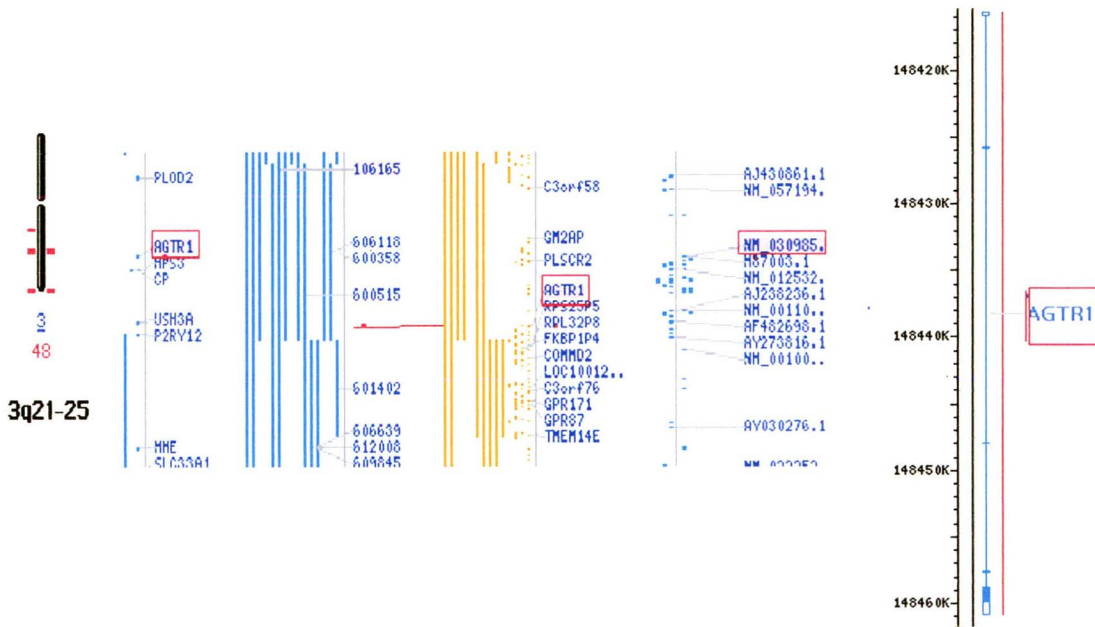


Figura 11: Localización del gen *AGTR1* en el cromosoma 3 (NCBI Map Viewer, disponible en URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=606&chr=3&MAPS=genec,ugHs,genes-r&cmd=focus&fill=40&query=uid\(16316629\)&QSTR=AGTR1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=606&chr=3&MAPS=genec,ugHs,genes-r&cmd=focus&fill=40&query=uid(16316629)&QSTR=AGTR1)).

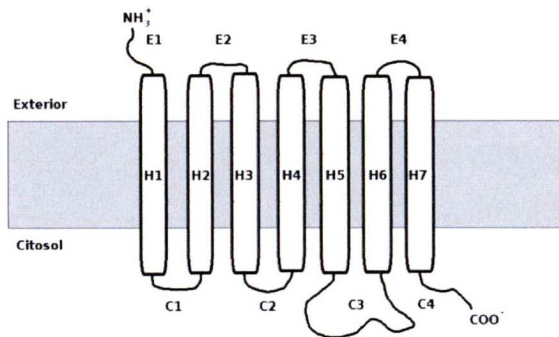


Figura 12: Receptor tipo 1 de angiotensina II, es un receptor de membrana celular con una estructura con siete dominios transmembrana (R7DTM).

2.3. Estudios en otras poblaciones

Estudios previos han sugerido que el componente genético juega un papel importante en el desarrollo de la hipertensión arterial sistémica, llevando a resaltar la participación que pueden desempeñar los polimorfismos de los genes que codifican para las proteínas involucradas en el sistema renina angiotensina.

Tabla 2: Relación entre polimorfismos y enfermedades que en diferentes poblaciones

Polimorfismo	Alelo asociado	Repercusión	Población	Referencia
C-532T	T	Aumento de niveles de ECA y AGT en plasma, Expresión del gen AGT (AP-2), HAS	Caucásica (Francesa)	Paillard F; Hypertension 1999;34:423-429 Brand E; European Journal of Human Genetics (2002) 10, 715 – 723
		Aumento en un 10% de AGT en plasma y de Presión de pulso (2.8 mmHG), HAS	Caucásica (Inglesa)	Baker, M; International Journal of Epidemiology 2007;36:1356–1362
		Aumento niveles de AGT en plasma. Modificación en la propiedad arterial, HAS	Caucasica (Italia/Alemania)	J Seidlerova; Journal of Human Hypertension (2009) 23, 55–64
	C	Expresión del gen AGT y regulación de la presión.HAS	Afroamericana	Vinukonda JS; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008 Dec;295(6):R1846-8
A-217G	G	Disminuye el riesgo de hipertensión esencial	Asiática (China)	Jiang X; J Hum Hypertens. 2009 Mar;23(3):176-81
		Disminución de los niveles de aldosterona, renina y niveles de disminución de presión ambulatoria.	Africanos	Woodiwiss AJ; J Hypertens. 2006 Jun;24(6):1057-64
	A	Incremento de AGT por adipocitos.	Afroamericana	Li-Y; Vascul Pharmacol. 2006 Jan;44(1):29-33
		Incremento en riesgo a hipertensión y la actividad transcripcional de AGT.	Asiática (Taiwán)	Wu SJ; Physiol Genomics. 2004 Apr 13;17(2):79-86

A-6G	G	Aumenta el riesgo de Ictus isquémico y arteriosclerótico Mayor riesgo HAS.	Asiática (Arabia) (China) (Taiwán)	Saidi S; Acta Neurol Scand. 2009 Jun; 119(6):356-63. Niu W; Hypertens Res. 2007 Nov;30(11):1129-37 Wu SJ Physiol Genomics. 2004 Apr 13;17(2):79-86
	No. asociación		Afroamericana	Velez DR; Am J Hypertens. 2006 Dec;19(12):1278-85
	A	Decremento de la presión arterial diastólica, resistencia a la reducción de micro albúmina. Metabolismo de glucosa	Caucásica (España)	Marín P; J Hum Hypertens. 2004 Jan;18(1):25-31 Chávez, FJ; Int J Obes Relat Metab Disord. 2002 Sep;26(9):1173-8
M235T	T	Enfermedad renal crónica Riesgo de enfermedad arteria coronaria.	Asiática (India) (China)	Anbazhagan K; Clin Chim Acta. 2009 Aug;406(1-2):108-12 Ko YL; Hum Genet. 1997 Aug;100(2):210-4
		Hipertrofia Ventricular izquierda	Latina (Brasil)	Alves GB; Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2009 Aug;16(4):487-92
	No asociación		Caucásicos	Pavlovic M; Eur J Pediatr. 1999 Jan; 158(1):18-23.
	T	Presión sanguínea y metabolismo de colesterol	Afro-caribeña	Robinson MT; Hum Hypertens. 2004 May;18(5):351-63
		Riesgo a daño en válvula mitral	Caucásicos (Italia)	Fatini C; Int J Cardiol. 2008 Jan 24;123(3):293-7
T174M	T	Eleva el riesgo a hipertensión	Asiática (china)	Yuan J. Biochem Genet. 2009 Jun;47(5-6):344-50
	M	Insuficiencia cardiaca	Americanos (Canadá)	Zakrzewski-Jakubiak M; Br J Clin Pharmacol. 2008 May;65(5):742-51
		Ruptura prematura de membranas en el embarazo	Latina (México)	Valdez-Velázquez LL; J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2007 Dec; 8(4):160-8.
		Arteriosclerosis	Caucásica (Rusia)	Spiridonova MG; Genetika. 2002 Mar;38(3):383-92
T	Riesgo HAS	Afroamericanos	Rutledge DR; Am J Hypertens. 1994 Jul;7(7 Pt 1):651-4	
C43732T	T	Decline de función renal, después del trasplante	Afroamericano	Israni AK, Transplantation. 2007 Nov 27; 84(10):1240-7.

3. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

Considerando la gran importancia que tienen los estudios de genes candidatos en las enfermedades cardiovasculares y partiendo del hecho de que los estudios previos en otras poblaciones no pueden aplicarse a la población mexicana, en nuestro grupo de investigación nos hemos dado a la tarea de realizar estudios de polimorfismos genéticos asociados con enfermedades cardiovasculares enfocándonos en las más relevantes y con mayor prevalencia como son: los síndromes isquémicos coronarios, las miocardiopatías, la hipertensión, las cardiopatías congénitas y las arritmias. En donde se seleccionaron a los genes candidatos de estudio en hipertensión, a aquellos relacionados con la circulación y crecimiento vascular, controlado principalmente por el SRA; estos genes son los de la enzima convertora de angiotensina (ECA), angiotensinógeno (AGT), receptor tipo I de angiotensina II, renina y aldosterona.

Hasta el momento en nuestro grupo de investigación se ha reportado un estudio donde se determinaron las frecuencias génicas de los alelos de la ECA en la población mexicana tanto mestiza como indígena. El resultado muestra por primera vez la distribución de las frecuencias de este polimorfismo en poblaciones mexicanas estableciendo importantes diferencias entre las poblaciones mexicanas y las caucásicas, asiáticas y africanas. Por otro lado, se detectó una asociación entre la presencia del alelo D y del genotipo DD y el desarrollo de enfermedad arterial coronaria, sin embargo, no se detectó correlación entre el polimorfismo y los niveles de lípidos medidos en los pacientes. (Vargas-Alarcon, et.al. ,2003)

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación multidisciplinario para la detección, control y tratamiento óptimo de la hipertensión arterial sistémica esencial en el contexto de la población mexicana, el estudio pretende llevarse a cabo de manera integral, abarcando desde aspectos de índole genético hasta circunstancias propias de la práctica clínica cotidiana. El nombre del proyecto es: "Optimización del Tratamiento de la Hipertensión Arterial Sistémica en México"

(OPHTHASIMEX). El cual cuenta con una cohorte en seguimiento de 15,000 pacientes portadores de hipertensión arterial que fueron detectados en una Encuesta Nacional probabilística, realizada por la Secretaría de Salud en el año 2000.

Esta investigación es un avance y forma parte de la primer fase del estudio molecular, en donde se realiza el análisis de polimorfismos de genes relacionados con HAS. Particularmente del gen del angiotensinógeno y del gen del receptor tipo 1 de angiotensina II.

4. IMPORTANCIA DE CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA

En la población mexicana no existen estudios sobre la relación de los polimorfismos de los genes de *AGT* y del *AGTR1* y HAS, además las observaciones realizadas en otras poblaciones no son aplicables a la nuestra debido a que la estructura genética del mestizo mexicano es particular. En los años 90's se sabía que el genoma del mexicano estaba formado por 56% de genes amerindios, 40% de genes caucásicos y 4% de genes negroides (Lisker, et al. 1990). En un estudio realizado en nuestro grupo sobre marcadores de ancestría se indicó que la estructura del genoma de los mexicanos se compone de 69% de genes amerindios, 26% de genes caucásicos y 5% de genes negroides (Juárez-Cedillo et.al., 2008) esto se ha ratificado en un estudio con otros marcadores de ancestría (Price AL, 2007). Debido a esta particularidad en la estructura del genoma del mexicano es necesario realizar estudios específicos en nuestra población. Se ha reportado, en otras poblaciones diferentes a la mexicana, que existe una asociación entre los polimorfismos de los genes *AGT* y *AGTR1* con el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, como HAS. Por tal motivo, es conveniente realizar un estudio similar en la población mexicana y establecer una posible asociación entre dichos polimorfismos y el desarrollo hacia el desarrollo del HAS.

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es uno de los principales factores de riesgo para sufrir un evento cardiovascular mayor, incluyendo muerte. Existen más de 900 millones de hipertensos en el mundo, de éstos el 80% corresponde a países en vías de desarrollo. En México según el Censo de población y vivienda 2000, se registraron 49,7 millones de mexicanos entre los 20 y 69 años, de los cuales 15.16 millones (30.05%) se consideraron portadores de HAS. Además, se ha estimado que en países en vías de desarrollo cada año entre el 1.5% y 5% de la población hipertensa muere por causas directamente relacionadas a HAS. Tomando a la tasa más baja de mortalidad por HAS (1.5%), significó que en el año 2000 ocurrieron 227,400 muertes potencialmente atribuibles a HAS y por lo tanto virtualmente prevenibles. En otras palabras, una muerte cada 2 minutos. Si bien a este número de muertes potenciales hay que restar el 14.6% de pacientes hipertensos controlados, la cifra se reduciría a 194,199 muertes, es decir una muerte cada 3 minutos. Este padecimiento es de origen multifactorial, es decir en su desencadenamiento participan tanto factores genéticos como ambientales. Bajo esta perspectiva el estudio de los genes que codifican para proteínas relevantes en la patogénesis de la HAS será muy importante para definir marcadores de susceptibilidad o resistencia a este padecimiento, y que pueda ser un elemento crucial para el diseño de políticas de salud encaminadas a la atención de la HAS, esto con el fin de plantear mejores y más dirigidos tratamientos.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Establecer el papel genético de los polimorfismos del gen *AGT* y del *AGTR1* en la susceptibilidad genética al desarrollo de la HAS en la población mexicana.

2. Objetivos particulares

1. Generar un banco de muestras de ADN de 115 individuos con diagnóstico de hipertensión arterial y de 291 individuos normotensos.
2. Determinar la frecuencia de los alelos y genotipos de los polimorfismos del gen del angiotensinógeno (*AGT*) y del gen del receptor tipo I de angiotensina II (*AGTR1*); en el grupo de hipertensos y de normotensos.
3. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los grupos de estudio con el fin de definir si alguna de las variantes de los genes *AGT* y *AGTR1* pudieran conferir susceptibilidad para el desarrollo de HAS.
4. Obtener y analizar los haplotipos de riesgo para el gen *AGT* y *AGTR1*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño de estudio

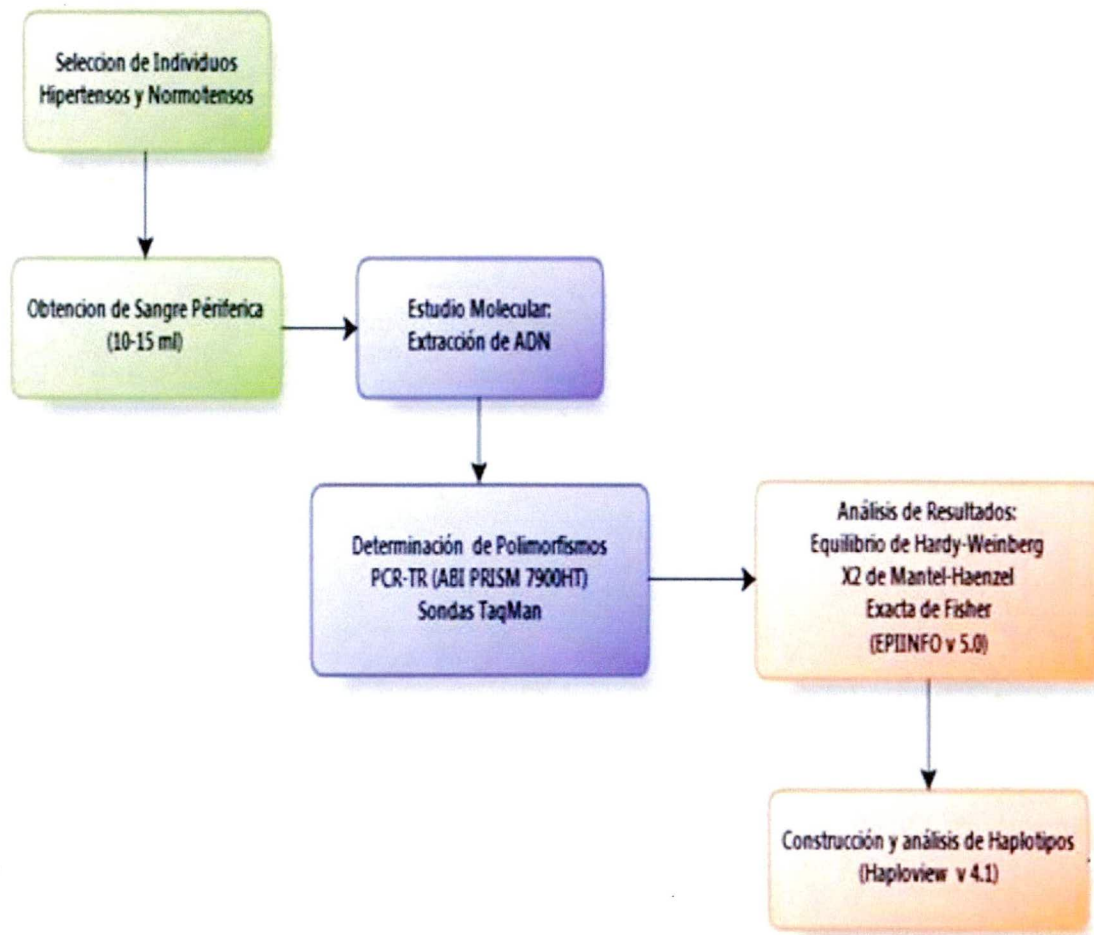
Tipo de estudio:

Estudio de casos (prospectivo) y controles

Estudio epidemiológico, observacional, transversal, comparativo y analítico.

2. Estrategia general

En el presente estudio se incluyeron individuos con diagnóstico de HAS e individuos con presión arterial normal (normotensos). A cada individuo se le tomó una muestra de sangre a partir de la cual se extrajo el ADN que se utilizó para el estudio molecular. Se analizaron los resultados genéticos y se compararon con la base clínica-demográfica, de los grupos de estudio. En la Fig.13 se observa el diagrama de la estrategia general empleada en el estudio.



1er. FASE

2da. FASE

3er. FASE

Figura 13. Estrategia Experimental en el presente estudio. Se analizaron los polimorfismos del gen *AGTR1* y los del gen *AGT* con ensayos Taqman por PCR en tiempo real. Las frecuencias alélicas y genotípicas se obtuvieron por conteo directo, evaluando el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de chi-cuadrada. El riesgo relativo (RR) se evaluó como razón de momios (RM) usando el método de Woolf. La construcción y análisis de haplotipos se realizó usando el programa Haploview versión 4.1.

3. Sujetos de estudio:

De acuerdo al cálculo de tamaño de muestra (Díaz y Fernández, 2002) el grupo de hipertensos incluyó 115 individuos mestizos mexicanos, no relacionados entre sí, vistos en la clínica de hipertensión del Instituto Nacional de Cardiología con diagnóstico de hipertensión arterial.

Como grupo de comparación se incluyeron a 291 individuos con presión arterial normal (normotensos). Como requisito adicional para ambos grupos, se consideró que cada individuo estudiado, y dos generaciones previas a él, hubiesen nacido en México. Así mismo, se les invitó a participar en el presente estudio y se obtuvo consentimiento informado voluntario. El estudio es de riesgo mínimo, ya que solo incluyó la venopunción antecubital para la obtención de 10 a 15 ml. de sangre periférica. Cabe mencionar que el presente proyecto cumple con los requisitos del Comité Institucional de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Cardiología, por quien fue aprobado.

3.1. Criterios de inclusión:

1. Que tanto hipertensos e individuos normotensos, así como sus dos últimas generaciones hayan nacido en México.
2. Edad: 20 a 80 años.
3. Ambos sexos.
4. En el caso de los individuos hipertensos, que al momento de ingreso presenten:
 - a) Presión sistólica ≥ 140 mmHg o presión diastólica ≥ 90 mmHg.
 - b) Diagnóstico previo de hipertensión y que estén tomando medicamentos antihipertensivos.
5. Para los individuos control, presión arterial normal.
6. Consentimiento informado y firmado.

3.2. Criterios de exclusión

1. Enfermedad no relacionada con hipertensión que represente per se un riesgo de morbimortalidad a mediano o corto plazo
2. Cualquier historia de accidente cerebro vascular, insuficiencia hepática grave, renal o Insuficiencia cardiaca grave ó terminal
3. Embarazo o lactancia.
4. Obesidad mórbida extrema
5. Intolerancia a medicamentos antihipertensivos de uso común.
6. Enfermedad autoinmune
7. Cáncer
8. Enfermedad pulmonar de importante repercusión clínica.
9. Cualquier condición médica por la cual el individuo este impedido para completar el estudio.
- 10.No ser mexicano.

4. Estudio Genético

4.1. Extracción de ADN

Se tomaron de 10 a 15 ml. de sangre periférica de cada individuo, recolectada en tubos "vacutainer" con EDTA al 5% como anticoagulante. Se centrifugo la muestra de sangre a 3000 rpm durante 5 minutos y se elimino el plasma, a partir de esta muestra se extrajo el ADN genómico mediante la técnica de extracción salina con Tritón X-100 (modificado de Lahiri y Numberger, 1991).

La primer fase de la extracción consistió en realizar la lisis de eritrocitos, primero se transfirió el paquete globular a un tubo falcón y se adicionaron 5 ml. de TKM1 más 125 μ l de tritón, se mezclo perfectamente hasta que el tritón se homogenizo, posteriormente se centrifugo a 3000 rpm durante 10 min, eliminando todo el sobrenadante y manteniendo el botón globular, El botón obtenido se lavó con TKM-1 hasta eliminar la hemoglobina completamente, estos lavados se realizaron sin agregar tritón y se centrifugo a 3000 rpm durante 5 min, este paso se realizo hasta tener un paquete completamente blanco.

La segunda fase es la lisis de leucocitos; primero se adicionaron 800 μ l de TKM2 y 50 μ l de SDS al 20%, se mezclo perfectamente hasta que ya no se viera el botón y entonces se incubo a 55° C por 15 min., posteriormente se precipitaron las proteínas adicionando 300 μ l de NaCl = 6 M, mezclando y centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a dos tubos appendorf de 1.5 ml y se adiciono 1000 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezclo por inversión hasta que precipitaron las hebras de ADN, se centrifugo a 14 000 rpm durante 10 min y se tiro el sobrenadante. Posteriormente se lavo el botón de ADN con 1000 μ l de etanol frío al 70%, se centrifugo a 14 000 rpm durante 5 min y se tiro el

sobrenadante. El botón de ADN se seco durante 20 min, ya seco este se resuspendió en 250 µl de T.E., por ultimo este fue incubado durante 15 min a 55°C. Una vez purificado el ADN este se cuantificó, concentró y se determinó el grado de pureza del ADN, de la siguiente manera: El ADN se cuantificó en un Fluorímetro ND-1000 (NanoDrop). Por espectrofotometría a 260 y 280 nm.

Se calculó su pureza mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \times F \times d$$

Donde DO₂₆₀ es la densidad óptica a 260 nm, F es una constante igual a 0.05 (50µg de ADN=1DO a 260 nm) y d es el factor de dilución. El criterio de pureza que se evaluó fue de 260 nm/280 nm ≥ 1.6, de igual forma se verificó la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1%.

Finalmente, el ADN se ajustó a una concentración de 200ng/ul con TE (Tris-EDTA) y se realizaron alícuotas de éste, las cuales se guardaron a -70° C y -20° C y a 4° C y dos alícuotas más de 10ng/ul, para su óptima preservación y uso posterior.

4.2. Selección de oligonucleótidos de los sitios polimórficos.

Se escogieron diez polimorfismos para el presente estudio, cinco pertenecientes al gen del *AGT* y cinco pertenecientes al gen del *AGTR1*. Estos polimorfismos fueron seleccionados debido a que previamente han sido asociados a hipertensión y/o a otras enfermedades de riesgo cardiovascular. Los polimorfismos su localización, el cambio de alelo y el cambio de aminoácido, así como el número de ID de cada SNP e iniciadores específicos, son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3 Polimorfismos incluidos en el presente estudio, nombre, localización, ID SNP e iniciadores específicos

GEN	POLIMORFISMO	LOCALIZACION	Cambio alelo	Cambio de a.a.	ID SNP +	Iniciador específico Sentido /Anti sentido
AGT Chr. 1	C -532 T	Región promotora			rs5046	5'GCACTTTTCACTTGCTTGTGTGTTTTC3' 3'TCCCAGTGTCTATTAGAGGCCTTTGC-5'
	A -217 G	Región promotora			rs5049	5'-GTAATGTGTAACCTGACCCTGCACCA-3' 3'-GGCTCACTCTGTTTCAGCAGTAAA-5'
	A -6 G	5' UTR			rs5051	5'- CCCAGAACAACGGCAGCTTCTTCCCCC-3 3'- TJJGGCCGGTCCAGATGCCCTATTTAT-5'
	T174M	Exón 2, codón2, a.a. 207	No sinónimo <u>ACG</u> ⇒ <u>ATG</u>	Thr[T] ⇒ Met[M]	rs4762	5'-TAGCCAGGCCAGCTGCTGCTGTCCAC -3' 3'-TGGTGGTGGGCGTGTTACAGCCCCA-5'
	M235T	Exón 2, codón 2, a.a. 268	No sinónimo <u>ATG</u> ⇒ <u>ACG</u>	Met[M] ⇒ Thr[T]	rs699	5'- AGGATGGAAGACTGGCTGCTCCCTGAC'-3 3'- TGGGAGCCAGTGTGGACAGCACCTG-5'
AGTR1 Chr 3	A -777 T	Región promotora			rs275651	5'- TAGTTTACCAAAAATCAATTAATGTTA'-3 3'- TGATAGGTGAGTAGGGTGACTGTAGT -5'
	G -680 T	Región promotora			rs275652	5'- ATTCTCAACAAAATGTAGGCAAATTGA'-3 3'- CATCCAATAACATATGAAAGGGACTA -5'
	A -119 G	Región promotora			rs275653	5'- GGCCCAACCTCCTCCCTCTCGGGATAC'-3 3'- TTGACGGCAGCAAGGATGATGCCACA-5'
	C 43732 T	Exón 3, codón 3, a.a.191	sinónimo <u>CTC</u> ⇒ <u>CTT</u>	Leu[L] ⇒ Leu[L]	rs5182	5'- CATTATGAGTCCCAAAATTCAACCCTC -3' 3'- TCCGATAGGGCTGGGCCTGACCAAAA-5'
	A 44221 G	Exón 3, codón 3, a.a. 354	sinónimo <u>CCA</u> ⇒ <u>CCG</u>	Pro[P] ⇒ Pro[P]	rs5183	5'- AGCTCATCCACCAAGAAGCCTGCACCA -3' 3'- GTGTTTTGAGGTTGAGTGACATGTTTC-5'

* NCBI;Entrez SNP, disponible en URL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=>).

4.3. Discriminación alélica por la técnica de PCR Tiempo Real usando el sistema TaqMan.

Para llevar a cabo la técnica, de cada sitio polimórfico se mandaron sintetizar tanto los iniciadores específicos como las sondas de hibridación específica Taqman que detectan el cambio. Los ensayos de PCR en tiempo real para cada polimorfismo se sintetizaron por la compañía *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA) y los genotipos de cada muestra fueron determinados automáticamente estableciendo las medidas de fluorescencia alelo específica (Fig. 14) mediante lectura láser en un equipo de PCR en tiempo real *ABI PRISM 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA). Los resultados se analizaron empleando el *software Sequence Detection Systems versión 2.3*, para la discriminación alélica (Applied Biosystems) que permite definir los distintos alelos de forma exacta.

Componentes necesarios para la preparación de la reacción del arreglo TaqMan

TaqMan Assay on Demand: Mezcla que contiene oligonucleótidos y sondas marcadas para la amplificación y descubrimiento de alelos por el sistema TaqMan. Esta mezcla se encuentra a concentración 20X, la concentración final de cada primer es de 900nM y la sonda 250nM (1X).

TaqMan Universal PCR Master Mix: Mezcla para la reacción de PCR que contiene AmpliTaq Gold ADN polimerasa, dNTPs (con dUTP), referencia pasiva ROX, 2X concentrado, para usar 1X.

Agua libre de DNAasa: Para la dilución de ADN.

ADN Genómico: De 1 a 20 ng para la reacción.

Tabla 4 .Componentes de la reacción Taqman.

Componentes	Volumen (ul) para 10 ul de reacción
TaqMan Universal PCR	5.000
Master Mix, 2X	
TaqMan Assay on Demand	0.125
Agua ADNse free	0.875
ADN Genómico	4.000
Volumen Total.	10,00

Existen dos tipos de ensayo que pueden ser realizados en el equipo AB 7900HT: Los ensayos cuantitativos (cuantificación absoluta y cuantificación relativa) y de punto final (discriminación alélica). Cuando se hace la placa de cuantificación, la señal fluorescente es reunida en tiempo real, en otros términos, a cada ciclo, generando así mismo una curva de amplificación de cada una de las muestras. En los ensayos de punto final la lectura de la señal es realizada tanto antes como después de la amplificación, generando un grafico de discriminación alélica para las muestras.(Fig.14).

Tabla 5: Condiciones de termociclado para el ensayos Taqman.

Temperaturas y Tiempos			
Pasos de inicio		PCR 40 ciclos	
Activación AmpErase UNG	Activación AmpliTaq Gold ADN polimerasa	Desnaturalización inicial	Alineamiento Extensión
HOLD	HOLD	CICLOS	
2 min 50°C	10 min 95°C	15 seg 95°C	1 min. 60°C

El fundamento de las sondas TaqMan es el del principio FRET (Fluorescent Resonant Energy Transfer), donde una sonda TaqMan es un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la región central del amplicón. Tiene una secuencia de 13 a 18 nucleótidos que presenta en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un quécher o apagador que anteriormente era TAMRA (actualmente se utilizan apagadores no fluorescentes) de tal forma que cuando estas dos moléculas se encuentran unidas por la sonda, toda la fluorescencia emitida por el reportero, es absorbida por el apagador, por lo que la fluorescencia global observada es igual a cero, a este fenómeno se le conoce como *Föster (o Fluorescent) Resonant Energy Transfer* (FRET). Las sondas TaqMan tienen una T_m mayor que los primer's por lo que, durante la etapa de alineación, la primera en unirse a su secuencia específica es la sonda y, posteriormente los primer's, de tal forma que cuando la ADN polimerasa se une al extremo 3' del primer e inicia la elongación, en su paso se encuentra con la sonda y la degrada dada su actividad exonucleasa 5'-3'. Al ser degradada, libera al reportero del apagador lo que suprime el fenómeno FRET y la fluorescencia emitida puede ser determinada por el sistema de detección ABI 7900 HT. (Fig. 14). Dado que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sonda degradada, y esta a su vez es proporcional a la cantidad de templado generado, este sistema permite visualizar el incremento de amplicón a lo largo de la reacción de PCR. Para la determinación de SNP's se utilizan en el mismo sistema de amplificación dos sondas cada una de las cuales presenta en la posición central una de las variantes del nucleótido dimórfico, utilizando como reporteros a FAM y VIC para diferenciarlas en tres. La sonda que hibrida perfectamente con la secuencia blanco es escindida por la Taq polimerasa, mientras que un mismach en el nucleótido dimórfico reduce la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia blanco y por lo tanto su degradación. De esta forma, un aumento en la señal de uno de los reporteros indicara homocigocidad para el nucleótido dimórfico que reporta la fluorescencia específica; mientras que si se observa fluorescencia de VIC y FAM, es un indicativo de heterocigocidad.

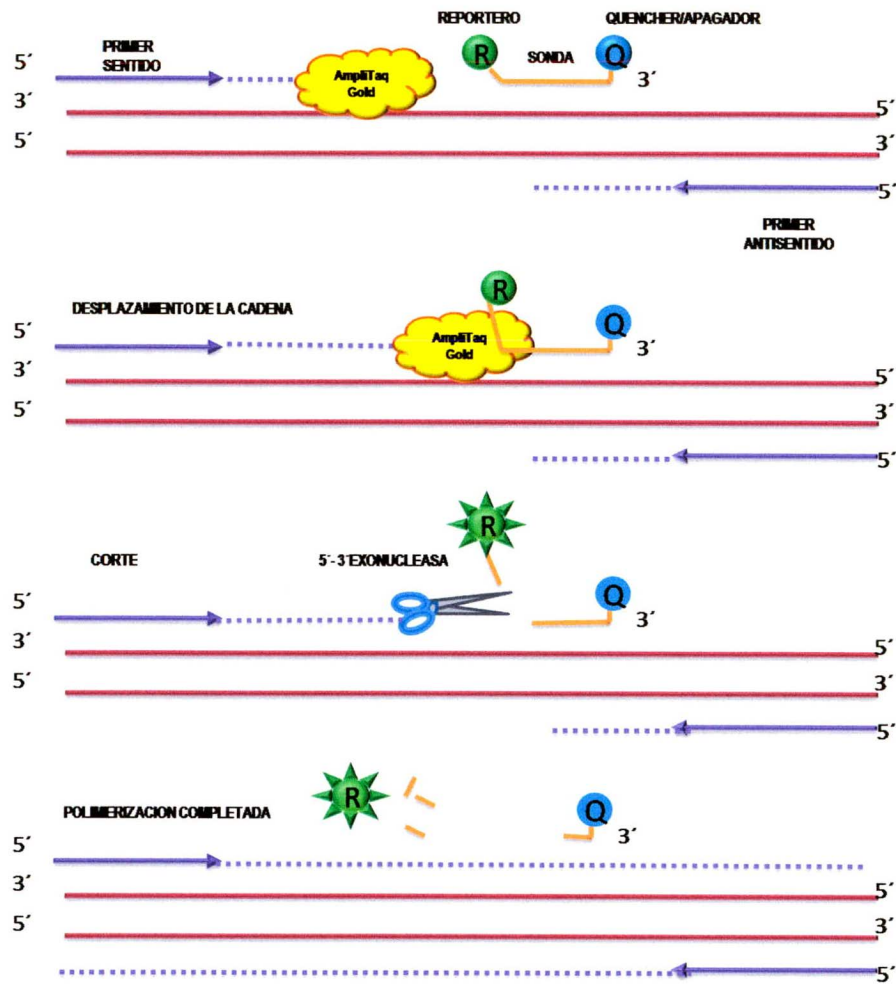


Figura 14: Fundamento Sonda Taqman; se muestra el fluoróforo y el quécher (bloqueador de la fluorescencia) acoplados a la sonda previo al proceso de amplificación y el fluoróforo activo luego de la formación del producto.

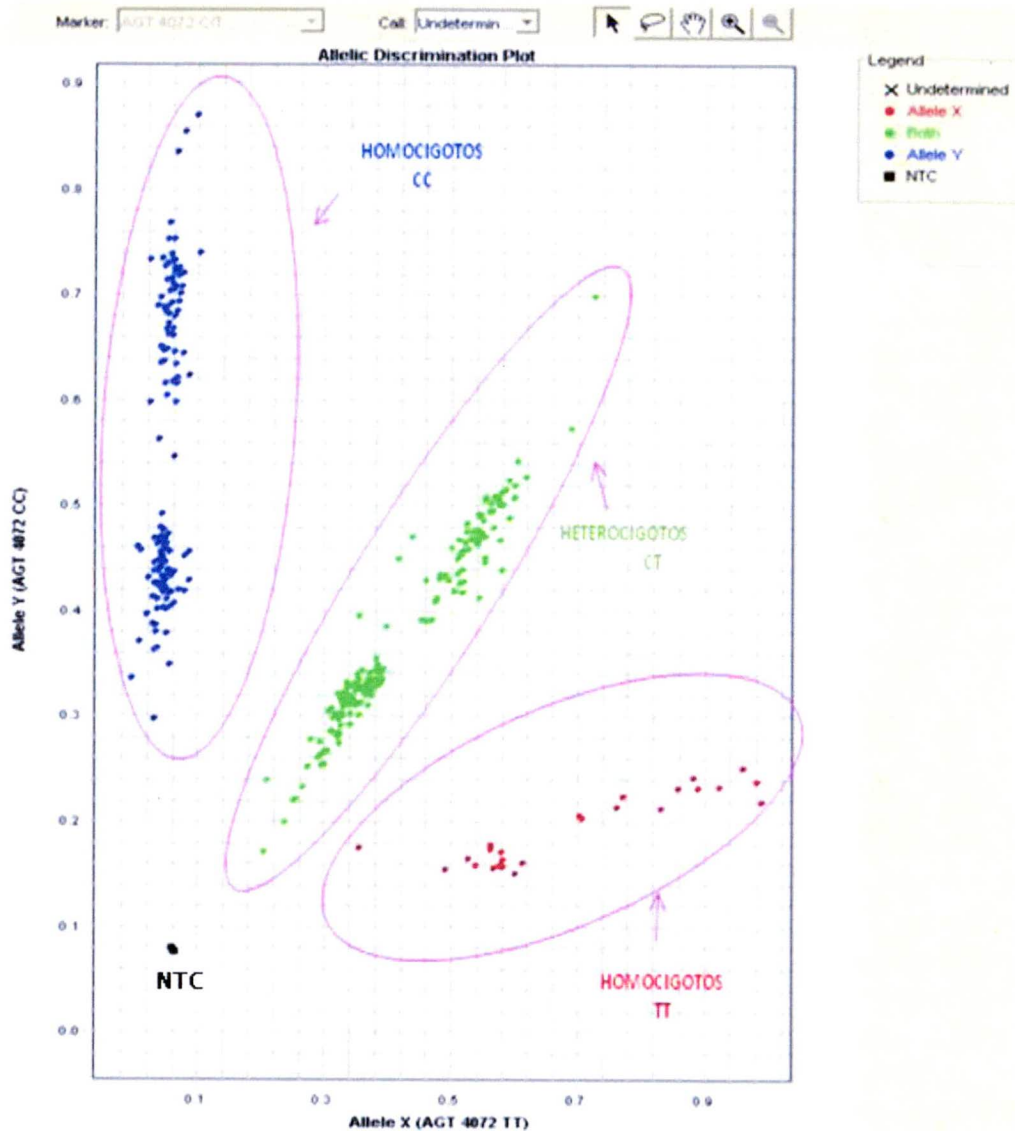


Figura 15: Mapa de discriminación alélica, el ejemplo muestra el polimorfismo M235 T. del gen *AGT*. Los puntos azules representan el genotipo homocigoto para el alelo CC, los puntos verdes el genotipo heterocigoto CT y los puntos rojos a los individuos homocigotos para el alelo T. Los cuadros negros son los controles negativos (NTC; No Templado Control).

4.4. Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes *AGT* y *AGTR1* se determinaron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba de chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos (hipertensos y normotensos) se determinaron usando la prueba de X^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2 x 2 usando el programa estadístico Epiinfo v 5.0 (USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Cuando el número comparado en alguna celda era menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El nivel de significancia de p fue de $p < 0.05$, este valor se corrigió por medio de la prueba de Bonferroni (pC) multiplicando el valor de p por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con nivel de significancia establecido como $pC < 0.05$. El riesgo relativo con intervalo de confianza del 95% (IC) fue evaluado como razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf (Woolf, 1995). Se usa el IC de 95% y este nos permite tener una confianza del 95% de que el valor de la población (parámetro) se halla dentro del intervalo. Si el IC toca el número 1 o la unidad no hay significancia. Cuando los intervalos de confianza no tocan el 1 y están por encima del 1, además de ser significativos indica que existe una asociación causal, deletérea, dañina o perjudicial. Si los intervalos de confianza no tocan el 1 y están por debajo del 1 (antes del 1), además de ser significativo indica que existe una asociación beneficiosa, buena o protectora. Para asegurarse que hay significancia estadística el valor de p debe ser < 0.05 .

4.5. Haplotipos

Posteriormente, con los resultados de las determinaciones de los 10 polimorfismos de los genes del *AGT*(C-532T, A-217G, A-6G, T174M, M235T) y *AGTR1*(A-777T, G-680T, A-119G, C43732T, A44221G) se obtuvieron los haplotipos con el programa Haploview versión 4.1 (*Broad Institute of Massachusetts Institute of*

Technology and Harvard University, Cambridge, MA, Estados Unidos). En dicho programa se ingresan los diplotipos, obtenidos de cada polimorfismo, de los hipertensos y de los individuos normotensos. Haploview v. 4.1 realiza varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL) que utiliza para crear una representación grafica, también conocida como mapa de haplotipos. El DL hace referencia a una situación en que una combinación particular de alelos en dos loci próximos segregan ligados más frecuentemente que lo se esperaría dada la frecuencia de cada alelo (Sudbery, 2004). Los cuadros de colores dentro del mapa de haplotipos representa las relaciones de desequilibrio de ligamiento; los cuadros color rojo brillante representan una clara evidencia de DL, los cuadros color rojo claro o rosa indican una leve evidencia de DL y los cuadros color blanco significan que no existe DL. Al seleccionar grupos de marcadores (polimorfismos) el programa genera posibles haplotipos y su frecuencia en la población (Barrett et al, 2005)

Mapas genómicos

Un mapa genómico es una representación lineal de los sitios genómicos importantes (genes y marcadores). Se refiere tanto a un cromosoma (mapa citogenético) como a un tramo de ADN. Un mapa provee información acerca de la posición de un marcado genómico en particular y su relación con los otros.

Un mapa genético expresa las posiciones relativas de los genes entre sí sin un anclaje físico al cromosoma. La distancia entre los marcadores se determina por la frecuencia de recombinación durante la meiosis, que a su vez está determinada por la distancia relativa entre los loci. Un mapa físico provee información de la posición exacta de un gen o marcador, da la posición de un locus génico y su distancia hacia otros genes en el mismo cromosoma en valores absolutos; expresada en pares de bases (pb) y en relación con determinadas posiciones a lo largo del cromosoma. El mapa genético da la frecuencia de recombinación, expresada en unidades de recombinación o centimorgans (cM). Un centimorgan

corresponde a una frecuencia de recombinación del 1%, es decir, la aparición de un gameto recombinante entre 100, mientras que los 99 restantes tendrán la configuración parental. Físicamente, 1 cM corresponde a una secuencia de ADN de entre 0.7 y 1 Mb, pero no hay una relación fija entre las distancias genéticas y físicas (Passarge, 2004; Sudbery, 2004).

Para que una meiosis sea informativa es preciso que se pueda medir la frecuencia de recombinación entre los marcadores, es decir, que sea posible distinguir entre los cromosomas parentales y los recombinantes. Esto precisa que ambos marcadores sean heterocigotos. La fase determina la manera en que alelos particulares próximos en la localización de sus loci están en el mismo (cis), o en distinto cromosoma (trans). Un ejemplo de esto en la meiosis informativa representada en la Figura 16, en la que los alelos A y 1 están en cis, mientras que los alelos A y 2 están en trans. Se aprecia claramente la necesidad de conocer la fase para distinguir tras la meiosis si los cromosomas son recombinantes o son parentales (Sudbery, 2004).

Un haplotipo consiste en un conjunto de alelos ligados y próximos que tienden a heredarse conjuntamente en la meiosis sin separarse por recombinación (haplotipo es la contracción de genotipo haploide). En el ejemplo anterior se muestran dos haplotipos parentales, A1 y B2. Los haplotipos pueden contener más de dos alelos. De modo general, los alelos que forman un haplotipo se heredarán conjuntamente como un bloque puesto que dada su cercanía hace difícil que se separen por recombinación. (Sudbery, 2004).

Los primeros mapas del genoma humano se llevaron a cabo en los años 70 y se basaban en el ligamiento entre marcadores, los grupos sanguíneos y otros rasgos fenotípicos de carácter monogénico. El ligamiento entre estos marcadores era bastante escaso, de manera que la resolución de los mapas era bastante baja y amplias zonas del genoma quedan sin representación. La falta de marcadores

útiles en relación al tamaño del genoma retrasó el progreso en la construcción de los mapas genéticos humanos. La salida de atolladero técnico en que se encontraba la construcción de mapas se produjo en 1980 gracias al descubrimiento de que muchas secuencias del genoma eran polimórficas a pesar de no tener efectos fenotípicos. A estos marcadores se les llamó polimorfismos moleculares neutros. El primero de estos marcadores utilizados se denominó mediante fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's). Los RFLP's se basan en la presencia o ausencia de una secuencia para una enzima de restricción, generalmente debida a un polimorfismo en una sola base.

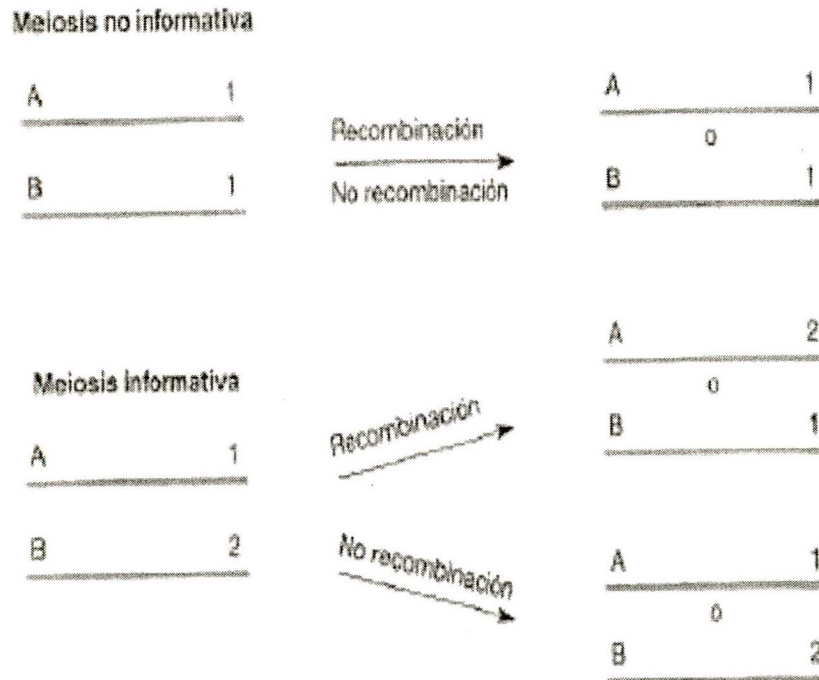


Figura 16. Meiosis informativa y no informativa. La figura Izquierda: dos cromosomas homólogos en una célula diploide a punto de desarrollar una meiosis. Dos loci contiguos, cada uno con los alelos, se localizan en estos cromosomas. Derecha: se muestra la estructura de los gametos resultantes de la meiosis. Arriba: la meiosis no es informativa puesto que uno de los loci es homocigoto;

BIBLIOTECA UACM

después de la meiosis los gametos dispondrán de cromosomas idénticos a los que tenían antes de la meiosis. Abajo: la recombinación origina cromosomas que pueden distinguirse de los cromosomas no recombinantes; la meiosis es informativa (Tomado de Sudbery, 2004).

IV. RESULTADOS

1. Características clínicas de los grupos de estudio

En este estudio de casos y controles se analizaron 115 hipertensos y 291 normotensos, se determinaron las medidas somatométricas (el índice de masa corporal), la presión arterial y los niveles de lípidos y lipoproteínas en una muestra de la población mestizo mexicana de ambos sexos, de 20 a 80 años.

La medición de la presión arterial fue ajustada por edad, género. Para esto se tomo en cuenta la hipertensión arterial sistólica y diastólica.

CARACTERÍSTICAS CLINICAS DEL GRUPO HIPERTENSO

El promedio de la edad fue de 55 años, de un total de 115 individuos el 45% eran mujeres y el 55% eran hombres. Este grupo presento un promedio de IMC de 29.5 Kg/m², en cuanto a las lipoproteínas el promedio de colesterol total fue de 197.5 mg/dl, de HDL (proteínas de alta densidad) 43.2mg/dl, de LDL (proteínas de baja densidad) 122.7 mg/dl y de Triglicéridos fue de 197.7 mg/dl; el promedio de glucosa para el grupo de hipertensos fue de 108.6 mg/dl, se presento un 15% de individuos con Diabetes Mellitus tipo 2 (> 126 mg/dl)

CARACTERÍSTICAS CLINICAS DEL GRUPO NORMOTENSO

En el grupo de individuos normotensos el promedio de la edad fue de 50 años de un total de 291 individuos el 54% eran mujeres y el 46% eran hombres. Este grupo presento un promedio de IMC de 27.2 Kg/m², en cuanto a las lipoproteínas el promedio de colesterol total fue de 189.9 mg/dl, de HDL (Proteínas de alta densidad) 46.4 mg/dl, de LDL (proteínas de baja densidad)

9117.5 mg/dl y de Triglicéridos fue de 160.9 mg/dl; el promedio de glucosa para este grupo fue de 92.5 mg/dl, se presentó un 10% de individuos con Diabetes Mellitus tipo 2 (> 126 mg/dl)

Dentro de los factores considerados en el estilo de vida –consumo de tabaco, alcohol-. La mayor prevalencia de tabaquismo, se dio en los individuos normotensos (24%) al comparar con el grupo de hipertensos (17%). En cuanto al consumo de alcohol la prevalencia en hipertensos fue de 70% y en el grupo de normotensos fue de 69%.

2. Estudio Genético

Para cada polimorfismo se confirmó que la proporción de los genotipos se encontraran en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo tanto se puede sugerir que no hay estratificación poblacional en nuestra muestra de estudio.

2.1. Análisis de polimorfismos del gen *AGT* y del gen *AGTR1*

Para la identificación y genotipificación de los genotipos de los polimorfismos del gen *AGT* y del gen *AGTR1* se realizó la discriminación alélica en 115 hipertensos y 291 individuos normotensos. Los resultados de la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de estudio se muestran a continuación.

Tabla 6: Características Clínicas y Demográficas de sujetos Hipertensos y Normotensos, especificando los valores de referencia.

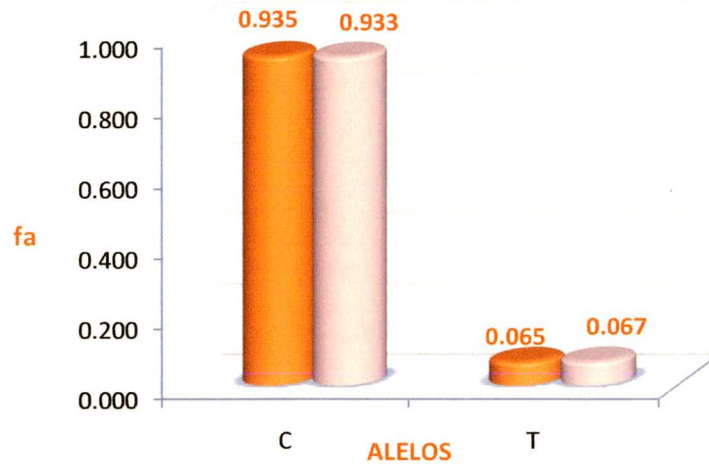
Variables		NORMOTENSOS (N= 291)			HIPERTENSOS (N=115)			Valores de referencia *				
Genero		N	%		N	%						
	FEMENINO	156	54%		52	45%						
	MASCULINO	135	46%		63	55%						
			DS	Max	Min		DS	Max	Min			
	Edad (años)	50	±10	72	21	55	±10	79	29			
	IMC (kg,m ⁻²) (Índice de Masa Corporal)	27.2			29.5			Normal 19-24.9	Sobrepeso 25-29.9	Obesidad I 30-34.9	ObesidadII 35-39.9	Obesidad III >40
	Colesterol Total (mg/dl)	189.9			197.5			Bajo riesgo <200		Riesgo Incierto 201 - 239		Alto riesgo >240
	✓ HDL (mg/dl) High density lipoprotein	46.4			43.2			Alto riesgo < 40		Bajo riesgo >60		
	✗ LDL (mg/dl) Low Density Lipoprotein	117.5			122.7			Deseable <130		Limite 130 – 160		Elevado >160
	Triglicéridos (mg/dl)	160.9			197.7			35 – 160				
	Glucosa	92.5			108.6			Normal Antes de las comidas 1 hr. Después de comer		70 – 110 menos de 160		
	Diabético DM2(No/Si)	10			15			> 126 mg/dl				
	Presión Arterial							Normal	Pre-HAS	HAS-1	HAS-2	HAS-3
	PA sistólica (mmHg)	111			141.3			<120	120 – 139	140 - 159	>160	>180
	PA diastólica (mmHg)	70			83.3			<80	80 – 89	90 – 99	>100	>110
	Estilo de Vida	n			n							
	Tabaco (No/Si)	69	24%		20	17%						
	Alcohol (No/Si)	202	69%		80	70%						

Organización Mundial de la Salud. Encuestas serológicas múltiples y bancos de la OMS para sueros de referencia. Ginebra: OMS, 1970.. UR [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_454_spa.pdf].

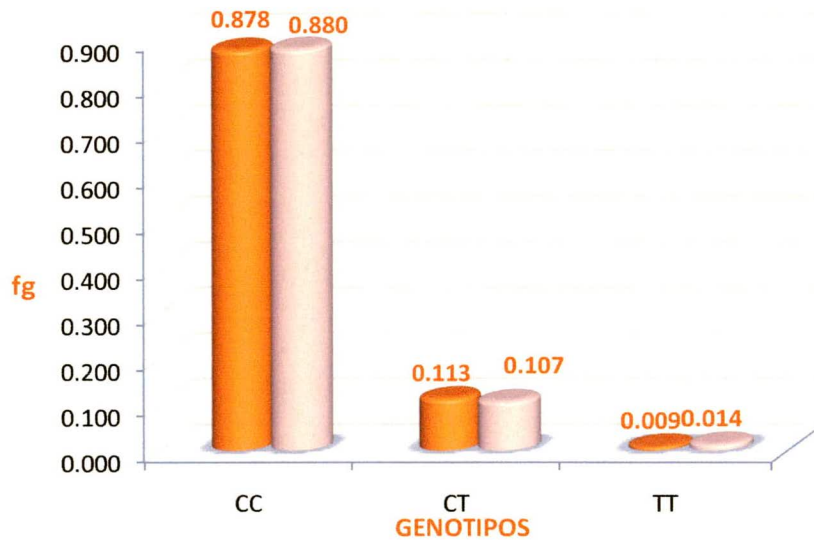
Tabla 7. Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo C-532T en hipertensos y normotensos.

C-532T	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		P
	n	fa	n	fa	
Alelos					
C	215	0.935	545	0.933	NS
T	15	0.065	39	0.067	NS
Genotipos	N	fg	n	fg	
CC	101	0.878	257	0.880	NS
CT	13	0.113	31	0.106	NS
TT	1	0.009	4	0.014	NS

En la tabla se muestran las frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del sitio polimórfico C-532T, los resultados de la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de hipertensos e individuos normotensos se comportaron de manera similar. $p < 0.05$. NS= no significativo.



Grafica1. Comparación de frecuencias alelicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo C y T del sitio C-532T.

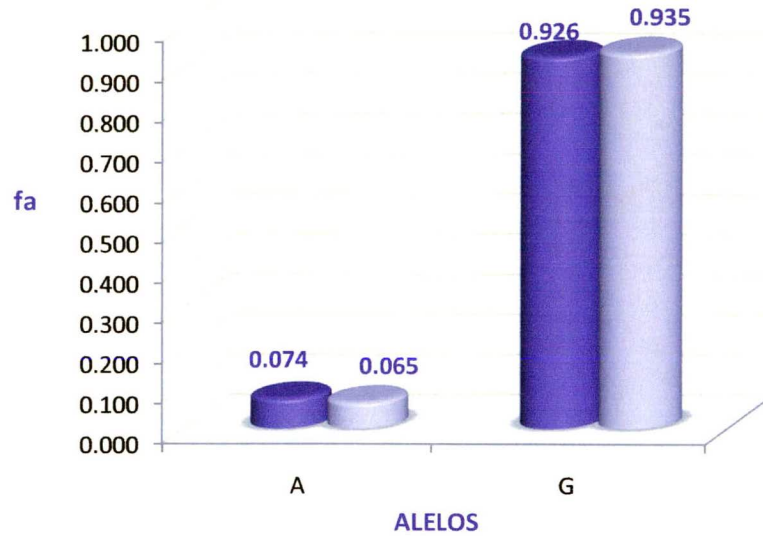


Grafica2. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo CC, CT y TT del sitio C-532T.

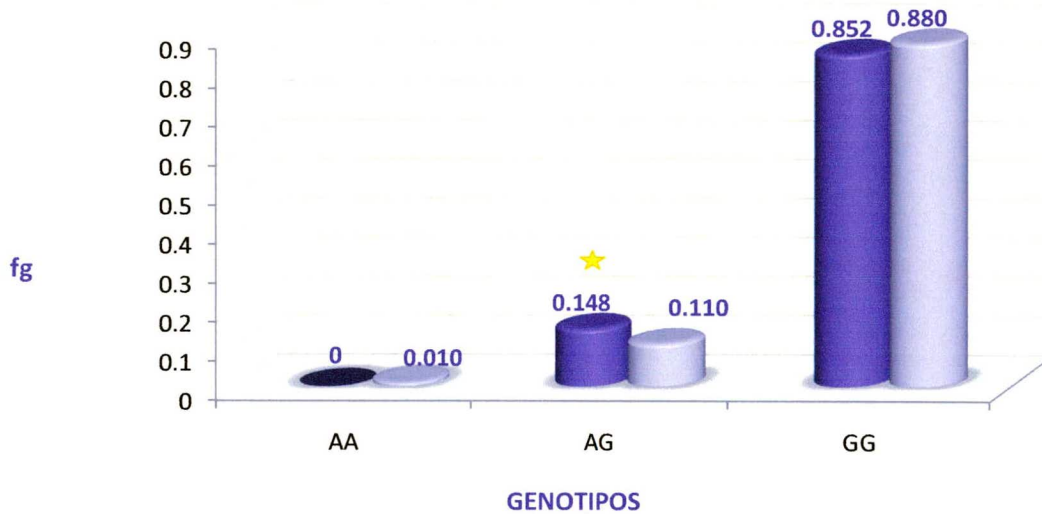
Tabla 8: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo A-217G en hipertensos y normotensos.

A-217 G	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		p	RM	(IC 95%)
	Alelos	n	fa	n			
A	17	0.074	38	0.065			
G	213	0.926	544	0.935			
Genotipos	N	fg	n	fg			
AA	0	0	3	0.010			
AG	17	0.148	32	0.110	0.026	1.86	(1.03-3.34)
GG	98	0.852	256	0.880			

En la tabla se muestran las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del sitio polimorfo A-217G, los resultados de la comparación entre el genotipo AG del grupo de hipertensos e individuos normotensos, presenta un incremento de la frecuencia genotípica (fg) en los hipertensos, con un valor de p de 0.026 RM=1.86 y un IC 95% 1.03-3.34



Grafica 3. Comparación de frecuencias alélicas (fa) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-217G

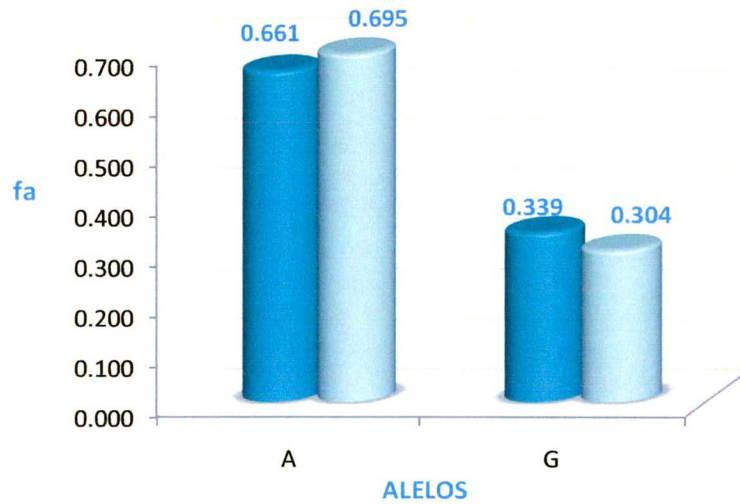


Grafica 4. Comparación de frecuencias genotípicas (fg) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A-217G

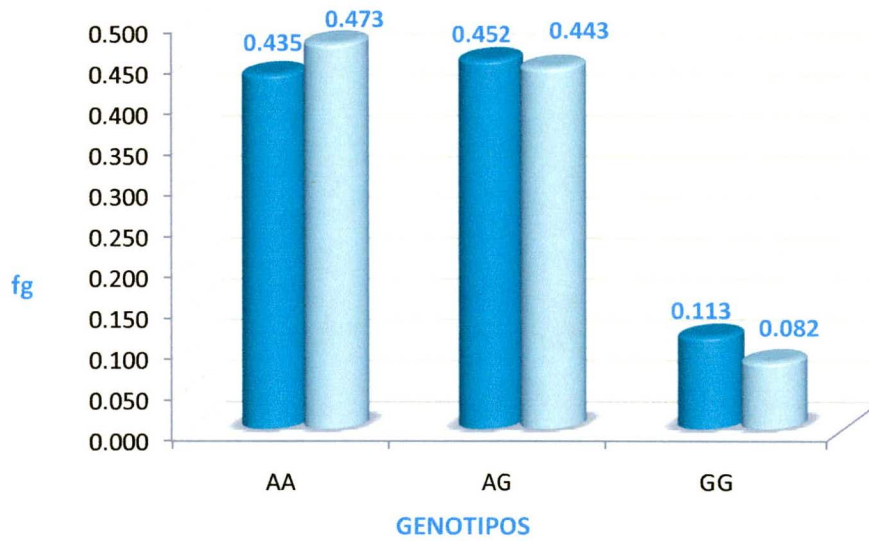
Tabla 9: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo A-6G en hipertensos y normotensos.

A-6 G	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		p
	Alelos	n	Fa	n	
A	17	0.661	405	0.695	NS
G	213	0.339	177	0.304	NS
Genotipos	N	Fg	n	fg	
AA	50	0.435	138	0.473	NS
AG	52	0.452	129	0.443	NS
GG	13	0.113	24	0.082	NS

En la tabla se muestran las frecuencias alelicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del sitio polimorfo A-6 G, al comparar las frecuencias alelicas y genotípicas entre el grupo de hipertensos y el grupo de individuos normotensos se presento un comportamiento similar. $p < 0.05$, NS. no significativo,



Grafica 5. Comparación de frecuencias alélicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-6 G

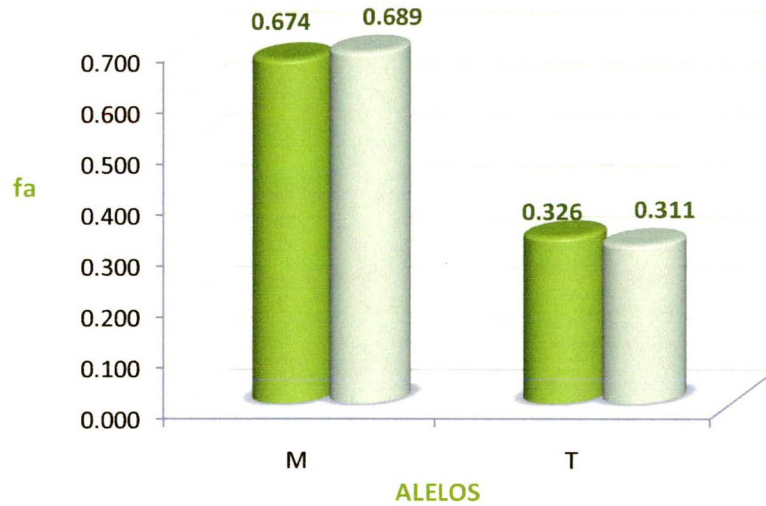


Grafica 6. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A-6G

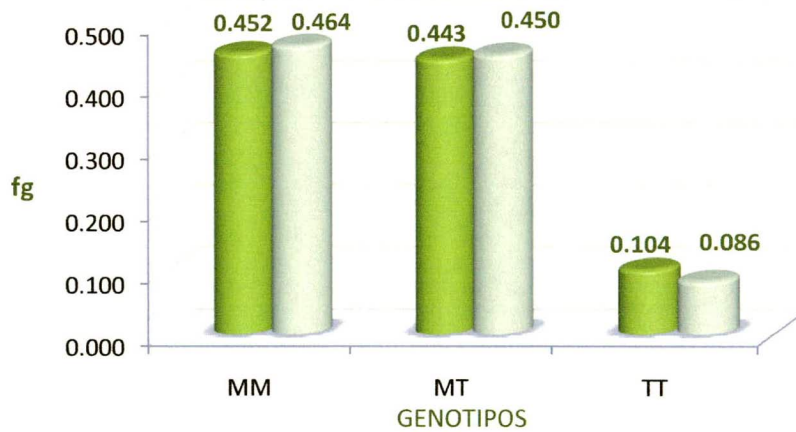
Tabla 10: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo M235T en hipertensos y normotensos.

M235T	HIPERTENSO S (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		p	
	Alelos	n	Fa	n		fa
M		155	0.674	401	0.689	NS
T		75	0.326	181	0.311	NS
Genotipos	N	Fg	n	fg		
MM	52	0.452	135	0.464	NS	
MT	51	0.443	131	0.450	NS	
TT	12	0.104	25	0.086	NS	

En la tabla se muestran las frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del sitio polimórfico M235T la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de hipertensos y el grupo de individuos normotensos presentan la misma distribución de frecuencias. $p < 0.05$, NS. no significativo,



Grafica 7. Comparación de frecuencias alélicas (fa) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo M y T del sitio M235T.

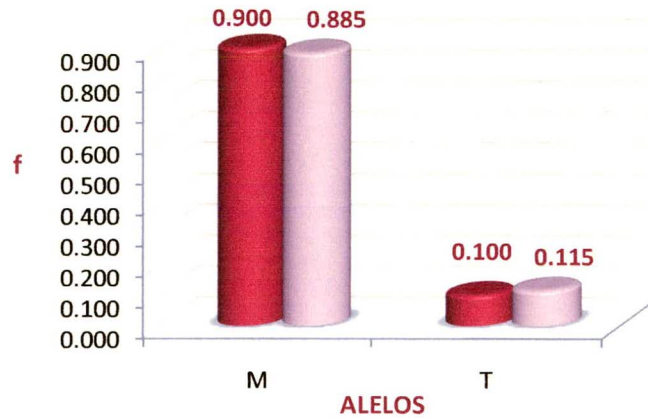


Grafica 8. Comparación de frecuencias genotípicas (fg) entre pacientes e individuos normotensos del genotipo MM, MT y TT del sitio M235T.

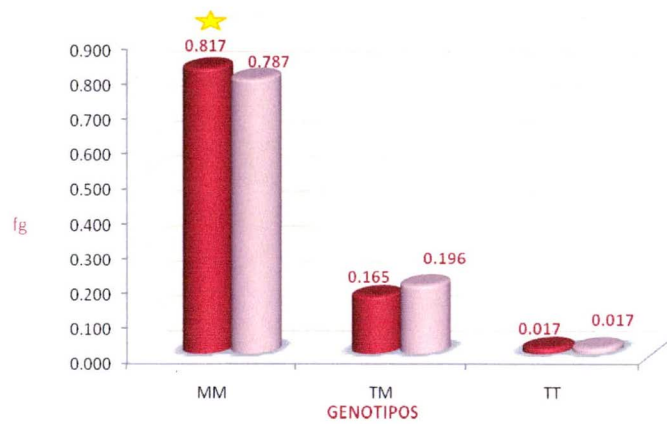
Tabla 11: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo T174M en hipertensos y normotensos.

T174M	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=292)		p	RR	(IC 95%)
	n	fa	n	fa			
Alelos							
M	207	0.900	516	0.884			
T	23	0.100	68	0.116			
Genotipos	N	fg	N	fg			
MM	94	0.817	229	0.784	0.049	1.52	(0.96-2.41)
TM	19	0.165	58	0.199			
TT	2	0.017	5	0.017			

En la tabla se muestran las frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del polimorfismo T-174M. al comparar el genotipo MM entre el grupo de hipertensos e individuos normotensos, se observa un incremento de la frecuencia genotípica (fg) en los hipertensos, con un valor de p de 0.049, en cuanto a las frecuencias alélicas (fa) presentan una distribución similar entre ambos grupos.



Grafica 9. Comparación de frecuencias alélicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo M y T del sitio T174M

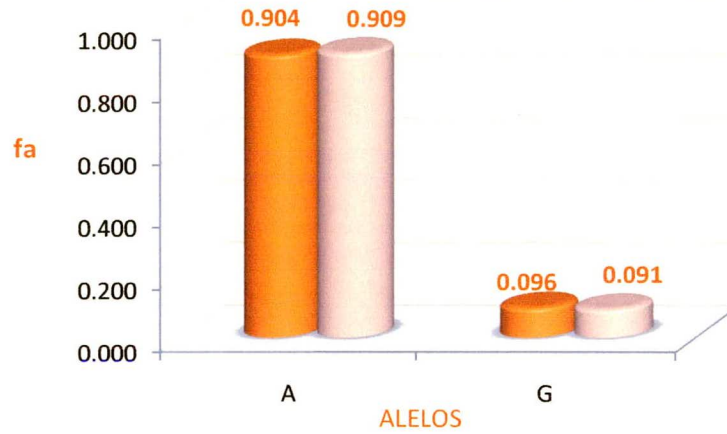


Grafica 10. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo MM, MT y TT del sitio T174M

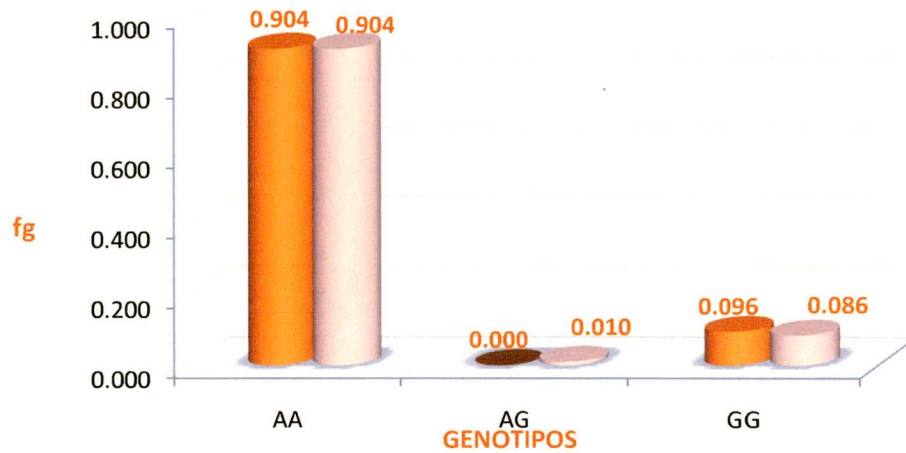
Tabla 12: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo A 44221 G en los grupos de pacientes con HAS y de individuos normotensos.

A44221G	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=292)		p
	N	fa	n	fa	
Alelos					
A	208	0.904	531	0.909	NS
G	22	0.096	53	0.091	NS
Genotipos					
AA	104	0.904	264	0.904	NS
AG	0	0.000	3	0.010	NS
GG	11	0.096	25	0.086	NS

En la tabla se muestran las frecuencias alelicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del polimorfismo A44221G al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de hipertensos e individuos normotensos presentan una distribución similar, entre ambos grupos de estudio. $p < 0.05$, NS=No significativo.



Grafica 11. Comparación de frecuencias alélicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A 44221 G.

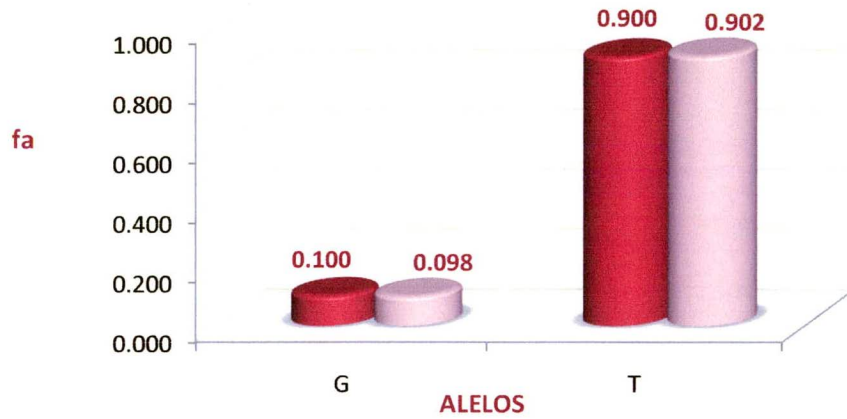


Grafica 12. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre pacientes e individuos normotensos del genotipo AA, AG y GG del sitio A 44221G

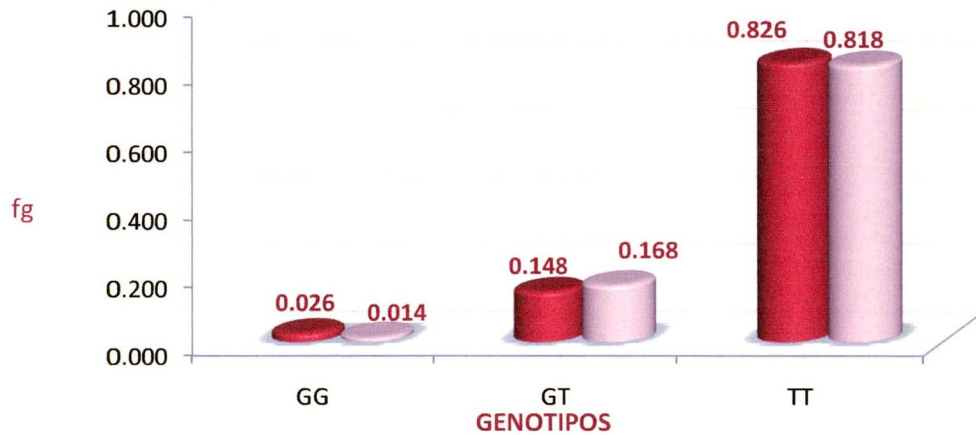
Tabla 13: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo G-680T en hipertensos y normotensos.

G-680T	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		P
	Alelos	N	fa	n	
G	23	0.100	57	0.098	NS
T	207	0.900	527	0.902	NS
Genotipos	N	fg	n	Fg	
GG	3	0.026	4	0.014	NS
GT	17	0.148	49	0.168	NS
TT	95	0.826	238	0.818	NS

La tabla muestra las frecuencias alelicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del sitio polimórfico G-680T la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas entre el grupo de hipertensos y el grupo de individuos normotensos no muestra diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias. $p < 0.05$, NS: No significativo,



Grafica 13. Comparación de frecuencias alélicas (fa) del sitio G-680T entre hipertensos e individuos normotensos del alelo G y T.

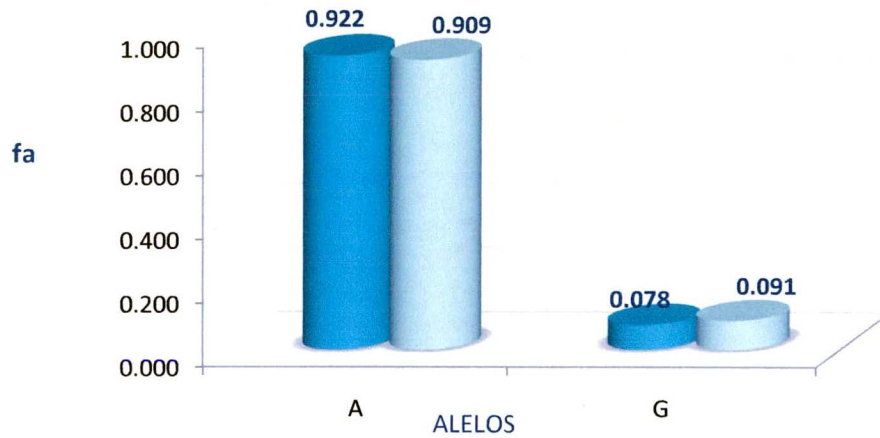


Grafica 14. Comparación de frecuencias genotípicas (fg) del sitio G-680T entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo GG, GT y TT.

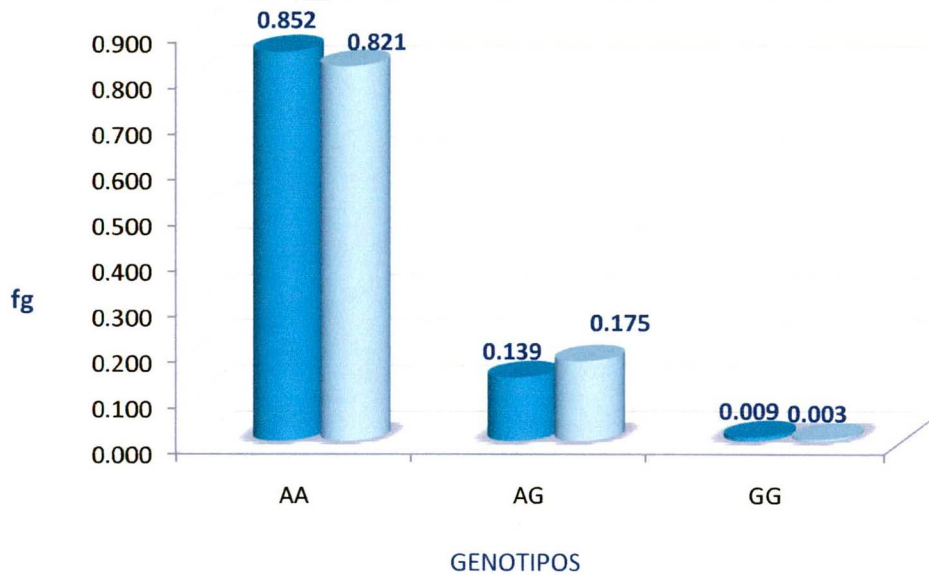
Tabla 14: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo A 44221 G en los hipertensos y normotensos.

A-119 G	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		p
	Alelos	n	fa	n	
A	212	0.922	529	0.909	NS
G	18	0.078	53	0.091	NS
Genotipos	N	fg	N	fg	
AA	98	0.852	239	0.821	NS
AG	16	0.139	51	0.175	NS
GG	1	0.009	1	0.003	NS

La tabla muestra las frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del sitio polimórfico A-119G se puede observar que al comparar el grupo de individuos normotensos y de hipertensos las frecuencias alélicas y genotípicas no presentan diferencias estadísticamente significativas.. NS: No significativo, $p < 0.05$.



Grafica 15. Comparación de frecuencias alélicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y G del sitio A-119G.

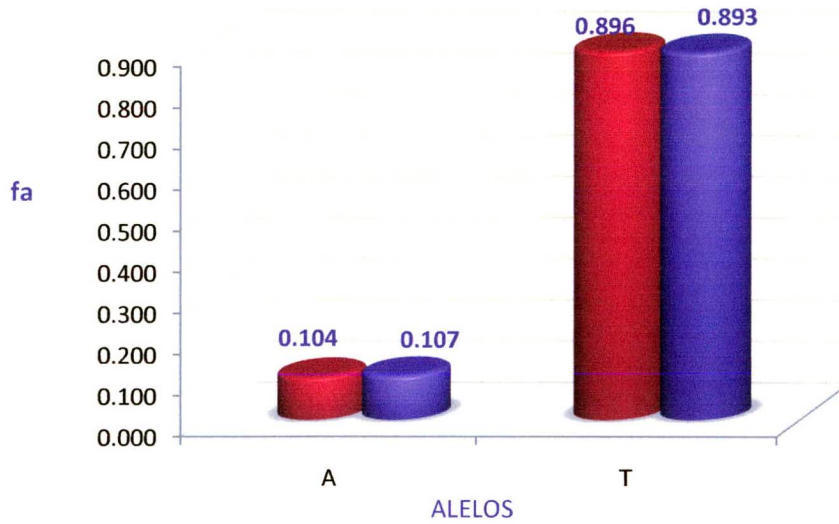


Grafica 16. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AG, GG del sitio A-119G.

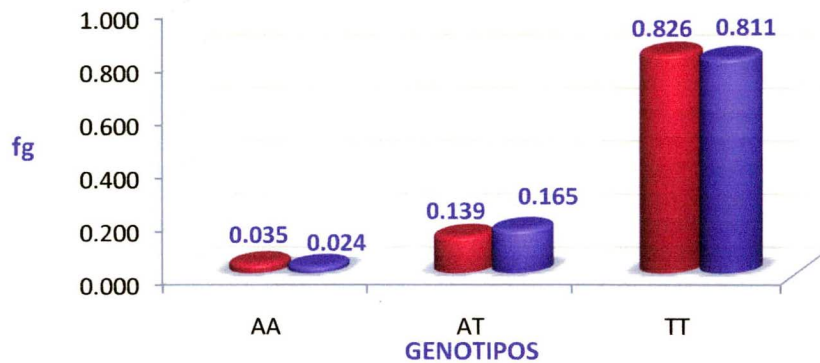
Tabla 15: Analisis de frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo A A-777T en los hipertensos y normotensos.

A-777T	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=291)		p
	N	fa	N	fa	
Alelos					
A	24	0.104	62	0.106	NS
T	206	0.896	520	0.894	NS
Genotipos	N	fg	N	fg	
AA	4	0.035	7	0.024	NS
AT	16	0.139	48	0.164	NS
TT	95	0.826	236	0.812	NS

La tabla muestra las frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) del polimorfismo A-777T al comparar a los hipertensos e individuos normotensos se mostro que las frecuencias alélicas y genotípicas no tienen diferencias estadísticamente significativas. El valor de p se obtuvo de la comparación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de ambos grupos. NS: No significativo, $p < 0.05$.



Grafica 17. Comparación de frecuencias alelicas (f_a) entre hipertensos e individuos normotensos del alelo A y T del sitio A-777T.



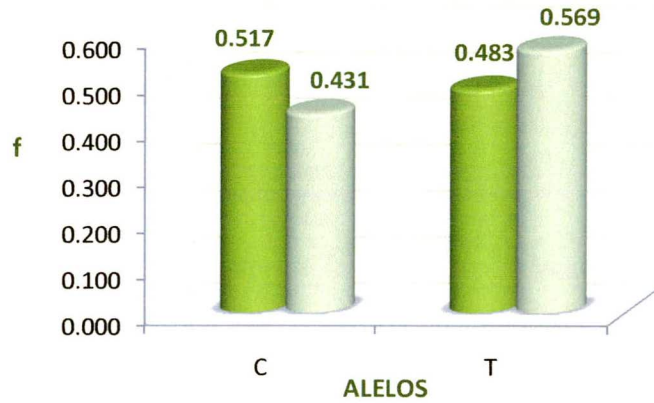
Grafica 18. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo AA, AT, TT del sitio A-777T.

Tabla 16: Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) del polimorfismo C43732T en los hipertensos y normotensos.

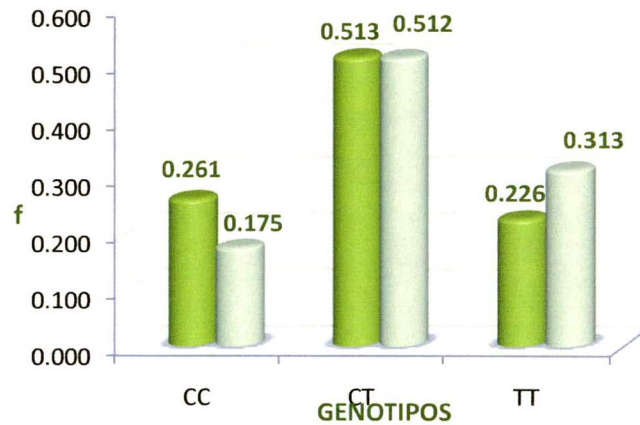
C43732T	HIPERTENSOS (n=115)		NORMOTENSOS (n=292)		pC	RR	(IC 95%)
	Alelos	N	fa	n			
C	119	0.517	251	0.430	0.046	1.42	(1.04-1.95)
T	111	0.483	333	0.570	0.046	0.70	(0.5-0.95)

Genotipos	N	fg	n	fg	p		
CC	30	0.261	51	0.175	0.049	1.66	(0.99-2.78)
CT	59	0.513	149	0.510			
TT	26	0.226	92	0.315			

La tabla muestra las frecuencias alélicas (fa) y las frecuencias genotípicas (fg) del sitio polimórfico C43731T en donde el valor de pC para los alelos C y T, obtenido al comparar las frecuencias de ambos alelos entre el grupo de hipertensos e individuos normotensos, es de $p = 0.046$. Se observó un incremento en la frecuencia alélica (fa) del alelo C en el grupo de hipertensos al compararse con la frecuencia alélica del grupo de individuos normotensos. La RM para el alelo C es igual a 1.42, con un IC al 95% de 1.42-1.95. Se observó un incremento de la frecuencia alélica (fa) del alelo T en el grupo de individuos normotensos al compararse con los hipertensos, donde la RM es de 0.070 con un IC al 95% de 0.5-0.95. Así mismo, al comparar el genotipo CC entre el grupo de hipertensos e individuos normotensos se observa un incremento de la frecuencia genotípica (fg) en el grupo de hipertensos, con un valor de pC de 0.049 (RM=1.66, IC al 95% 0.99-2.78).



Grafica 19. Comparación de frecuencias alelicas (f_a) del sitio C43732 T entre hipertensos e individuos normotensos del alelo C y T.



Grafica 20. Comparación de frecuencias genotípicas (f_g) C43732T entre hipertensos e individuos normotensos del genotipo CC, CT y TT.

3. Haplotipos

Con los resultados obtenidos de los polimorfismos del gen *AGT* (532 C/T, -217 A/G, -6 A/G, 235 M/T y 174 T/M) y del gen *AGTR1* (-680 A/T, -119 A/G, -777 A/T, 44221 A/G y 43732 C/T) se evaluaron los posible haplotipos con el programa *Haploview versión 4.1.*, para cada gen, como se mencionó en la sección de análisis de resultados, el programa realiza varias mediciones de desequilibrio de ligamiento que utiliza para crear una representación gráfica, también conocida como mapa de haplotipos.

El número de hipertensos utilizado para formar los haplotipos fue de 115 y el número de individuos normotensos de 291 para cada gen; los mapas y tablas correspondientes se muestran a continuación.

3.1. Haplotipos para los sitios polimórficos del gen *AGT*

En el mapa de haplotipos se muestra el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores de estudio (Fig. 17).

En cuanto a la distribución en nuestra población se tiene que el diplotipo M235T (rs699) y A-6G (rs5051) se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LOD=108.95); así el diplotipo M235T (rs699) y A-217G (rs5049) están en desequilibrio de ligamiento (LOD=3.78), los diplotipos A-6G (rs5051) y A-217G (rs5049) también se encontraban en desequilibrio de ligamiento (LOD=3.09), de la misma forma los diplotipos A-6G (rs5051) y C-532T (rs 5049) están en desequilibrio de ligamiento (tabla 17).

Al hacer los haplotipos se forman siete diferentes combinaciones (CCAGC, TCGGC, CTAGC, CCAAT, CCGGC, TCAGC y TTGGC) observándose que la frecuencia en la que se presentan en los grupos de estudio es similar. (Tabla 18)

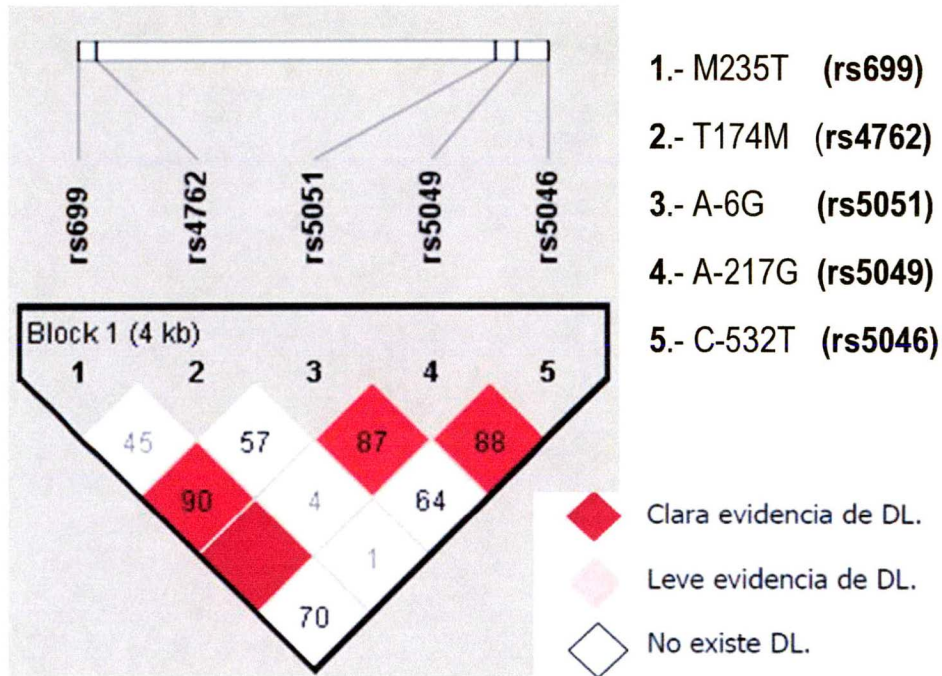


Figura 17 . Mapa de haplotipos del gen *AGT* del grupo hipertenso comparado con el grupo de individuos normotensos. El mapa de haplotipos es una representación gráfica de varias mediciones de disequilibrium de ligamiento (DL). Se observan cuatro diplotipos formados por los polimorfismos: **1** (M235T; **rs699**) y **2** (T174M; **rs4762**) con **3** (A-6G; **rs5051**) con el **4** (A-217G; **rs5049**) y este con el **5** (C-532T;**rs5046**), lo que indica que existe una clara evidencia de DL entre estos polimorfismos, el comportamiento de las frecuencias entre estos marcadores se comporta similar en los dos grupos de estudio. $p < 0.05$.

Tabla 17. Resultados de equilibrio de ligamiento de los sitios del gen *AGT*

<i>SNP 1</i>	<i>SNP 1</i>	<i>D'</i>	<i>LOD</i>
rs699	rs4762	0.459	1.11
rs699	rs5051	0.906	108.95
Rs699	rs5049	1	3.78
Rs699	rs5046	0.7	1.67
Rs4762	rs5051	0.571	1.81
Rs4762	rs5049	0.048	0
Rs4762	rs5046	0.017	0.02
Rs5051	rs5049	0.87	3.09
Rs5051	rs5046	0.641	1.61
Rs5049	rs5046	0.88	49.35

Tabla 18: Haplotipos para el gen *AGT*

Haplotipos	rs699	rs4762	rs5051	rs5049	rs5046	Fr. Casos	Fr. Controles	p
Bloques								
CCAGC	C	C	A	G	C	0.511	0.496	0.6975
TCGGC	T	C	G	G	C	0.270	0.302	0.3594
CTAGC	C	T	A	G	C	0.077	0.463	0.496
CCAAT	C	C	A	A	T	0.055	0.047	0.6645
CCGGC	C	C	G	G	C	0.018	0.022	0.6603
TCAGC	T	C	A	G	C	0.020	0.007	0.1738
TTGGC	T	T	G	G	C	0.013	0.011	0.7669

3.2. Haplotipos para los sitios polimórficos del gen del *AGTR1*

Se observa el mapa de haplotipos que nos muestra la posición de los marcadores y el desequilibrio de ligamiento entre estos (Fig. 18).

En cuanto a la distribución en nuestra población se tiene que el diplotipo A-777T (rs275651) y A-680T (rs275652) se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LOD=65.36), los diplotipos A-777T (rs275651) y A-119G (rs275653) están también en desequilibrio de ligamiento (LOD= 58.11), así mismo el diplotipo A-680T (rs275652) y el diplotipo A-119G (rs275653) se encuentran en desequilibrio de ligamiento (LOD=56.93) (Tabla 19).

Al hacer los haplotipos con los cinco diplotipos del gen *AGT* se formaron seis diferentes combinaciones, de estas cuatro (AGGCA, TTACG, TTATG y AGGTA) se encuentran en una frecuencia similar entre los grupos de estudio.

En cuanto a las otras dos combinaciones los resultados fueron significativos. La combinación TTATA se encontró con una frecuencia mayor en los hipertensos al compararse con el grupo normotenso ($p= 0.0025$, RM= 0.70, IC 95% de 0.51-0.97) en el caso del haplotipo TTACA la frecuencia de este fue mayor en el grupo de individuos normotensos al compararse con el grupo normotenso ($p=0.0041$, RM= 1.58, IC 95% de 1.14-2.20). (Tabla 20).

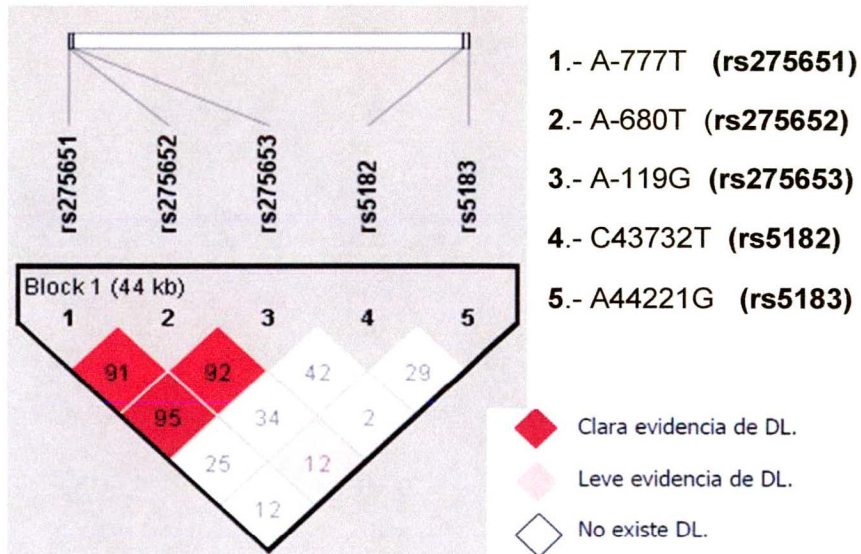


Figura 18 . Mapa de haplotipos del gen *AGTR1* del grupo de pacientes con HAS comparado con el grupo de individuos normotensos. El mapa de haplotipos es una representación gráfica de varias mediciones de desequilibrio de ligamiento (DL). Se observan tres diplotipos formados por los polimorfismos **1 (rs275651)** y **2 (rs275652)**, **1(rs275651)** y **3 (rs275653)**; **2 (rs275652)** y **3 (rs275653)**, estos indican que existe una clara evidencia de DL. Se observa un diplotipo mas formado por el sitio **3 (rs275653)** y **5 (rs5183)** este muestra una leve evidencia de DL. $P < 0.05$.

Tabla 19. Resultados del desequilibrio de ligamiento de los sitios del gen *AGTR1*

SNP 1	SNP 2	D'	LOD
rs275651	rs275652	0.915	65.36
rs275651	rs275653	0.952	58.11
rs275651	rs5182	0.259	0.96
rs275651	rs5183	0.12	1.81
rs275652	rs275653	0.92	56.93
rs275652	rs5182	0.342	1.32
rs275652	rs5183	0.128	2.14
rs275653	rs5182	0.424	1.77
rs275653	rs5183	0.023	0.08
rs5182	rs5183	0.291	1.75

Tabla 20: Haplotipos para los sitios del gen *AGTR1*

Haplotipos	rs27565 1	rs27565 2	rs27565 3	rs5182	rs5183	Fr. Casos	Fr. Controles	p	RM	IC 95%
Bloques										
TTATA	T	T	A	T	A	0.499	0.415	0.025	0.70	0.51-0.97
TTACA	T	T	A	C	A	0.312	0.415	0.0041	1.58	1.14-2.20
AGGCA	A	G	G	C	A	0.051	0.026	0.1192		
TTACG	T	T	A	C	G	0.046	0.026	0.1895		
TTATG	T	T	A	T	G	0.031	0.022	0.4766		
AGGTA	A	G	G	T	A	0.028	0.026	0.873		

V. DISCUSIÓN

La HAS representa la principal causa para sufrir un evento cardiovascular mayor, incluyendo la muerte (Lewington S. et.al., 2002). Esta enfermedad se caracteriza por una actividad elevada del sistema nervioso simpático, aumento en la producción de hormonas que retienen sodio y los vasoconstrictores, un aumento o inapropiada secreción de renina con mayor producción de angiotensina y aldosterona, deficiencias de vasodilatadores, reactividad vascular, remodelación vascular, producción de moléculas inflamatorias y disfunción endotelial (Guyton A.C., 1997).

Además, esta enfermedad puede alterar otros órganos y sistemas. La etiología de la HAS aún no está clara, aunque se ha propuesto la existencia de factores genéticos y ambientales involucrados en su génesis (Burnier M., et.al., 2000)

Algunas de estas propuestas actualmente no han podido ser replicadas en los laboratorios de investigación, sin embargo los estudios de heredabilidad proponen que el principal factor de riesgo para el desarrollo de esta patología son los factores genéticos.

En este estudio se analizaron 5 SNPs del gen *AGT*, y 5 del gen *AGTR1*, algunos de ellos ya reportados en población caucásica y asiática, encontrándose tanto resultados positivos como negativos.

En cuanto a los polimorfismos del gen del angiotensinógeno y del receptor tipo 1 de angiotensina II que hemos analizado, las frecuencias de los alelos y genotipos de estos polimorfismos están en nuestra población en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que disminuye la posibilidad de que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean el reflejo de la endogamia, posibles errores de tipificación de los pacientes con HAS y normotensos, apareamiento no azaroso (estratificación poblacional), la presencia de la mutación y la consecuencia de la migración de la población analizada (Deng, et al. 2001; Nielsen, et al. 1998). Desde el punto de

vista étnico, nuestro grupo representativo de la población y sus descendientes próximos son mestizos-mexicanos (Lisker R, et.al., 1990). Desde el punto de vista ambiental, nuestra población tiene, tanto en su conjunto como por lo que respecta a la comparación entre hipertensos y controles, una notable homogeneidad ya que nuestra población de estudio no presenta características extrañas.

Nuestro trabajo es uno de los primeros estudios de asociación realizado en un número considerado de polimorfismos dialélicos de genes del sistema renina angiotensina y el desarrollo de hipertensión arterial.

Los resultados obtenidos del análisis del polimorfismo -217 G/A (rs5049) del gen del angiotensinógeno (*AGT*) indican que el genotipo AG tiene un riesgo de 1.86 veces más ($p=0.026$; $RM=1.86$) al desarrollo de HAS en el grupo de hipertensos mexicanos. Se han realizado diversos estudios en donde los SNP's de la región promotora son de gran relevancia en la expresión del gen del angiotensinógeno ya que estos juegan un papel relevante en los controles de los niveles de angiotensinógeno. (Nakajima et. al. 2002). Se ha examinado el potencial de impacto de este polimorfismo en el sitio de inicio de la transcripción, en un estudio se clono la proteína YB-1 (NSEP1) y se midió la especificidad de interacción de esta con la región proximal del promotor de *AGT*, se observo que YB-1 reducía la actividad basal del promotor angiotensinógeno de dos maneras, la primera donde se sugería el posible papel de YB-1 en la modulación de la expresión de angiotensinógeno, y la segunda en donde funcionalmente esta interacción ocurre en un contexto de interacciones complejas, en donde se ven involucrados otros factores nucleares.

El sitio polimórfico -217 G/A del gen del angiotensinógeno se encuentra fuertemente asociado a la fibrilación atrial (Tsai, et.al; 2004). Se ha observado que existe una asociación entre las formas homocigotas para el alelo AA con relación a la enfermedad de Crohn en población Caucásica.

También se han realizado pruebas de funcionalidad del promotor en cultivos celulares y se estudio la unión entre oligonucleótidos para la posición -217 *AGT* a las proteínas nucleares, como resultado se sugirió que el efecto de la interacción específica podría influenciar la concentración basal de la transcripción del gen *AGT*.

Los estudios realizados en diversas poblaciones muestran resultados controversiales, ya que en población asiática (China) y africana se relaciona a la forma homocigota para el alelo G con la disminución en los niveles de aldosterona, renina y por tanto con la disminución del riesgo a hipertensión esencial (Jiang X, et.al., 2009; Woodiwiss AJ et.al., 2006), en otras poblaciones como la afroamericana y Asiática (Taiwán) se ha relacionado a la forma homocigota para el alelo A, con el incremento de los niveles de *AGT* por los adipocitos, favoreciendo la actividad transcripcional del gen *AGT*, y por tanto con el riesgo de padecer HAS.

De igual forma, en nuestro estudio se vio que existe una tendencia que indica que, el genotipo MM ($p=0.046$; $RM=1.52$) del polimorfismo T174M (rs4762) del gen del *AGT* podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de HAS. En estudios realizados en los años 90's (Jeunemaitre, et.al.,1992) se documento por primera vez la participación del polimorfismos T174M con la asociación a hipertensión esencial y la relación con el incremento de las concentraciones de angiotensinógeno en plasma, este primer estudio se llevo a cabo en familias Caucásicas, observando que este polimorfismo, donde la variante genética origina una sustitución de aminoácido, estaba en desequilibrio de ligamiento con la posición M235T, ambos sitios mostraban una frecuencia elevada, con lo cual se propuso que estas posiciones regulan directamente los niveles de presión arterial, sugiriéndose como factor de riesgo importante.

En una población japonesa más homogénea (Caulfield, et.al., 1994) se relaciono a la posición 174M como un marcador para la hipertensión esencial sensible a sal, esto es de suma importancia en esta población ya que en los últimos años los estudios epidemiológicos han documentado un incremento de la prevalencia de hipertensión y una tasa de mortalidad elevada debida a daño cerebro vascular, y como factor primordial se encuentra la ingesta de sal elevada.

En poblaciones aisladas del norte de América (Hegele, et.al., 1994, 1996) se encontró al genotipo *AGT* del codón 174 asociado significativamente con la variación en la presión sistólica en los hombres, pero también se observo que esta variante está fuertemente asociada con el genotipo del codón 4154 de la ApoB.

El estudio de este genotipo en una población china no encontró evidencia de desequilibrio de ligamiento por lo cual se sugiere que la etnicidad quizá tenga una diferencia significativa en cuanto al papel de varios genes en estas enfermedades complejas (Niu, et.al; 1998). En otra población asiática, se llevo a cabo el análisis de esta posición en grupos con diferentes enfermedades cardiovasculares y sin antecedentes de tabaco o alcohol, y esta posición no pudo ser correlacionada (Frossard, et.al., 1998). Los estudios realizados en individuos chinos e italianos dan cuenta de que debido a la composición del genoma de cada población es necesario realizar estudios específicos para cada una de éstas variables, ya que no es posible extrapolar los resultados. Lo reportado en población china contrasta con los resultados obtenidos en este estudio y con los resultados obtenidos para la población caucásica italiana (Iacoviello et al., 2005). Es importante considerar también las diferencias que existen en los factores de riesgo cardiovasculares en cada población. En el caso de la prevalencia de dichos factores de riesgo se tiene que en México que; hipertensión arterial está presente en un 30%, hipercolesterolemia 27.1%, diabetes mellitus 10.7%, obesidad 24.4%, tabaquismo 36.6%, sedentarismo 55% y síndrome metabólico 13.6% (Pavia y Lara, 2005).

Son múltiples los resultados obtenidos del análisis del sitio T174M, algunos estudios realizados en población Caucásica no han encontrado ninguna asociación significativa (Pavlovic M; 1999), en otros estudios se ha relacionado a la variable homocigota para el alelo T con enfermedad renal crónica, hipertrofia ventricular izquierda y un mayor riesgo de enfermedad arteria coronaria (Anbazhagan K; 2009; Ko YL; 1997), así como con los niveles de presión sanguínea y el metabolismo del colesterol (Robinson MT;2004). Son múltiples los estudios asociados entre las variable T174M y 235M/T, estas se han implicado en los efectos funcionales en relación al grado de los niveles circulantes de angiotensinógeno, debido al cambio de variable asociado con la función de la proteína.

En este estudio también se encontró una asociación significativa para el alelo C y la presencia de HAS en el sitio polimórfico C43732T (rs5182); con un riesgo del 1.42 veces mayor ($pC=0.046$; $RM=1.42$) de padecer hipertensión en quienes poseen el alelo C que en quienes no lo posee. Por otro lado, como podría intuirse, quienes son portadores del alelo T que es el otro diplotipo de este sitio polimórfico, parecen poseer cierto factor protector a padecer HAS ($RM=0.70$, $IC=0.5-0.95$, $pC=0.046$). C43732T se localiza en una región exónica del gen que codifica al receptor 1 de angiotensina; el alelo ancestral es C y el cambio de la base por T no altera el aminoácido en la posición 191 de la proteína (leucina/leucina). Se le ha propuesto como polimorfismo candidato para distintos desenlaces como hipertensión arterial sistémica en caucásicos americanos (Rana, Insel, et. al 2007) o respuesta clínica a inhibidores de la enzima convertora de angiotensina en hipertensos chinos (Xiaowen Su, Liming Lee et al 2007) sin haber podido mostrar alguna asociación.

Sin embargo, Israni y colaboradores reportaron en 2007 una fuerte asociación entre este polimorfismo y la disminución de la función renal en hipertensos trasplantados (Israni et al 2007). En este estudio se encontró que el alelo T del

sitio C43732T era más prevalente entre caucásicos americanos que entre negros, principalmente el genotipo TT, y que la presencia de este genotipo doblaba o triplicaba el riesgo de perder el 50% de la filtración glomerular en pacientes trasplantados del riñón. Los mecanismos que estos autores sugieren que podrían explicar el fenómeno observado son que el polimorfismo implicara modificaciones pos trasplante o que este polimorfismo estuviera en DL con otro polimorfismo que tuviera implicaciones más evidentemente funcionales o bien que las variantes de splicing del ARNm generen alguna isoforma que permita se dé la respuesta ajustada por la regulación de la abundancia relativa de la isoforma (Martín. Et.al, 2001).

Son contrastantes los resultados obtenidos en nuestra investigación sobre hipertensión y los reportados para decaimiento de la función renal. Mientras que nosotros hemos reportado el alelo C como de riesgo a hipertensión, el alelo T se asoció con disminución en la función renal. Esto podría deberse a que el genotipo TT tuviera implicaciones en la proliferación mesengial y fibroblástica en los riñones trasplantados tal como sugieren los autores de este artículo (Israni et al 2007), mientras que el genotipo CC podría activar la hipertensión arterial por otro mecanismo aun por descifrar. Esto pondría de manifiesto la complejidad de interacciones y mecanismos con que este mismo gen podría participar en la función renal y vascular, aunque estos resultados son controversiales, se ha sugerido en estos casos que el gen analizado no esté participando de manera directa en la patogénesis de la enfermedad, por lo que se propone que quizá otro gen puede ser el verdadero causal de la enfermedad, lo que sugiere que el sitio C43732T del gen *AGTR1* se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otro u otros genes.

Después de que se analizaron los SNPs en forma individual y aislada se analizó la construcción de haplotipos con los SNPs del gen *AGT* y *AGTR1*. Como es bien sabido en muchos casos los SNPs individuales no están asociados a la

enfermedad, sin embargo, pueden en muchos casos los haplotipos formados por estos estar asociados con la susceptibilidad o protección de la enfermedad (Haploview, 2005).

En cuanto al análisis del haplotipos de riesgo formado por los polimorfismos del gen *AGTR1* con el sitio C43732T los hipertensos mostraron incremento en la frecuencia del haplotipos TTACA, lo que podría indicar que los individuos que cuenten con esta combinación, tienen mayor riesgo a desarrollar hipertensión. Se mostro una disminución del haplotipos TTATA al comparar con el grupo control lo que podría indicar que los individuos que presenten este haplotipo cuentan con protección hacia este padecimiento ($p=0.0041$, $RM=1.58$; $p= 0.025$, $RM=0.70$, respectivamente).

En cuanto a los otros sitios polimórficos estudiados y el resultado de los haplotipos se encontraron en la misma frecuencia en ambos grupos de estudio. Estos resultados muestran por primera vez la distribución de las frecuencias de estos polimorfismos en población mexicana, estableciendo importantes diferencias entre las poblaciones mexicanas y lo ya reportado en poblaciones caucásicas y asiáticas y africanas.

VI. CONCLUSIONES

1. El genotipo AG del sitio A-217G del gen *AGT* está asociado con la susceptibilidad al desarrollo de HAS.
2. El genotipo MM del sitio T174M del gen *AGT* podría conferir un riesgo mayor al desarrollo de HAS.
3. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en ambos grupos de estudio en las posiciones -532 C/T, -6 A/G y 235 M/T del gen *AGT* fueron similares,
4. El alelo C del polimorfismo C43732T del gen *AGTR1* podría conferir susceptibilidad genética para el desarrollo de HAS, mientras que el alelo T podría ser un marcador de protección en este padecimiento.
5. En ambos grupos de estudio la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de las posiciones A-777T, A-680T, A-119-G y A44221G del gen *AGTR1* fueron similares.
6. En el caso de los haplotipos se detectó significativo al diplotipo C43732T y dos bloques asociados uno que confiere un mayor riesgo para HAS (TTACA) y uno que podría ser protector (TTATA).

VII. BIBLIOGRAFIA

- AbdAlla, S.; Lothar, H.; Quitterer, U.: AT (1)-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407: 94-98, 2000.
- Abdel-Latif AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med.* 2001. 226:153-163
- Akpunonu BE, Mulrow PJ, Hoffman EA. Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis Mon.* 1996. 42:609-722
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens.* 2000. 13:31S-38S
- Arredondo A, Zuniga A, Parada I. Health care costs and financial consequences of epidemiological changes in chronic diseases in Latin America: evidence from México. *Public Health.* 2005;119:711-720.
- Azizi, M.; Hallouin, M.-C.; Jeunemaitre, X.; Guyene, T. T.; Menard, J. : Influence of the M235T polymorphism of human angiotensinogen (*AGT*) on plasma *AGT* and renin concentrations after ethinylestradiol administration. *J. Clin. Endocr. Metab.* 85: 4331-4337, 2000.
- Baca V. y Orozco L.. Genética de las enfermedades complejas. En E. Orozco y J. Luna. Ed. Instituto Politécnico Nacional. México.2004. p. 75-91.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med.* 2001. 79:76-102
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005. 21:263-265.
- Bergsma, D. J.; Ellis, C.; Kumar, C.; Nuthulaganti, P.; Kersten, H.; Elshourbagy, N.; Griffin, E.; Stadel, J. M.; Aiyar, N. : Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 989-995, 1992.

- Beswick RA, Zhang H, Marable D, Catravas JD, Hill WD, Webb RC. Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. *Hypertension*. 2001. 37:781-786
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994. 368:850-853
- Bonnardeaux, A.; Davies, E.; Jeunemaitre, X.; Fery, I.; Charru, A.; Clauser, E.; Tiret, L.; Cambien, F.; Corvol, P.; Soubrier, F. : Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69, 1994.
- Brand, E.; Chatelain, N.; Paillard, F.; Tiret, L.; Visvikis, S.; Lathrop, M.; Soubrier, F.; Demenais, F. : Detection of putative functional angiotensinogen (*AGT*) gene variants controlling plasma *AGT* levels by combined segregation-linkage analysis. *Europ. J. Hum. Genet.* 10: 715-723, 2002.
- Brand, E.; Chatelain, N.; Paillard, F.; Tiret, L.; Visvikis, S.; Lathrop, M.; Soubrier, F.; Demenais, F. : Detection of putative functional angiotensinogen (*AGT*) gene variants controlling plasma *AGT* levels by combined segregation-linkage analysis. *Europ. J. Hum. Genet.* 10: 715-723, 2002.
- Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH-oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005. 65:16-27
- Briones AM, Salaices M, Vila E. Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 β exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech Ageing Dev*. 2005. 126:710-721
- Brookes A.. The essence of SNP's. *Gene* 1999. 2:177-186.
- Bryan RM, You J, Golding EM, Marrelli SP. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*. 2005. 102:1261-1277

- Burnier M, Brunner HR. Angiotensin II receptor antagonist. *Lancet* 2000; 355: 637-45. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003. 24:471-478
- Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: Definition and etiology. *Circulation.* 2000. 101: 329-335
- Caruso-Neves, C.; Kwon, S.-H.; Guggino, W. B. : Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102: 17513-17518, 2005.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000. 184:409-420
- Caulfield, M.; Lavender, P.; Farrall, M.; Munroe, P.; Lawson, M.; Turner, P.; Clark, A. J. L. : Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *New Eng. J. Med.* 330: 1629-1633, 1994.
- Caulfield, M.; Lavender, P.; Newell-Price, J.; Farrall, M.; Kamdar, S.; Daniel, H.; Lawson, M.; De Freitas, P.; Fogarty, P.; Clark, A. J. L. : Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J. Clin. Invest.* 96: 687-692, 1995.
- Causas de Mortalidad en México 2000. Estadísticas de Mortalidad, Secretaría de Salud. <http://www.ssa.gob.mx>
- Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001. 38:606-611
- Chen YF, Cowley AW, Zou AP. Increased H₂O₂ counteracts the vasodilator and natriuretic effects of superoxide dismutation by tempol in renal medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003. 285:R827-R833

- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*. 2002. 296:474-475.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*. 2002. 296:474-475.
- Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 2005. 11:RA194-205.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*. 2003. 289:2560-2572.
- Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 80: 2196-2200, 1983.
- Conapo. 2003. La situación demográfica de México, 2003. México: Consejo Nacional de Población, [www.conapo.gob.mx/publicaciones/2003/00.pdf] (Consulta: agosto 2009).
- Corvol P, Soubrier F, Jeunemaitre X: Molecular genetics of the renin-angiotensin system in human hypertension. *Path Biol* 1997, 45: 229-39.
- Cracowski JL, Devillier P, Durand T, Stanke-Labesque F, Bessard G. Vascular biology of the isoprostanes. *J Vasc Res*. 2001. 38:93-103
- Curnow, K. M.; Pascoe, L.; White, P. C. : Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Molec. Endocr*. 6: 1113-1118, 1992.
- Das UN. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit*. 2005. 11:RA155-162.

- Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001. 89:650-660
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Hypertension.* 2000. 18:655-673.
- Davisson, R. L.; Kim, H.-S.; Krege, J. H.; Lager, D. J.; Smithies, O.; Sigmund, C. D. : Complementation of reduced survival, hypotension, and renal abnormalities in angiotensinogen-deficient mice by the human renin and human angiotensinogen genes. *J. Clin. Invest.* 99: 1258-1264, 1997.
- Díaz S y Fernández S. Cálculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. *Cad Aten Primaria* 2002; 9: 148-150.
- Didion SP, Faraci FM. Effects of NADH and NADPH on superoxide levels and cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002. 282:H688-H695.
- Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension.* 1996. 28:732-737
- Dorn GW, Becker MW, Davis MG. Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle. *J Biol Chem.* 1992. 267:24897-24905.
- Dowell FJ, Martin W, Dominiczak AF, Hamilton CA. Decrease basal despite enhanced agonist-stimulated effects of nitric oxide in 12-week-old stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1999. 379:175-182.
- ENSA, 2000: Tomo 2 La salud de los adultos. [www.insp.mx/ensa/].
- Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Mezzano S, Blanco J, Kretzler M, Sugaya T, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-kappaB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol.* 2004. 15:1514-1529.
- Ferreira AJ, Santos RAS. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res.* 2005. 38:499-507.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001. 94:1871-1875.

- Furuta, H.; Guo, D.-F.; Inagami, T. : Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183: 8-13, 1992.
- Gaillard, I.; Clauser, E.; Corvol, P. : Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 8: 87-99, 1989.
- Gaillard-Sanchez, I.; Mattei, M. G.; Clauser, E.; Corvol, P. : Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum. Genet.* 84: 341-343, 1990.
- Gao Y, Ye LH, Kishi H, Okagaki T, Samizo K, Nakamura A, Kohama K. Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction. *IUBMB Life.* 2001. 51:337-344.
- Gao YJ, Lee RMKW. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol.* 2005. 146:1061–1068
- García Barreto, David. Hipertensión arterial; Editorial Fondo de cultura Económico, 2009.
- Gemmill, R. M.; Drabkin, H. A. : Report of The Second International Workshop on Human Chromosome 3 Mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 57: 162-166, 1991.
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000a. 20:2175-2183.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res.* 2000b. 86:494-501.
- Gu, C. C.; Chang, Y.-P. C.; Hunt, S. C.; Schwander, K.; Arnett, D.; Djousse, L.; Heiss, G.; Oberman, A.; Lalouel, J.-M.; Province, M.; Chakravarti, A.; Rao, D. C. : Haplotype association analysis of *AGT* variants with hypertension-related traits: the HyperGEN study. *Hum. Hered.* 60: 164-176, 2005.

- Guo, D.-F.; Furuta, H.; Mizukoshi, M.; Inagami, T. : The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 313-319, 1994.
- Guo, X.; Rotimi, C.; Cooper, R.; Luke, A.; Elston, R. C.; Ogunbiyi, O.; Ward, R. : Evidence of a major gene effect for angiotensinogen among Nigerians. *Ann. Hum. Genet.* 63: 293-300, 1999.
- Guyton AC, Coleman TG. Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1999 Oct;10(10):2248-58.
- Hata, A.; Namikawa, C.; Sasaki, M.; Sato, K.; Nakamura, T.; Tamura, K.; Lalouel, J.-M. : Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J. Clin. Invest.* 93: 1285-1287, 1994.
- Hegele, R. A.; Brunt, J. H.; Connelly, P. W. : A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation* 90: 2207-2212, 1994.
- Hegele, R. A.; Brunt, J. H.; Connelly, P. W. : Genetic and biochemical factors associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Hypertension* 27: 308-312, 1996.
- Herzig, T. C.; Jobe, S. M.; Aoki, H.; Molkentin, J. D.; Cowley, A. W., Jr.; Izumo, S.; Markham, B. E. : Angiotensin II type-1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 7543-7548, 1997.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent Progress in Angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999. 33:613-621.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 1996. 76:967-1002.
- Hostetler, J. A. : Hutterite Society. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press (pub.) 1974.

- Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension*. 1998. 32:459-466.
- Iyer, S. N.; Lu, D.; Katovich, M. J.; Raizada, M. K. : Chronic control of high blood pressure in the spontaneously hypertensive rat by delivery of angiotensin type 1 receptor antisense. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 9960-9965, 1996.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, et al. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-80.
- Jeunemaitre, X.; Soubrier, F.; Kotelevtsev, Y. V.; Lifton, R. P.; Williams, C. S.; Charru, A.; Hunt, S. C.; Hopkins, P. N.; Williams, R. R.; Lalouel, J.-M.; Corvol, P. : Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71: 7-20, 1992.
- Jourdan KB, Mitchell JA, Evans TW. Release of isoprostanes by human pulmonary artery in organ culture: a cyclo-oxygenase and nitric oxide dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997. 233:668-672.
- Juárez-Cedillo T, Zuñiga J, Acuña-Alonzo V, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Barquera R, Gallardo GJ, Sánchez-Arenas R, García-Peña Mdel C, Granados J, Vargas-Alarcón G. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet*. 2008:e37-9.
- Kageyama, R.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S. : Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 1984. 23: 3603-3609.
- Karet FE, Lifton RP. Mutations contributing to human blood pressure variation. *Recent Prog Horm Res* 1997, 52: 263-76.
- Karlsson, C.; Lindell, K.; Ottosson, M.; Sjostrom, L.; Carlsson, B.; Carlsson, L. M. S. : Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J. Clin. Endocr. Metab.* 83: 3925-3929, 1998.

- Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signalling and Function. *Blood Press.* 2003. 12:70-88.
- Katsuya, T.; Koike, G.; Yee, T. W.; Sharpe, N.; Jackson, R.; Norton, R.; Horiuchi, M.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J.; MacMahon, S. : Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 345: 1600-1603, 1995.
- Klein T, Neuhaus K, Reutter F, Nusing RM. Generation of 8-epiprostaglandin F(2alpha) in isolated rat kidney glomeruli by a radical-independent mechanism. *Br J Pharmacol.* 2001. 133:643- 650.
- Klein T, Reutter F, Schweer H, Seyberth HW, Nüsing RM. Generation of the isoprostan 8-epi-prostaglandin F2 α in vitro and in vivo via cyclooxygenases. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997. 282:1658-1665.
- Lahiri DK y Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991. 19:5444.
- Lassègue B, Alexander RW, Clark M, Griendling KK. Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth-muscle cells. Regulation and localization. *Biochem J.* 1991 May 15;276 (Pt 1):19-25
- Laviades C, Varo N, Fernández J, Mayor G, Gil MJ, Monreal I, Díez J. Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation.* 1998. 11:535-540.
- Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview : Overview of the reninangiotensin system- an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003. 144:2179-2183.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality. *Lancet.* 2002; 360: 1903-1913.
- Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8545-51.

- Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in Smooth Muscle. Invited Review. cGMP-dependent protein kinase signalling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 2001. 91:1421-1430.
- Lisker R, Ramírez E, Pérez-Briceño R, Granado J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centres. *Hum. Biol.* 1990. 62:791-801.
- Lüscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxation in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens.* 1990. 3:55-58.
- Lüscher TF, Diederich D, Weber E, Vanhoutte PM, Bühler FR. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 1988. 11:573- 578.
- Lumbers E.R. Angiotensin and aldosterone. *Regul Pept.* 1999. 80:91–100
- Manucha W, Oliveros L, Carrizo L, Seltzer A, Valles P. Losartan modulation on NOS isoforms and COX-2 expression in early renal fibrogenesis in unilateral obstruction. *Kidney Int.* 2004. 65:2091-2107.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol.* 1995. 15:279-307.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J Auton Pharmacol.* 1995. 15:279-307.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 1997. 75:111-134.
- Marín J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *J Auton Pharmacol.* 1993. 13:127-176.
- Markovic, D.; Tang, X.; Guruju, M.; Levenstien, M. A.; Hoh, J.; Kumar, A.; Ott, J. : Association of angiotensinogen gene polymorphisms with essential hypertension in African-Americans and Caucasians. *Hum. Hered.* 60: 89-96, 2005.

- Marre, M.; Jeunemaitre, X.; Gallois, Y.; Rodier, M.; Chatellier, G.; Sert, C.; Dusselier, L.; Kahal, Z.; Chaillous, L.; Halimi, S.; Muller, A.; Sackmann, H.; Bauduceau, B.; Bled, F.; Passa, P.; Alhenc-Gelas, F. : Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 99: 1585-1595, 1997.
- Martens, J. R.; Reaves, P. Y.; Lu, D.; Katovich, M. J.; Berecek, K. H.; Bishop, S. P.; Raizada, M. K.; Gelband, C. H. : Prevention of renovascular and cardiac athophysiological changes in hypertension by angiotensin II type 1 receptor antisense gene therapy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95: 2664-2669, 1998.
- Martin, M. M.; Buckenberger, J. A.; Jiang, J.; Malana, G. E.; Nuovo, G. J.; Chotani, M.; Feldman, D. S.; Schmittgen, T. D.; Elton, T. S. :The human angiotensin II type 1 receptor + 1166A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J. Biol. Chem.* 282: 24262-24269, 2007.
- Martin, M. M.; Lee, E. J.; Buckenberger, J. A.; Schmittgen, T. D.; Elton, T. S. :MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 281: 18277-18284, 2006.
- Martin, M. M.; Willardson, B. M.; Burton, G. F.; White, C. R.; McLaughlin, J. N.; Bray, S. M.; Ogilvie, J. W., Jr.; Elton, T. S. : Human angiotensin II type 1 receptor isoforms encoded by messenger RNA splice variants are functionally distinct. *Molec. Endocr.* 15: 281-293, 2001.
- Mauzy, C. A.; Hwang, O.; Egloff, A. M.; Wu, L.-H.; Chung, F.-Z. :Cloning, expression, and characterization of a gene encoding the human angiotensin II type 1A receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 277-284, 1992.
- Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *The Journal Clinical of Investigation.* 2005. 115:1404–1407.
- Montiel, M.; Perez de la Blanca, E.; Jimenez, E. : Angiotensin II induces focal adhesion kinase/paxillin phosphorylation and cell migration in human

- umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327: 971-978, 2005.
- Mosterd A, D'Agostino RB, Silbershatz H, Sytowsky PA, Kannel WB et al. Trends in the prevalence of hypertension, antihypertensive therapy, and left ventricular hypertrophy from 1950 to 1989. *N engl J Med* 1999; 340:1221-1226.
 - Mukoyama, M.; Nakajima, M.; Horiuchi, M.; Sasamura, H.; Pratt, R. E.; Dzau, V. J. : Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542, 1993.
 - Mulvany MJ. Abnormalities of the resistance vasculature in hypertension: correction by vasodilator therapy. *Pharmacol Rep.* 2005. 57:144-150
 Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002. 4:49-55
 - Murphy, T. J.; Alexander, R. W.; Griendling, K. K.; Runge, M. S.; Bernstein, K. E. : Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236, 1991.
 - Nakajima, T.; Cheng, T.; Rohrwasser, A.; Bloem, L. J.; Pratt, J. H.; Inoue, I.; Lalouel, J.-M. Functional analysis of a mutation occurring between the two in-frame AUG codons of human angiotensinogen. *J. Biol. Chem.* 274: 35749-35755, 1999.
 - Nakajima, T.; Inoue, I.; Cheng, T.; Lalouel, J.-M. :Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen. *J. Hum. Genet.* 47: 7-13, 2002.
 - Nakajima, T.; Jorde, L. B.; Ishigami, T.; Umemura, S.; Emi, M.; Lalouel, J.-M.; Inoue, I. :Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 108-123, 2002.
 - Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *MolAspects Med.* 2005. 26:33-65

- Newton E. M.. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005. 115:1425–1430.
- Niu, T.; Xu, X.; Rogus, J.; Zhou, Y.; Chen, C.; Yang, J.; Fang, Z.; Schmitz, C.; Zhao, J.; Rao, V. S.; Lindpaintner, K. : Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J. Clin. Invest*. 101: 188-194, 1998.
- Ohkubo, H.; Kageyama, R.; Ujihara, M.; Hirose, T.; Inayama, S.; Nakanishi, S. : Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998. 32:467-472.
- Passarge E. Genética. Texto y Atlas. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2004. 240-241 pp.
- Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006. 21:850-853
- Poch, Esteban; de la Sierra, Alejandro; Gonzalez-Nunez, Daniel; Oriola, Josep; Redon, Josep; Chaves, Felipe J; Marin, Pablo; Giner, Vicente; Pamies, Encarnacion; Villar, Jose; Ramirez, Reposo; Stiefel, Pablo; Rodriguez Perez, Jose Carlos; Rodriguez Esparragon, Francisco; Martinez, Esperanza; Carrion, Lucinio; Sanchis, Carlos; Divison, Jose Antonio Polimorfismos geneticos del sistema renina-angiotensina e hipertension arterial esencial. *MedClin (Barc)*. 2002 Apr 27;118(15):575-9.
- Porto PI, García SI, Plotquin Y, et al. Polimorfismos de los componentes del sistema renina-angiotensina en hipertensión arterial esencial (HTA). *Rev Soc Arg Cardiol* 1998; 66 (Supl IV): 104.
- Price AL, Patterson N, Yu F, Cox DR, Waliszewska A, McDonald GJ, Tandon A, Schirmer C, Neubauer J, Bedoya G, Duque C, Villegas A, Bortolini MC, Salzano FM, Gallo C, Mazzotti G, Tello-Ruiz M, Riba L, Aguilar-Salinas CA, Canizales-Quinteros S, Menjivar M, Klitz W, Henderson B, Haiman CA, Winkler C, Tusie-Luna T, Ruiz-Linares A, Reich D. A

- genomewide admixture map for Latino populations. *Am J Hum Genet.* 2007. 80:1024-1036.
- Pueyo ME, González W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000.20:645-651
 - Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest.* 1996. 97:1916-1923
 - Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T. Transcriptional regulation of cyclo-oxygenase expression: three pillars of control. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003. 16:59-67.
 - Riva A. and Kohane I. S. A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC Bioinformatics* 2004. 5:1-8.
 - Riva A. and Kohane I. S.. SNPper: retrieval and analysis of human SNP's..*Bioinformatics.* 2002. 18:1681-1685.
 - Rossoni LV, Salaices M, Marín J, Vassallo DV, Alonso MJ. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺,K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. *Br J Pharmacol.* 2002a. 135:771-781.
 - Rossoni LV, Salaices M, Miguel M, Briones AM, Barker LA, Vasallo DV, Alonso MJ. Ouabain-induced hypertension is accompanied by increases in endothelial vasodilator factors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002b. 283:H2110-H2118.
 - Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Egido J. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006. 15:159-166.

- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Reports* 2003. 5:73-79.
- Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol.* 2003. 163:1937-1947.
- Sadoshima, J.; Xu, Y.; Slayter, H. S.; Izumo, S. : Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977-984, 1993. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006. 15:152-158.
- Sasaki, N. : The relationship of salt intake to hypertension in the Japanese. *Geriatrics* 19: 735-744, 1964.
- Sawathiparnich, P.; Murphey, L. J.; Kumar, S.; Vaughan, D. E.; Brown, N. J. : Effect of combined AT(1) receptor and aldosterone receptor antagonism on plasminogen activator inhibitor-1. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 3867-3873, 2003.
- Schiffrin EL, Park JB, Pu Q. Effect of crossing over hypertensive patients from a beta-blocker to an angiotensin receptor antagonist on resistance artery structure and on endothelial function. *J Hypertens.* 2002. 20:71-78
- Schiffrin EL: Endothelin En: Hypertension Primer. Third Edition. Dallas: Lippincott Williams and Wilkins; 2003: 33-6.
- Scott, A. F. : Personal Communication. Baltimore, Md., 3/20/2001.
- Sebastiani P, Lazarus R. and Weiss S. T.. Minimal haplotype tagging..*Proc Nat Acad Sci.* 2005. 100: 9900–9905.
- Srivastava P, Rajanikanth M, Raghavan SA. Dikshit M. Role of endogenous reactive oxygen derived species and cyclooxygenase mediators in 5-hydroxytryptamine-induced contractions in rat aorta: relationship to nitric oxide. *Pharmacol Res.* 2002. 45:375- 382.
- Stitzel N. O, Binkowski A. and Tseng Y. Y.. TopoSNP: a topographic database of non-synonymous single nucleotide polymorphisms with and

without disease association. *Nucleic Acids Research*. 2004. 32: D520–D522.

- Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiohaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol*. 1999. 375:139-155.
- Sudbery P. *Genética Molecular Humana*. 2ª Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Madrid. 2004. 67, 279-293 pp.
- Szpirer, C.; Riviere, M.; Szpirer, J.; Levan, G.; Guo, D. F.; Iwai, N.; Inagami, T. : Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J. Hypertension* 11: 919-925, 1993.
- Takahashi, E.; Sasaki, N.; Takeda, J.; Ito, H. : The geographic distribution of cerebral hemorrhage and hypertension in Japan. *Hum. Biol.* 29: 139-166, 1957.
- Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002. 68-69:95-114
- Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003. 42:1075-1081
- Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Sato A, Liu M, Sakuma I, Kitabatake A, Kanno M. Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions. *J Vasc Res*. 1999. 36:311-320.
- Tosaka M, Hashiba Y, Saito N, Imai H, Shimizu T, Sasaki T. Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger. *Acta Neurochir (Wien)*. 2002. 144:1305-1310.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004b. 44:248-252.

- Tsai, C.-T.; Lai, L.-P.; Lin, J.-L.; Chiang, F.-T.; Hwang, J.-J.; Ritchie, M. D.; Moore, J. H.; Hsu, K.-L.; Tseng, C.-D.; Liao, C.-S.; Tseng, Y.-Z. : Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation* 109: 1640-1646, 2004.
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*. 1999. 14:1223-1229.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998. 38:97-120.
- Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol*. 2005. 144:449-458.
- Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Pavon Z, Fragoso Jm, et Al: Angiotensin-converting enzyme gene (ACE) insertion/deletion polymorphism in Mexican populations. *Hum Biol* 2003; 75: 889-896.
- Venter J. C, Adams M. D. and Myers E. W.. The sequence of the human genome. *Science*. 2001. 291:1304-1351.
- Viridis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003. 12:181-187.
- Wallukat, G.; Homuth, V.; Fischer, T.; Lindschau, C.; Horstkamp, B.; Jupner, A.; Baur, E.; Nissen, E.; Vetter, K.; Neichel, D.; Dudenhausen, J. W.; Haller, H.; Luft, F. C. : Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT-1 receptor. *J. Clin. Invest*. 103: 945-952, 1999.
- Wang, W. Y. S.; Glenn, C. L.; Zhang, W.; Benjafield, A. V.; Nyholt, D. R.; Morris, B. J. :Exclusion of angiotensinogen gene in molecular basis of human hypertension: sibpair linkage and association analyses in Australian Anglo-Caucasians. *Am. J. Med. Genet*. 87: 53-60, 1999.

- Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003. 27:201-206.
- Weeks, D. E.; Lange, K. : The affected-pedigree-member method of linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 42: 315-326, 1988.
- White LR, Juul R, Cappelen J, Aasly J. Cyclooxygenase inhibitors attenuate ET(B) receptor-mediated contraction in human temporal artery. *Eur J Pharmacol.* 2002. 448:51-57.
- Whitworth JA; World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. *J. Hypertens.* 2003 Nov;21(11):1983-92.
- Williams SP, Dorn GW, Rapoport RM. Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1994. 267:H796-H803.
- Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 1955. 19:251-253.
- World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. 2003; http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/hypertension/en/
- Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vázquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001. 281:R1343-R1360.
- Wyszynski D. F.. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan Am J Public Health.* 1998. 3(1):26-34.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988. 332:411-415.
- Zerrouk A, Auguet M, Chabrier PE. Augmented endotheliumdependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998. 31:525-533.

- Zhang K, Qin Z. S. and Liu j. S, Haplotype Block Partitioning and Tag SNP Selection Using Genotype Data and Their Applications to Association Studies. *Genome Research*. 2004. 14:908–916.

Anexo I

Soluciones

Solución TKM1 para extracción de ADN.

g/Lt		
10 mM Tris-HCl	PM = 157	1.58
10 mM KCl	PM = 74.557	0.745
10 mM MgCl	PM = 203.30	2.03
2 mM EDTA	PM = 372.2	0.74

* Ajustar a un pH de 7.6

Solución TKM2 para extracción de ADN.

g/Lt		
10 mM Tris – HCl	PM = 157.64	1.57
10 mM KCl	PM = 74.55	0.74
10 mM MgCl	PM = 203.3	2.03
0.4 mM NaCl	PM = 58.44	23.38
2 mM EDTA	PM = 372.2	0.74

SDS 20%: 20g en 100 ml de agua

NaCl 5M: Pesar 29.2 g y disolverlos en 80 ml de agua destilada, aforar a 100 ml con agua destilada.

Buffer para la electroforesis TBE 10 X

Tris-base 1 M	121.1 g
Ácido bórico 0.94 M	58.12 g
EDTA 0.01 M	3.72 g

* Disolver en 600 ml de agua destilada, ajustar pH = 8.0 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 28 de Agosto del 2009, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Biol. Exp. Nancy Lucero Martínez Rodríguez.

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Dr. Sara Frías Vázquez

Dr. David Cruz Robles

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez

Pedro Ahumada



REP. DE CUBA No. 99 DESP. 23-A
CENTRO HISTORICO MEXICO, D.F.

TESIS URGENTES

PRESUPUESTOS DE 9:30 A 7:00 P.M.
SABADOS DE 9:30 A.M. A 3:00 P.M.

TEL. 5512-8469
PART. 2619-0742